

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KLİNİK BİYOKİMYA OTOANALİZÖRLERİNDE HEMOLİZ İNDEKS
KULLANIMI

Uzmanlık Tezi
Dr. Sabiha KAMBUROĞLU

Trabzon-2013

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KLİNİK BİYOKİMYA OTOANALİZÖRLERİNDE HEMOLİZ İNDEKS
KULLANIMI

Uzmanlık Tezi

Dr. Sabiha KAMBUROĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Asım ÖREM

Trabzon-2013

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Asım ÖREM olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, Prof. Dr. E. Edip KEHA'ya, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na, Prof. Dr. Caner KARAHAN'a, Doç. Dr. Birgül VANİZOR KURAL'a, Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Yardımlarından dolayı çalışma arkadaşlarım Dr. Ayşegül TURAN'a, Dr. Tuba ESEN'e, Dr. Selçuk YAMAN'a, Dr. Ayşegül YILMAZ'a, Dr. Nazime ÇEBİ'ye, Dr. Süret AĞAÇ'a, Dr. Hüseyin YAMAN'a, Dr. Sevim KAHRAMAN'a, Dr. Mehtap DOĞRU'ya, Anabilim dalındaki tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Rutin laboratuvarındaki tüm çalışanlara, özellikle Şebnem HACIALİHAFIZ'a, Salih BORAN'a ve arkadaşım Arif Kamil SALİHOĞLU'na,

Her zaman bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme, özellikle eşim Ahmet Hamdi KAMBUROĞLU'na ve kızım Ceyda'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Dr. Sabiha KAMBUROĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Laboratuvar Hata Kaynakları	3
2.2. İnterferans	4
2.2.1. Eksojen İnterferan Maddeler	5
2.2.1.1. İlaçlar	5
2.2.1.2. Katkı maddeleri	5
2.2.1.3. Matrix Etkisi	6
2.2.2. Endojen İnterferan Maddeler	6
2.2.2.1. Lipemi	6
2.2.2.2. Hiperbilirubinemi	7
2.3. Hemoliz	7
2.3.1. Eritrositler ve Genel Özellikleri	7
2.3.2. Hemolize Örneklerin Sınıflandırılması	8
2.3.3. Klinik Laboratuvarlarda Hemolize Örneklerin Sıklığı	9
2.4. <i>İn vivo</i> Hemoliz	10
2.4.1. <i>İn vivo</i> Hemolizin Laboratuvar Bulguları	12
2.5. <i>İn vitro</i> Hemoliz	13
2.5.1. Örnek Alımı Sırasındaki <i>İn vitro</i> Hemoliz Nedenleri	15
2.5.2. Örnek Alımı Sonrasındaki <i>İn vitro</i> Hemoliz Nedenleri	19

2.6. <i>İn vivo</i> ve <i>İn vitro</i> Hemoliz Ayrımı	20
2.7. <i>İn vitro</i> Hemoliz İnterferansı	21
2.7.1. Biyolojik İnterferans	21
2.7.2. Spektral İnterferans	23
2.7.3. Kimyasal İnterferans	23
2.8. Klinik Laboratuvarlarda Hemolize Örneklerin Tespiti	25
2.9. Hemolize Örneklerin Yönetimi	27
3. MATERİYAL VE METOD	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Analizler ve Metodları	32
3.2. Metodlar	33
3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması	33
3.2.1.1. Preanalitik Yaklaşım	33
3.2.1.2. Analitik Yaklaşım	33
3.2.2. Hemolizat Hazırlanması	34
3.2.3. Biyokimyasal Parametreler	34
3.2.4. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Servislerdeki Preanalitik Sürecin Değerlendirilmesi	37
4.2. Servislerin Verileri	37
4.3. Çalışma Yönteminin Performans Verileri	42
4.4. Hemoliz İndeks Çalışma Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
6.1. Sonuçlar	59
6.2. Öneriler	59
7. ÖZET	61
8. SUMMARY	62
9. KAYNAKLAR	63

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Laboratuvar test işlemleri sürecindeki hataların türleri ve oranları	4
Tablo 2. Hemolize örneklerin sınıflandırılması	9
Tablo 3. <i>İn vivo</i> hemolize yol açan nedenler	11
Tablo 4. Klinik laboratuvarlarda hemolitik örneklerin majör nedenleri	14
Tablo 5. Örnekte klinik açıdan anlamlı sapmaya neden olan serbest hemogloblin eşik değerleri	24
Tablo 6. Parametrelerin hemolizden etkilenme şekli	25
Tablo 7. Poliklinik ve servis bazında hemoliz indeks dağılımı	38
Tablo 8. Eğitim öncesi ve sonrası veriler	39
Tablo 9. HI> 100 ve HI>200 kan numunelerin eğitim öncesi ve eğitim sonrası yüzde değişimleri	40
Tablo 10. Hemoliz İndeksi performans verileri	42
Tablo 11. 1. <i>İn vitro</i> hemoliz çalışma sonuçları	45
Tablo 12. 2. <i>İn vitro</i> hemoliz çalışma sonuçları	46
Tablo 13. 3. <i>İn vitro</i> hemoliz çalışma sonuçları	47
Tablo 14. Fraser ve CLIA 88 kriterlerindeki yüzde değişimlere göre tespit edilen sınır eşik değerleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Artan hemoliz derecelerine göre renk değişimi	9
Şekil 2. Hemolizin biyokimyasal ve hematolojik sonuçları	12
Şekil 3. Vakumlu kan alma sistemi	16
Şekil 4. İntravenöz katater ve kelebek set	18
Şekil 5. Hemolize örneklerin yönetimi	28
Şekil 6. Hemolize örneklerin Hemoliz İndeksi ile yönetimi	29
Şekil 7. Serum İndeks Gen 2 absorbans ve dalga boyu grafiği	36
Şekil 8. Toplam üç servisteki HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri	40
Şekil 9. Göğüs hastalıkları servisi HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri	41
Şekil 10. Dermatoloji servisi HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri	41
Şekil 11. Acil servis HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri	42
Şekil 12. Hemoglobin ile hemoliz indeks sonuçlarının kolerasyon grafiği	44
Şekil 13. Hemoliz indekse göre parametre değişimleri: AST, D.BİL, T.BİL, CK-MB, K ⁺ , LDH	48
Şekil 14. Hemoliz indekse göre parametre değişimleri: ALP, ALT, CK, GGT, Fe ²⁺ , K ⁺ , PO ₄ ⁼	48

KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
CK	: Kreatin kinaz
D.BIL	: Direkt bilirubin
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
GGT	: Gamaglutamil transferaz
GPSC	: Küresel pre-analitik bilim kurulu
IFCC	: Uluslararası klinik biyokimya ve tıbbi laboratuvarlar federasyonu
LDH	: Laktat dehidrogenaz
RBC	: Eritrosit
RES	: Retiküloendoteliyal sistem
T.BIL	: Total bilirubin
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
WG-LEPS	: Laboratuvar hataları ve hasta güvenliği çalışma grubu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Analitik süreçleri etkileyebilecek faktörlerin önceden bilinmesi ve mümkün olduğu kadar giderilmesi, sonuçların doğruluğunu saptamak açısından oldukça önemlidir (1). Laboratuvar test sonuçları, klinik muhakeme, karar verme ve tedavi izlemine önemli bir katkı sağlamaktadır. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından yayınlanan en güvenilir tanımlamaya göre, laboratuvar hatası “testleri raporlanmış sonuçlar şeklinde düzenlemeyi ve uygun şekilde yorumlamayı engelleyen herhangi bir defekt” olarak kabul edilmiştir. Klinik laboratuvar hataları, analiz öncesi (preanalitik), analiz sırası (analitik) ve analiz sonrası (postanalitik) olmak üzere üç ana grupta toplanmıştır. Preanalitik hatalar bütün laboratuvar hatalarının yaklaşık % 70’ini oluşturur (2).

İnterferans, bir madde veya sürecin bir tahlilin sonucunu yanlış olarak değiştirdiğinde meydana gelir. Bu daha fazla uygunsuz test yapılmasına, yanlış tanımlara ve hasta için istenmeyen sonuçları doğurma potansiyeli olan tedavilere yol açabilir (3).

Preanalitik faktörlerin sebep olduğu analitik interferans, klinik laboratuvar ölçümlerinde belirgin bir hata kaynağıdır. Laboratuvar testlerinde hemoliz, bilirubin ve lipidlerin sebep olduğu analitik interferans, laboratuvar tıbbının en yaygın sorunlarının başında gelir (4).

Hemoliz ise bu üç faktör arasında en sık görülenidir. Hemoliz toplam laboratuvar numunelerinin yaklaşık % 3.3’ünde görülmekte olup reddedilen numunelerinde yaklaşık % 60’ını oluşturmaktadır (5).

Hemoliz, eritrositlerin hücre membranındaki hasar sonucu başta hemoglobin olmak üzere eritrositlerin içerdiği tüm materyalin içinde bulunduğu serum veya plazmaya geçmesidir. Serbest hemoglobin plazmadaki üst referans düzeyi 2 mg/dL iken, bu değer serumda 5 mg/dL’dir. Hemoliz, görsel olarak serbest hemoglobin konsantrasyonunun > 30 mg/dL (118 µmol/L) olması şeklinde tanımlanır ki; bu da serum veya plazmaya pembe kırmızı bir renk verir. Hemoliz, % 0.5 oranında lizise uğramış eritrosit barındıran örneklerde bariz görünür hale gelir (6).

Hemolizin interferans etkisinin başlıca nedenleri;

- a. Eritrositlerdeki hemoglobin ve diğer intrasellüler komponentlerin serum veya plazmaya çıkması ile bazı analitlerin düzeyinde hatalı yükselmelere ya da dilüsyonel etkilere sebep olan biyolojik interferans.
- b. Metodla ve analiz edilecek materyalle ilgili spektrofotometrik interferans.
- c. Eritrositlerden açığa çıkan kan hücre bileşenlerinin, analitik reaksiyonun kimyasalları ile etkileşimi sonucu oluşan kimyasal interferanstır (7).

İkterik interferans: İkter, serum ve plazmada farklı bilirubin türlerinin (konjuge ve konjuge olmayan) seviyesinin artmasıdır (8).

İkterik interferans iki şekilde meydana gelir;

- a. Bilirubin, reaktiflerle kimyasal olarak reaksiyona girmesinden dolayı klinik kimya analizlerini interfere edebilir.
- b. Bilirubin, 400 ile 500 nm arasındaki verdiği güçlü absorbansa bağlı spektral özelliklerinden dolayı etkileşime neden olabilir (9).

Lipemik interferans: Lipemi, serum ve plazmada çıplak gözle görülebilen bulanıklık olarak tanımlanır. Lipeminin en sık gözlenen nedeni serum ve plazmada trigliserit konsantrasyonunda artıştır. Genellikle trigliserit konsantrasyonu 300 mg/dL ve üzeridir.

Dolaşan lipid partiküllerinin (VLDL ve şilomikron) ışık saçılmasına ve volüm yer değiştirmesi bağlı olarak gerçekleşir (9).

Bu çalışmanın interferanslara yol açan Serum indekslerinden en yaygın ve önemli olan Hemoliz İndeksi üzerinde yapılması planlanmıştır. Bu çalışmada;

1. Laboratuvarımızda kalitatif yöntemlerle (gözleme ile) hemolizin belirlenmesi yerine kantitatif olarak otomatize yöntemlerde hemoliz indeksinin belirlenmesi.
2. Hemolizin etki edeceği muhtemel testlerin hangi seviyede hemolizden ne kadar etkilendiğinin tespiti.
3. Hemolizden etkilenen bu testlerin uygun hata payı dikkate alınarak düzeltilmiş değerler olarak verilip verilemeyeceğinin ortaya konulması,
4. Poliklinik ve servislerdeki preanalitik hata faktörlerinin (kan alımında kullanılan yöntemlerin, numune transport işlemlerinin) tespit edilmesi ve hizmet içi eğitimlerle bu faktörlerin azaltılması ve sonuç olarak numune kalitesini arttırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laboratuvar Hata Kaynakları

Tıbbi laboratuvar disiplininin amacı hekimlere ve hastalara doğru, kaliteli ve hızlı hizmet sunmaktır. Hataların azaltılmasındaki temel esas kullanılan sistemlerin ve yapılan işlemlerin kalitesini devamlı suretle arttırmaktır.

Total test süreci, preanalitik, analitik ve postanalitik olmak üzere üç faza ayrılmaktadır. Preanalitik faz iki alt evreye ayrılır.

1. Pre-preanalitik evre, laboratuvarın dışında gerçekleşen ve uygun test seçimi, istem yapılması, örneklerin alınması, taşınması ve laboratuvara kabulü süreçlerini içerir.
2. Konvansiyonel preanalitik evre, örneklerin analize hazır hale gelmesi: santrafüjleme, serumun/plazmanın ayrılması, dilüe edilmesi ve örneklerin uygun kısımlara gönderilmesi gibi işlemler yapılır. Bu kısım laboratuvarın kontrolü altında gerçekleşir (10).

Analitik evre: örneklerin analizinin yapıldığı safhadır.

Postanalitik evre: analiz sonrası sonuçların hekime bildirilmesine kadar ki süreçtir (11).

Bu aşamaların bazıları, laboratuvarın değerlendirmesinden bağımsız olmaya eğilimli ise de, laboratuvar performansının etkinliğine ve kalitesine katkıda bulunmaktadır (6). Teknolojideki büyük çaplı gelişmeler (analitik teknikler, otomasyon, bilgisayar bilimi) test sürecindeki analitik safhadaki hata oranını azaltmıştır.

Preanalitik faktörler, klinik kimya testlerinin sonuçlarındaki varyasyonların ana kaynaklarıdır ve hemoliz de bu preanalitik varyasyon sebepleri arasında sonuçların güvenilirliğini etkileyen en önemli etkilerden biridir (12). Preanalitik hata kaynaklarının çoğunda testin tanımlanmasında hata, yetersiz miktarda örnek ya da alınan örneğin yapısındaki değişikliklerden (*in vitro* hemoliz, lipemi, ikter ya da pıhtılaşma) ileri

gelmektedir (13). Preanalitik aktivitelerin büyük bir kısmı halen manuel olarak yürütülmektedir. Bu nedenle, yoğun iş yükü ve sistemdeki bozukluklara bağlı insan kaynaklı hatalar oldukça yaygındır (14).

Preanalitik evre, kalitenin yükseltilmesi için esas ele alınması gereken evre olmaktadır. Preanalitik evredeki basamakların iyi bilinmesi, sürekli kalite gelişiminin, hataların daha da aza indirilmesinin ve hasta güvenliğinin ön koşulu haline gelmektedir.

Tıbbi laboratuvar disiplini içinde yapılan hatalar ‘optimum hasta bakımını sağlamak için gereken sonuç kalitesini engelleyecek, test seçiminden sonuç verilmesine kadar olan süreçteki herhangi bir hata’dır. Laboratuvar test işlemleri sürecindeki hata türleri Tablo 1’de verilmiştir (11).

Tablo 1. Laboratuvar test işlemleri sürecindeki hataların türleri ve oranları (11).

Evre	Hatanın türü	Oran
Pre-analitik faz	Uygunsuz test istemi	% 46 – 68.2
	Laboratuvar istek girişinin hatalı olması	
	Hastaya ait bilgilerin yanlış girilmesi	
	Yanlış tüpe kan alımı	
	Yetersiz örnek hacmi	
	Yanlış etiketlenmiş tüp	
	Örneğin alımı ve taşınmasında yetersizlik	
	İnfüzyon yolundan alınan örnek	
	Yetersiz örnek/antikoagülan miktar oranı	
	Uygunsuz santrüfuj	
Analitik faz	Taşıma hataları	% 7 - 13
	Cihazların yanlış çalışması	
	Örnek karışımı/ İnterferans	
	Kalite kontrolde belirlenmemiş eksiklik	
Post-analitik faz	Takip edilmeyen prosedürler	% 18.5 - 47
	Sonuç bildiriminde eksiklik	
	Analitik verilerin hatalı biçimde onaylanması	
	Uygunsuz veri girişleri	
	Aşırı “turn-around” döndürme süresi	

2.2. İnterferans

İnterferans (etkileşim), bir örnekte ölçülmek istenen bir maddenin gerçek sonucunu değiştiren yine örnekte bulunan bir maddenin etkisidir. Etkilenen maddenin kaynağına bağlı olarak eksojen ve endojen olarak sınıflandırılır.

A. Eksojen interferan maddeler: Hastaya ait örneğe karışan maddelerden köken alır. Bunlar ilaçlar, katkı maddeleri ve matrix etkisidir.

B. Endojen interferan maddeler: Hastaya ait örnekte yer alan maddelerdir. Bunlar hemoliz, lipemi ve bilirubinemidir (3).

2.2.1. Eksojen İnterferan Maddeler

Eksojen interferan maddeler; sonuçlarda pozitif veya negatif bir sapmaya yol açabilir. Pozitif bir interferans, analit konsantrasyonunu daha yüksek bir seviyede gösterir, negatif interferans ise tersi bir durumdur (3).

2.2.1.1. İlaçlar

Pek çok ilaç, analitin tayini ile etkileşime girer. Bir hastaya herhangi bir yolla (örneğin intravenöz, oral, subcutan) verilen herhangi bir ilaç, analitik yöntemlerle interfere olur. Çoğu ilaçlar, nonpolardan iyonik olanlara dek değişen spektrumlardaki fonksiyonel grupları olan düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerdir. Biyolojik olarak aktif olarak tasarlanan ve yüksek farmakolojik dozlarda verilen ilaçların analitlerle veya reaktiflerle etkileşime girme ihtimali yüksektir. İlaçların metabolitleri interferanslara neden olabilir ve asıl ilaç kadar dikkate alınmaları gerekir (15). Fenitoin ve major metaboliti 5-(p hidroksifenil)-5-fenilhidantoin; barbitürat tayini için kullanılan bir metotta yanlış pozitif sonuçlara yol açmaktadır. Furosemidin kendisi kreatinin tayininde kullanılan Jaffe metoduyla interfere olmamaktadır ancak yüksek dozlarda verilen furosemid negatif interferansa yol açan bir metabolit şeklinde davranmaktadır (12). Askorbik asit glukoz ölçümü için kullanılan glukoz oksidaz yönteminde negatif bir interferansa neden olur (9).

İlaç metabolitlerinin yol açtığı interferansları tespit etmek, esas bileşiklerinkini belirlemeden daha zor olabilmektedir, çünkü metabolitlerin konsantrasyonu pek tahmin edilemez ve dahası metabolitler sıklıkla bilinemeyebilir (12).

2.2.1.2. Katkı maddeleri

Antikoagülasyon için yaygın olarak kullanılan maddelerin (heparin, EDTA, sitrat, oksalat) birçok analit için kullanılan yöntemlerle interfere olduğu bildirilmiştir (12).

2.2.1.3. Matrix etkileri

Örnek işlem sürecindeki değişikliklerin, sonuçlarda spesifik biyokimyasal bileşene atfedilmeyen bir nedene bağlanmasıdır. Bu nedenle matrix etkisi, analizde elde edilen değerleri değiştiren çözeltideki değişimleri üreten maddenin hazırlanma sürecindeki herhangi bir şeydir. Bu sorun, örnek özel sürece tabi tutulduğunda meydana gelir. Analitin değerindeki değişim, örnekteki bilinmeyen veya zayıf karakterli etmenlere bağlıdır. Bu faktörler; çözeltinin kaynağına (örneğin at, sığır, insan), koruyucu maddelere, stabilizörlere (dithiothreitol veya asetil sistein) veya fiziksel değişimlere (liyofilizasyon, donma gibi) atfedilmektedir (12).

2.2.2. Endojen İnterferan Maddeler

2.2.2.1. Lipemi

Lipemi, serum ve plazmada çıplak gözle görülebilen bulanıklık olarak tanımlanır. Lipeminin en sık gözlenen nedeni serum ve plazmada trigliserit konsantrasyonu > 300 mg/dL olmasıdır (9).

Lipemi biyokimyasal sonuçlar üzerindeki etkisini ölçüm yöntemine göre bazı analitler için ışık saçılımını arttırarak, bazı analitler için ise analitlerin polar (sulu) ve nonpolar (lipit) fazlarda dağılımını değiştirerek gösterir (16). Lipeminin ışık saçılmasına neden olmasındaki temel mekanizma şilomikronlar ve VLDL serumda süt benzeri bir bulanıklık yapmasına bağlıdır. Çünkü laboratuvarlarda kullanılan ölçüm yöntemlerinin çoğu belirli reaksiyon koşullarında, ölçülen örnekten yansıyan, geçen ya da absorbe edilen ışık enerjisinin ölçümüne dayanan fotometrik ölçüm yöntemleridir (17). Aynı şekilde ışık saçılmasının nefelometri gibi ışık saçılmasına dayanan yöntemler üzerine de etkileri vardır (18).

Şilomikron etkisini azaltmak için kan örneklerinin bir gecelik açlık sonra alınması kısmen etkinlik sağlayabilirken, lipit metabolizma bozukluğu olan bireylerde veya acil laboratuvar analizi yapılması gerekli olan hastaların kan örneklerindeki lipemi, laboratuvar sonuçlarını etkileyerek değerlendirmelerde yanılmalara neden olabilir (19). İnterferans etkisini azaltmak için numunenin yüksek hızda santrifüjü ve dilüsyonu en sık kullanılan yöntemlerdir.

2.2.2.2. Hiperbilirubinemi (ikter)

Yükselmiş bilirubin konsantrasyonları endojen interferans kaynağıdır (12). Bu tür yükselmeler, akut ve kronik karaciğer hastalığı, biliyer siroz, alkolizmi de içeren çeşitli durumlarda ve bir çok ilaca verilen fizyolojik yanıt şeklinde görülebilir (20). İnterferansın bir kısmı bilirubinin spektral özelliklerinden, diğer bir kısmı da reaktiflerle kimyasal olarak reaksiyona girme özelliklerinden ileri gelmektedir. Spektral interferansı, 400 ile 500 nm'deki güçlü bilirubin absorbansına bağlıdır (12).

2.3. Hemoliz

Latincedeki hemo (kan) ve lizis (parçalanma) anlamına gelen hemoliz; eritrositlerin hücre membran hasarını takiben başta hemoglobin olmak üzere içerdiği tüm materyalin serum veya plazmaya geçmesi olarak tanımlanmaktadır (6).

2.3.1. Eritrositler ve Genel Özellikleri

Eritrositler (Red Blood Cell= RBC) dokulara oksijen taşıyan özelleşmiş hücrelerdir. Kan dokusunda hücresel kısmın en büyük oranını teşkil ederler. Eritrositler çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklindedir. Bu şekli kılcal damarlardan geçerken mekanik zarar görmesini önler. Çapları 7.5 - 8.7 μm kalınlıkları merkezde 0.6 μm ve kenarlarda 2.8 μm dir (21).

Kemik iliğinde öncü hücrelerden gelişip olgunlaştıktan sonra, dolaşıma salınan eritrositlerin yaşam süreleri yaklaşık 120 gündür. Hemoglobinin % 34'ünü kapladığı stoplazmalarında nukleus, mitokondri, lizozomlar, ribozomlar, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi gibi organeller bulunmaz (22). RBC'lerdeki hemoglobin ana yapı taşıdır. Hemoglobin kan hücrelerinin kırmızı rengini verir (23).

Eritrositlerin volümü 90 fL'dir ve yüzey alanı 136 μm^2 'dir. Eritrosit sayısı ortalama olarak erkeklerde $4.2 - 6.2 \times 10^{12}/\text{L}$ ve kadınlarda $3.8 - 5.5 \times 10^{12}/\text{L}$ kadardır (23).

Eritrositlerin yapım süreci eritropoez olarak adlandırılır ve yaklaşık bir hafta sürer. Eritropoez, dolaşımdaki eritrosit sayısını belli bir aralıkta tutacak şekilde düzenlenir (22).

Eritrositler yaşam sürelerini doldurduğunda RES hücreleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır ve hemoglobinleriyle beraber yıkılır. Globulin, yeniden protein sentezinde kullanılmak üzere amino asitlerine hidroliz edilir. Hem demiri kemik iliğine taşınarak yeniden hem sentezinde kullanılır. Geriye kalan porfirin iskeleti ise RES ve karaciğerde yıkılarak, açığa çıkan pigmentler safra yolu ile atılır. Bu işlemlerden veya eritrosit yaşam fazlarından birinin düzensizliğinde ciddi hastalıklar ortaya çıkar. Sonuçta eritrosit yapım ve yıkım hızında değişikliğe yol açarak eritrosit ömrünü kısaltır.

Eritrositlerin yapısının % 49'unu protein, % 44'ünü lipit, % 7'sini karbohidratlar oluşturur. Başlıca katyonu olan K^+ 'dur. Anyonları klorür, HCO_3^- ve PO_4^- olup, başlıca fosfat bileşiği 2,3-bisfosfogliserrattır. Eritrositlerde karbonik anhidraz, katalaz, peptidaz, anerobik glikoliz yolu ve pentoz fosfat yolu enzimleri bulunur.

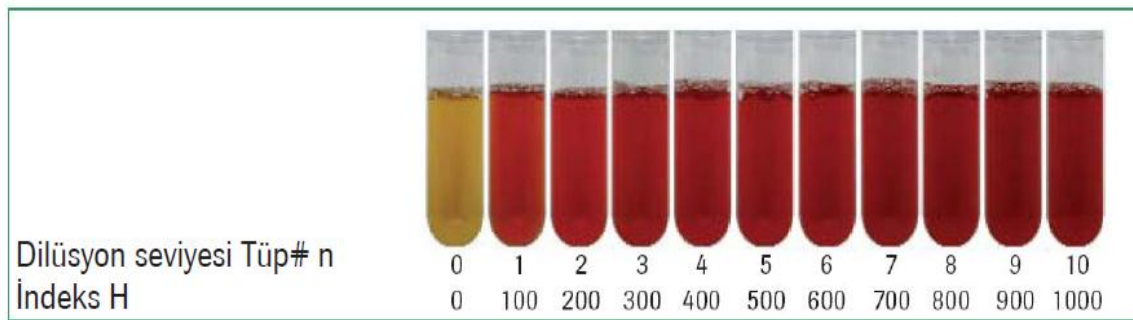
Eritrositlerin içindeki osmotik basınç, plazmadaki gibi % 0.9'luk NaCl çözeltisinin osmotik basıncına eşittir ve bu durum izotonik olarak ifade edilir (10). Bir osmometre gibi davranan eritrositler ortamın osmotik basıncındaki azalma veya artmaya göre şişer veya büzülür. Hipotonik bir solüsyonda eritrositler önce şişer, daha sonra patlar ve hemoliz olur. Ayrıca sabunlar, deterjanlar, kloroform gibi çeşitli yüzey aktif ajanlar da izotonik ortamda hemolize yol açabilirler. Kompakt bir eritrosit sıvı ortamda hemoliz olduğunda, tüm içeriği ortama geçer, geriye çözünmez hale membran proteiniyle hücre membranı (ghost) kalır (22).

2.3.2. Hemolize Örneklerin Sınıflandırılması

Tam kan santrifüj edildiğinde serum veya plazmada tipik olarak gözle görülebilir bir kırmızılık oluşur. Hemoliz terimi olayın klinik mi yoksa edinsel nedenlerden mi kaynaklandığını ayırt etmez. İlk durumda hemoliz, *in vivo* hemoliz ya da hemolitik anemi olarak bilinen çok çeşitli medikal durumlar tarafından tetiklenir. İkincil durumda, *in vitro* ya da sahte hemoliz olarak nitelendirilen örneğin toplanmasından analizine kadar olan süreçteki problemlerden kaynaklanır. Tüm sebeplere rağmen laboratuvar pratiğinde hemolize örnekler Tablo 2'de gösterildiği gibi serum veya plazmada serbest hemoglobin konsantrasyonuna göre sınıflandırılabilir (24). Şekil 1'de artan hemoliz derecelerine göre renk değişimi gösterilmiştir.

Tablo 2. Hemolize örneklerin sınıflandırması (24).

Sınıflandırma	Serum veya plazmadaki serbest hemoglobin	Spesmenin tahmin edilen renk durumu
Non-hemolize örnek	≤ 5 mg/dL	Sarı
Belli-belirsiz hemolize örnek	$\geq 5-30$ mg/dL	Sarıdan açık pembeye doğru
Hafif hemolize örnek	$\geq 30-60$ mg/dL	Pembeden açık kırmızıya doğru
Orta derecede hemolize örnek	$\geq 60-200$ mg/dL	Açık kırmızı
Ağır hemolize örnek	≥ 200 mg/dL	Kırmızıdan kahverengiye

**Şekil 1.** Artan hemoliz derecelerine göre renk değişimi

Hemoliz santrifüj edilmiş örnekteki serbest hemoglobin konsantrasyonu 30 mg/dL aştığında dikkatli bir inceleme ile görsel olarak tespit edilebilir (24). Bu da seruma pembeden açık kırmızıya yakın bir renk verip, örnekteki eritrositlerin % 0.5'nin yıkıldığını yansıtır (6, 24).

Hemoliz, klinik laboratuvar ölçümlerinde en yaygın preanalitik hatalardan biridir (25). Laboratuvar testlerinin doğruluğunu ve güvenilirliğini etkiler (6). Hemoliz, laboratuvara gönderilmiş uygun olmayan örneklerin % 40-70'inin reddine sebep olur (25).

2.3.3. Klinik Laboratuvarlarda Hemolize Örneklerin Sıklığı:

Bilgisayar bilimi ve teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak analitik safhadaki hataların azalmasına rağmen, preanalitik fazın yoğun manuel aktivitesinin çoğundaki standardizasyon eksikliği ve belirsizlik hala ciddi hata riski oluşturmaktadır. Preanalitik hatalar tüm test boyunca ortaya çıkan hataların % 70'ini oluşturur. Tüm bu hataların içinde hem acil hem rutin testlerde ve hem yatan hem de ayaktan hasta örneklerinde *in vitro* hemolizin yaygın olduğu tespit edilmiştir. Prevalansı klinik laboratuvara yönlendirilen

örneklerin % 3.3'ünü oluşturur (6, 13, 24). Uygunsuz olarak nitelendirilen örneklerde bu oran % 70'e çıkmaktadır (7).

IFCC ve GPSC'nin WG-LEPS'i kapsamında yapılan dünya çapındaki 391 klinik laboratuvarı içeren uluslararası bir çalışmada, klinik laboratuvarların büyük çoğunluğunda hemolizli örnek oranının % 1-5 arasında olduğu ve en büyük oranın acil departmanından (% 35) geldiği, onu pediatri ünitesi (% 16) ve yoğun bakım ünitesininin (% 7) izlediği bildirilmiştir (24, 26, 27).

Acil ünitesinden gönderilen hemolize örneklerin sıklığının sürekli olarak % 3-12.4 arasında olduğu ve bu oranın yataklı ünitelere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu durum acil ünitelerinde örnek toplama ve dağıtım protokollerine daha az uyumun olması, örnek toplama sorumluluğunun direkt laboratuvar desteğinin ve kontrolünün dışında olmasından kaynaklanmaktadır. Hemolize örneklerin çoğu (% 95) hafif hemolize karakterdedir (serbest hemoglobin <30 mg/dL) ancak sadece % 5'i klinik olarak fark edilebilen eşik değeri (serbest hemoglobin > 30 mg/dL) aşar (28). Hemoliz *in vivo* ve *in vitro* hemoliz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.4. *In vivo* Hemoliz

In vivo hemoliz dolaşımdaki eritrositlerin prematür yıkımıdır. Kemik iliği aktivitesinin RBC miktarını kompanse edemediği hemolitik anemiye kadar ilerleyebilir.

In vivo hemoliz ekstravasküler ve intravasküler hemoliz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (24). Eritrositler, özellikle karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından ortadan kaldırılabılır (ekstravasküler hemoliz) ya da daha nadir olarak dolaşımdayken membranları hasarlanarak yıkılabilirler (intravasküler hemoliz) (23).

Ekstravasküler hemoliz, otoimmün hemolitik anemi ve herediter sferositozda olduğu gibi RBC'lerin dalak ve diğer retiküloendotelial organlarda yıkımı ile karakterizedir

Intravasküler hemoliz, prostetik kalp kapakları, herediter RBC bozuklukları (glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği, herediter sferositoz, orak hücreli anemi, TTP, DIC, PNH) gibi patolojilerle birlikte (24).

In vivo hemolize bağlı ortaya çıkan anemilere hemolitik anemi adı verilmektedir ve tüm anemilerin % 5'ini oluşturmaktadır. Hemolitik anemilerin birçok nedeni vardır ve

zaman zaman sessiz, zaman zaman da hayatı tehdit eden durumlara sebep olabilmektedir. Hemolitik anemilerin nedenleri kalıtsal ve kazanılmış olarak sınıflandırılır (29-30).

Antikorlarla, tedavi için verilen kimyasallarla, toksik maddelerle, herediter faktörlerle (hemoglobinopatiler), enzim defektleri ya da enfeksiyonlarla (sıtma) ile ilişkilidir (31). Hemolizli örneklerin % 2-3' nin *in vivo* hemolize uğradığı tespit edilmiştir (28).

In vivo hemoliz sağlık personelinin kullandığı tekniğe bağlı olmayıp hemen hemen kaçınılmaz özelliğindedir (6). *In vivo* hemolize yol açan nedenler Tablo 3'de verilmiştir (24).

Tablo 3. *In vivo* hemolize yol açan nedenler (24).

Kalıtsal hemolitik anemiler

1. Hemoglobin üretim defektleri
 - a. Talasemiler
 - b. Orak hücreli anemi
2. Eritrosit membran üretim defektleri
 - a. Herediter sferositoz
 - b. Herediter eliptositoz
 - c. Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (PNH)
3. Eritrosit metabolizma defektleri
4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği
5. Pirüvat kinaz eksikliği

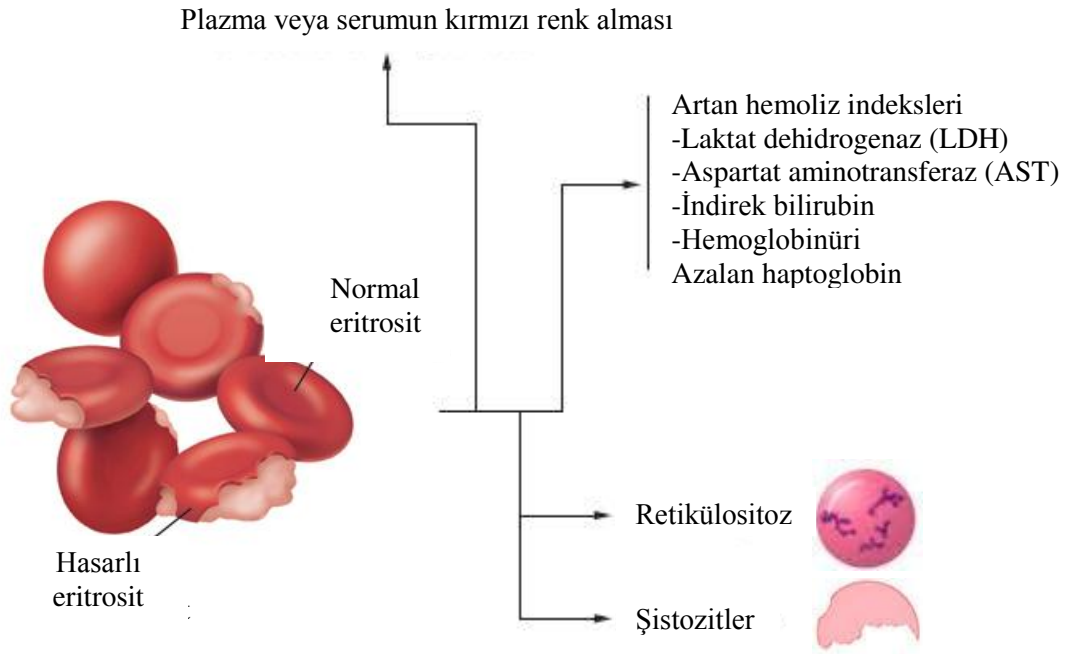
Kazanılmış hemolitik anemiler

1. İmmün kaynaklı nedenler
 - a. *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonu (Soğuk aglütinin hastalığı)
 - b. Otoimmün hemolitik anemi
 - c. Otoimmün hastalıklar (sistemik lupus eritematozus ve kronik lenfositik lösemi)
 2. Hipersplenizm
 3. Yanıklar
 4. Enfeksiyonlar
 - a. *Malarya*
 - b. *Babesiosis*
 - c. *Klostridyum*
 5. Dolaşımda mekanik hasarlar
 - a. Dissemine intravasküler koagülasyon (DIC)
 - b. Hemolitik üremik sendrom (HÜS)
 - c. Trombotik trombositopenik purpura (TTP)
 - d. Protetik kalp kapakları
 - e. HELLP (hemoliz, yükselmiş karaciğer enzimleri, düşük trombosit) sendromu
 6. Farklı kan grubundaki bir vericiden kan transfüzyonu
 7. İlaçlar, toksinler ve diğer çeşitli nedenler
-

2.4.1. *İn vivo* Hemolizin Laboratuvar Bulguları

Hemolitik aneminin teşhisi klinik bulguların ve laboratuvar verilerinin dikkatli yorumlanmasını gerektirir (24).

Hemoliz esnasında eritrosit içindeki bir takım maddeler ortama salınır. Bu maddeler içinde başta hemoglobin olmak üzere, laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST) ve potasyum bulunmaktadır. Hemolizin biyokimyasal ve hematolojik sonuçları Şekil 2’de verilmiştir (23).



Şekil 2. Hemolizin biyokimyasal ve hematolojik sonuçları (23).

Hemolitik anemilerde önemli bir belirteç de immatür eritrositlerdeki (> % 10) artıştır (retikülosit). Bu artış genellikle 24-48 saatlik bir gecikmeden sonra ortaya çıkar. İndirekt bilirubin ve ürobilinojendeki artış da plazmaya hemoglobin çıkışının bir göstergesidir. Hemoglobinin yıkım ürünü olan bilirubin kanda birikebilir, sarılığa neden olabilir, idrara çıkabilir ve idrar rengini koyulaştırır. Mekanik nedenlerden dolayı bir hemolitik anemi tablosu var ise periferik yaymada eritrosit fragmanları (şistositler) görülür (23).

In vivo hemolizde haptoglobin seviyesinde azalma, LDH, indirekt bilirubin ve retikülosit indeksinde artış gözlenir. Bu artışın miktarı hemolizin derecesine bağlıdır (31). LDH artışı özellikle LDH elektroforezinde LDH1 ve LDH2 ' de bir kaymaya neden olur.

İndirekt bilirubin ve ürobilinojendeki artış serbest hemoglobinin katabolizmasına bağlıdır (24).

Kliniklerde haptoglobulin testi sayesinde intravasküler hemoliz monitorizasyonu yapılabilir. Eritrosit yıkımını takiben ortaya çıkan serbest hemoglobin haptoglobuline bağlanarak (23) RES tarafından parçalanır (5).

Ekstravasküler hemolizde ise retiküloendotelial sistem, eritrositleri direkt olarak fagosit etmektedir ve haptoglobulin düzeyleri normaldir. Bu nedenle serum haptoglobulin düzeylerinin normal olması orta-ciddi intravasküler hemoliz tablolarının tanısında basit bir kriter olarak kullanılmaktadır (23). Bununla birlikte haptoglobulin akut faz reaktanı olduğundan eşlik eden enfeksiyon varlığında ya da kronik hemolizde bu proteinin sentezinin artmasından dolayı teşhisin kesinleşmesini karıştırabilir (24).

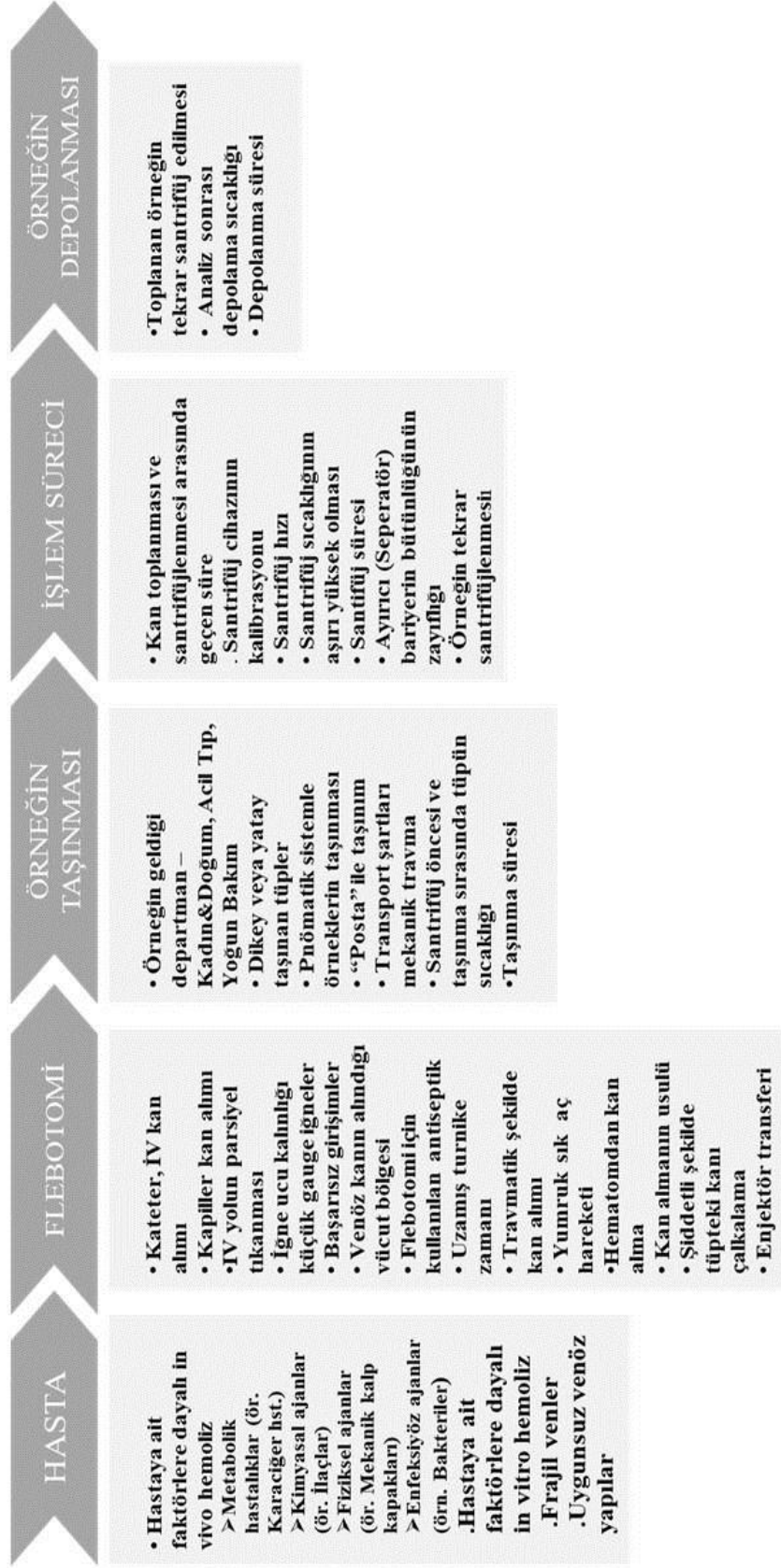
2.5. *In Vitro* Hemoliz

In vitro hemoliz, hem ayaktan hem de yatarak tedavi görmekte olan hastalarda uygunsuz örneklerin en önde gelen sebebidir (6).

In vitro hemoliz, kan örneklerinin alınması, laboratuvara ulaştırılması, işlenmesi ve depolanması esnasında meydana gelebilecek hatalardan dolayı meydana gelebilmektedir (8). *In vitro* hemoliz, hastanın yatağından başlayıp kanın analizine kadar olan sürecin herhangi bir basamağından kaynaklanabilir (6, 24). Önemli bir interferans faktörüdür (32). Hemolizi belirleyen faktörler ise şu şekilde sınıflandırılmaktadır: hastaya ait özellikler (fajil venler), numuneyi alan kişinin beceresi, transport şartları, işleme koşulları ve saklama koşullarıdır. Hemolitik örneklerin ana nedenleri Tablo 4'de verilmiştir (6).

Tablo 4. Klinik laboratuvarlarda hemolitik örneklerin majör nedenleri (6).

PREANALİTİK & ANALİTİK VE POSTANALİTİK FAZDA HEMOLİZİ ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN AKIŞ DİYAGRAMI



2.5.1. Örnek Alımı Sırasındaki *İn vitro* hemoliz Nedenleri

1. Kan alınacak alanın temizlenmesi esnasında: Kan alınacak alan hazır paketli alkollü mendil veya % 70'lik izopropil emdirilmiş gazlı bezle silinir. Dairesel hareketlerle içten dışa doğru temizlenir. Cildin kuruması beklenir. Alkol damlaları hemolize neden olur (33).

2. Uzun süreli turnike uygulaması: Cilt temizliği bitince hedeflenen ponksiyon alanının 10-15 cm üstünden turnike uygulanır. Turnike süresi 1 dakikanın altında olmalıdır (33). Özellikle turnike kullanımının aşırı uzadığı durumlarda (3-5 dakikanın üzerinde) ortaya çıkan venöz staz neticesinde damar dışına su, iyon ve küçük molekül ağırlıklı maddeler çıkmaktadır; bu nedenle bazı maddelerin konsantrasyonları ponksiyon bölgesinde yükselmekte ve testlerin güvenilirliğini bozmaktadır (18, 34). Kolesterol, trigliseritler, albümin ve hemogloblin gibi büyük moleküller kapiller duvardan geçemezler (35). Uzun süreli venöz stazda hemolizin neden ortaya çıktığı tam olarak bilinmemektedir. Muhtemel mekanizmalar arasında hemokonsantrasyon ve hücre içindeki sıvı kompozisyonundaki değişimlerin eritrositleri ve plateletleri parçalaması sayılabilir. Turnike çok uzun tutulduğunda hematoma da meydana gelmektedir. Turnike uygulaması ile ya da turnike olmaksızın yapılan yumruk sık-aç hareketi de eritrositleri hasarlandırıp hemolizli örneklerle neden olabilmektedir (23).

3. Damara giriş: Ponksiyon esnasında ven travmatize olur ise alınan ilk tüpte hemoliz mevcut olabilirken diğer tüplerde hemoliz olmayacaktır. Aşırı aspirasyon neticesinde RBC 'ler şırınga iğnesi boyunca maruz kalacakları türbülans ve fiziksel kuvvetler nedeniyle ezileceklerdir (18). Venöz kan alma işleminde antecubital fossadaki antecubital ven tercih edilmelidir (33). Median cubital ven, daha stabil, yüzeyle yakın ve daha az hassastır. El sırtındaki venler kolayca kırıdayıp yer değiştirebilir, vene girildiğinde ağrılı ve daha fragildir ve de kolaylıkla travmatize olabilirler, bu nedenle bu bölgelerden kan alımı sonucunda yalancı hemolizle karşılaşmak muhtemel olacaktır (35). İğne damara paralel olmalıdır. Damara 15°'lik açı ile enjektör cilde girmelidir. Vene girilince enjektör hafif çekilerek kanla doldurulur (33).

4. Çeşitli gereç ve iğnelerle kan alımı: Vakumlu kan alım sistemlerinde iki uçlu iğneler, plastik bir holder ve plastik kapaklı vakumlu tüpler bulunmaktadır.

Bu sistemlerin kullanımı laboratuvar testleri için hem en uygun numunelerin alınmasını sağlamakta, hem de kan alan personel için yüksek oranda güvenlik

sağlamaktadır, çünkü kan dışarıyla temas etmeden direkt olarak tüpün içerisine akmakta ve ek şırıngalara gereksinim olmamaktadır. Birden fazla tüpe kan alınırken de tüp değişimi esnasında her hangi bir kan sızıntısı meydana gelmemektedir (23). Vakumlu kan alma sistemi Şekil 3’de verilmiştir (23).



Şekil 3. Vakumlu kan alma sistemi (23).

5. Enjektörle kan alınması: Özellikle yüzeysel venlerden kan alımı esnasında yapılan kuvvetli aspirasyon hemolize neden olur (31). Kan alımında şırınga kullanımının en avantajlı olduğu nokta, operatörün ven içerindeyken uygulayacağı emme kuvvetini ya da basıncı rahatlıkla kontrol edebiliyor olmasıdır. Bununla birlikte bazı iktisadi (şırıngaların ek maliyetleri) ve güvenlik (şırıngadan tüpe kanın nakli esnasında iğne batması ve buna bağlı enfeksiyon riskinin yüksek olması) sebepleri dolayısıyla vakum sistemi yerine şırıngaların kullanılması tavsiye edilmemektedir. Beckton Dickinson Diagnostics firması tarafından yürütülen bir çalışmada şırıngayla alınan örneklerde hemolize rastlanma oranı % 19 olurken bu oran vakumlu tüp sistemlerinde sadece % 3 düzeyinde olmuştur (36). Enjektör iğnesi çıkarılmadan kanın tüpe aktarılması hemolize neden olur (31).

Kanın şırıngadan primer tüpe transferi esnasında eritrositler hasarlanıp parçalanabilmektedir. Kan alımı esnasında pistona uygulanan aşırı kuvvet buna neden olmaktadır. Ayrıca büyük volüme sahip bir şırıngaya alınan kan, aspirasyon esnasında pıhtılaşabilir ve hemolize sebep olabilir. Şırıngadaki kanın tüp içerisine aşırı kuvvet uygulanarak transferi esnasında eritrosit membranları parçalanmaktadır (37).

6. İntravenöz kataterden kan alınması: Bazı hastalarda kalıcı subkutan venöz kateterizasyon yapılmaktadır (invaziv tedavi alan ya da bazı diagnostik girişimlere maruz kalan hastalar). Bu venöz kanüller hastalarda birkaç dakika, birkaç saat (genel anestezi alan

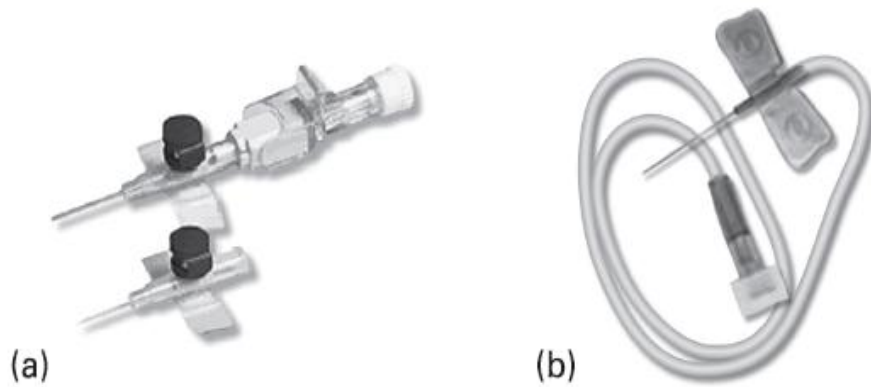
hastalar, cerrahi öncesi sedasyon alanlar, bazı diğer klinik uygulamalar, bazı radyolojik araştırmalar), birkaç gün ve hatta birkaç hafta (diyaliz hastaları, uzun dönem kemoterapi alan hastalar, yoğun bakım hastaları) kalabilmektedir. Bu kanüllerden kan ürünleri, sıvılar, elektrolitler, antibiyotikler, uzun süreli ağrı kesici infüzyonları, kemoterapi ilaçları vs etkin bir şekilde uygulanabilir. Bu hastaların katater açıklıklarını sağlamak önemlidir. Laboratuvar testleri için ikincil bir ponksiyon yapmak teorik olarak uygunsuz ve gereksiz görülebilir. Çünkü venöz yol teoride kullanılabilir. Bu yaklaşım aynı zamanda daha ucuzdur, çünkü kan alımı için ek malzeme kullanmaya gerek olmayacaktır. Yine bu yaklaşımın hem hasta hem de kan alan kişi için daha güvenli olduğu da söylenebilir. Bu nedenle hemşireler zaman zaman kan alımı için IV kataterleri kullanmayı seçebilmektedirler. Bu sayede ikincil bir ponksiyon yüzünden hem hasta konforu bozulmamış olur, hem de prosedürler azaltılmış olur.

Ancak IV katater uygulanan yoldan kan örnekleri alınması önerilmez. Periferik IV kataterlerden alınan örneklerin çoğunlukla eksik hacimli ya da hemolizli oldukları bilinmektedir. Kan alma sistemlerinde hapsolmuş olan yüksek volümdeki hava nedeniyle ilk alınan tüpte kan miktarı istenenden düşük olmaktadır. Dahası, kan alımı sırasında kateter bazen yerinden oynamakta ve hatta tekrar takılması gerekmektedir. Tüm bu olumsuz durumlar nedeniyle birden fazla iğne uygulaması olabilmekte, tedavi gecikebilmekte, hastaların tatmin düzeyi düşmekte ve bakım maliyetleri yükselmektedir. Bu gereçlerle alınan kanlarda eritrositlerin parçalanmasının en önemli mekanizması biaksiyel gerilim nedeniyle ortaya çıkan makaslama kuvvetidir. Belirli bir eşiğin üzerine çıktığında bu gerilim, hücre zarı üzerindeki porlardan dışarıya madde çıkışına ya da membranların parçalanmasına neden olmaktadır. Yüksek strese kısa süre maruz kalmanın ardından bu porlar, hücre içeriğinin dışarı sızmasından önce ya da sonra tekrar kapanabilir (23).

Kanın bir çok farklı iç çapa sahip bağlantıdan (katater ve bağlantılarından) geçmesi sonucu oluşan türbülans, hücrelerin parçalanmasına sebep olur (33). Venöz veya arterial kataterin parsiyel obstrüksiyonu durumunda eğer enjektör kullanılıyorsa daha basınçlı bir aspirasyon gerekeceğinden hemoliz ortaya çıkar (31).

7. Kelebek setlerle kan alımı: Kelebek setler plastik kanatlara tutturulmuş ve arkasında esnek bir tubingi olan bir iğneden oluşmuş gereçlerdir. Bu tek kullanımlık gereçler bazı seçilmiş hastalarda klasik düz iğnelere uygun bir alternatif olabilir çünkü adaptör (ve vakum setinin holderi) kelebek sete kolaylıkla applike edilebilir. Bu nedenle

kelebek set kullanarak kan almak özellikle çocuklarda, yenidoğanlarda ve küçük-zor-atipik ven yapısına sahip erişkin hastalarda daha kolay ve daha az ağrılıdır. Kelebek setlerin kullanımı ayrıca sinirli ve anksiyöz hastalarda, özellikle çok sayıda tüpe kan alınacağı durumlarda önerilmektedir. Bu girişim daha basit olmaktadır ve tecrübesiz flebotomistler için daha kolay olacaktır. Kelebek set iğnesinin boyu kısa olduğundan vene girildiği zaman üzerine devamlı elle basılıp sabitlenmesi gerekmemektedir (23). İntravenöz kateter ve kelebek set Şekil 4’de verilmiştir (23).



Şekil 4. İntravenöz katater ve kelebek set, (a) intravenöz katater (b) Kelebek set (23).

8. Dar ağızlı iğnelerle kan alımı: Flebotomide kullanılacak iğnelerin bazı özellikleri vardır. İğneler genellikle gauge (G) ölçüsüne göre kalibre edilir. Gauge, milimetre cinsinden çapı ifade eder. G ölçüsü büyüdükçe iğnenin ağzının çapı küçülmektedir (23). Kan alınacak damarın büyüklüğüne, yerine ve hastanın durumuna en uygun iğne ölçüsü seçilmelidir. Genelde kan alınırken iğneler 19-22 G olmaktadır. Erişkinlerde normal venlerde 20 G, kolay kollabe olan venlerde 21 G tercih edilir (33). Büyük çaplı (küçük G) iğnelerde, kan akım hızı ve türbülans fazladır ve daha sık hemolize sebep olmaktadır (17, 31, 33).

9. Manuel lanset kullanımı: Cilt ponksiyonu ya da kapiller kan alımı işlemi esnasında cildin dermis tabakasına ponksiyon yapılmakta ve subkutan katmandaki kapiller yataklara ulaşılmaktadır. Bu şekilde alınan kan içinde belirsiz oranlarda arteriol kanı, venül kanı, intertisyel sıvı ve intrasellüler sıvı mevcuttur. Yine de örnekte arterial kan, venöz kandan daha yüksek oranda bulunmaktadır çünkü kapillerin arteriol ucundaki basınç venül ucundaki basınçtan yüksektir.

Manuel lansetlerle kan alımı minimal invaziv ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Bu yöntem çok küçük yaştaki hastalardan, özellikle de yenidoğanlardan yapılması planlanan birçok laboratuvar testi için kan alımında kullanılmaktadır. Klinik Laboratuvar Standart Enstitüsü (CLSI), 1 yaş altı çocuklardan topuk kapiller kanı alınmasını önerirken, 1 yaş üstü çocuklardan parmak ucu kanı almayı tavsiye etmektedir (38).

Kapiller kan alımı esnasında olan hemolizin farklı sebepleri olabilmektedir. Bunlardan birisi dokuyu aşırı miktarda sıkıp sıvazlamaktır. Bu sıkıştırma sırasında kapiller içi hidrolik basıncı artacaktır. Bir diğer neden de manuel lanset kullanmaktır. Manuel lanset kullanımında insizyon derinliğini kontrol etmek kolay olmaz. Bunun yanında yenidoğanların hücreleri de fragildir (39).

10. Katkı maddeleri ile kanı karıştırmak için tüpü çalkalama sıklığı: Tüpü yavaşça 180° ters-düz edin (40). Tüpü çok sertçe sallamak ve karıştırmak hemolize sebep olur (31).

11. Tüpü doldurma miktarı: Katkı maddelerinin fazla konsantrasyonda bulunması eritrositlerin hücre zarlarında parçalanmaya sebep olabilir. Yetersiz miktarda kan alma buna neden olabilir. Ayrıca, oksalat plazmaya su çekerek eritrositlerin büzülmesine neden olur. Doğru kan: katkı maddesi oranını sağlamak için kanı ya vakum bitene kadar veya tüp üzerindeki seviye çizgisine kadar doldurmak gerekir (33).

2.5.2. Örnek Alımından Sonraki *In vitro* Hemoliz Nedenleri:

1. Tüp içi koagülasyon tamamlanmadan önce santrifüj etmek (31).
2. Örnek tüpündeki jel bariyerin tam oluşmaması. Eritrositler bu durumda serum ya da plazmayla kontakt halinde kalacaktır ve hemolize olarak serum ya da plazma içine karışacaktır (41).
3. Kanı hipotonik solüsyonlarla dilüe etmek (31).
4. Örneklerin geç santrifüjü.
5. Jelli ayrıştırıcı mevcut tüplerin re-santrifüjasyonudur.
6. Uygunsuz pnömatik tüp transfer sistemi. Tüpler tamamen doldurulmadığında veya örnek taşıyıcısının içinde kan tüplerinin hareketi korunmadığında hemoliz meydana gelebilir. Pnömotik tüp taşıma sistemleri keskin virajlı olmayacak ve örnek taşıyıcısının

aniden durmasına karşı koyacak şekilde olmalıdır. Basınç, vibrasyon ve keskin dönüş sonucu tüplerin düşmesi hemolize neden olur (33).

7. Yüksek hızda, çok uzun süre ve uygunsuz sıcaklıkta santrafuj (17-27). Bu esnada meydana gelen mekanik kuvvetler iyi bilinen bir hemoliz nedenidir (42).

2.6. *İn vivo* ve *İn vitro* Hemoliz Ayrımı

Hemolitik örneklerle karşı karşıya kalan laboratuvarların en kritik sorunlarından biri, *in vitro* hemolizi *in vivo* hemolizden ayırmaktır ve analitik düzenlemeden çok klinik durumun göz önüne alınacağı bir strateji izlenmelidir. Hemolizin klinik sürveyansı oldukça yaygın olmasına rağmen ikisinin arasındaki farkın nasıl ayırt edileceği konusunda tam bir fikir birliği mevcut değildir (43, 44).

İn vivo hemolizi içeren durum, hemen harekete geçmeyi gerektiren klinik olarak hayatı tehdit edici patolojilerle ilişkilidir. Bu yüzden *in vivo* hemolizden şüphelenildiğinde laboratuvar personeli ile klinisyenler arasındaki iyi bir irtibat, altta yatan potansiyel bir patolojinin hızla bildirimi için oldukça önemlidir (45, 46).

Plazma haptoglobinin azalması, eritrositin *in vivo* artmış yıkımının hızlı bir biçimde tayininde güvenilir bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Diğer belirteçlerin aksine haptoglobulin *in vitro* hemolizden etkilenmemektedir; çünkü dolaşımdaki eritrositlerin deforme olmasıyla şekillenen hemoglobin-haptoglobulin kompleksleri, CD163 reseptörleri yoluyla doku makrofajları ve monositler tarafından hızlı bir şekilde temizlenir. Bu parametre birçok klinik kimya cihazlarıyla ölçülebilmekte ve böylelikle *in vivo* hemoliz, *in vitro* hemolizden ayırt edebilmektedir. Ancak haptoglobulin bir akut faz reaktanı olduğundan eşlik eden enfeksiyonların varlığı, kronik hemoliz ayırt edilmelidir (18, 36).

İn vivo hemolizde retikülosit sayısı artmıştır. Retikülosit sayısı, ağır hemolizin olduğu kemik iliği depresyonlu hastalarda normale yakın olabilmektedir. Hemolize serumda LDH artışı da sıktır, ancak tanısal özgüllüğü düşüktür; çünkü bu enzim vücudun her bölgesinde mevcuttur ve vücudun herhangi bir yerindeki neoplastik veya iskemik hücrelerden açığa çıkabilmektedir. LDH1 ve LDH2 izoenzimleri eritrosit yıkımını göstermede daha spesifiktir, fakat myokard hasarında da ortaya çıkabilirler. İndirekt bilirubin konsantrasyonu artışı, *in vivo* hemolizi olan hastalarda izlenebilmektedir. Kan dolaşımında serbest hemoglobin düzeyi haptoglobulin konsantrasyonunu geçtiğinde

meydana gelen intravasküler hemoliz, idrarda serbest hemoglobin varlığını gösteren hemoglobinüriye neden olur (47).

In vivo hemolizden şüphelenildiğinde hastanın öyküsü, fizik muayenesi ve laboratuvar araştırmalarının kombinasyonuna ek olarak bazı testlerin önceden tanımlanması ayırıcı tanı için gereklidir. Periferik yayma ve morfolojik inceleme; (eritrosit immatüritesini yansıtan) polikromaziyi, retikülositozu ortaya çıkarabilir (23, 48).

2.7. *In vitro* Hemoliz İnterferansı

Uluslararası Klinik Biyokimya ve Tıbbi Laboratuvarlar Fedarasyonu (IFCC) şu tanımlamayı yapmaktadır. “Analitik interferans örnek bileşenlerin sebep olduğu, ölçüm sisteminde kendiliğinden bir sinyal üretmeyen sistematik bir ölçüm hatasıdır ” (43).

Diğer bir tanımlamaya göre “Bir analit için genellikle konsantrasyon veya aktivitesini belirten sonucun gerçek değerini değiştiren örnekte mevcut bir maddenin etkisi” şeklindedir (12).

In vitro hemoliz kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombositler) hasarından dolayı çok çeşitli bileşenler çevre serum ve plazmaya salınır ve interferans çeşitliliğine sebep olur. Hemoliz, kan örneğinin tamamı santrifüj edilip serum ya da plazmanın tetkiki yapılmadan belli olmayacağından sıkıntı meydana getiren bir durumdur (6).

Hemoliz nedeniyle gelişen interferans, serbest hemoglobinin örnekteki final konsantrasyonuna direkt bağlıdır (49). Yüksek serum hemoglobin düzeylerinde bu interferanslar; sıklıkla önceden tahmin edilemeyen sonuçlara yol açmaktadır (23). *In vitro* hemoliz interferansı üç şekilde olmaktadır.

2.7.1. Biyolojik İnterferans

İntrasellüler alanda ekstrasellüler alana göre daha yüksek olan eritrositlerin hücresel komponentleri, hemoliz sırasında plazma/serumda artış gösterir. Örneğin laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST), potasyum, magnezyum, fosfatın plazma aktivitesi veya konsantrasyonları artar (6, 8, 9, 31, 33). LDH’nın hücre içi miktarı plazmadan 160 kat, potasyumun 22 kat ve magnezyum ise 3 kat daha yüksek olmasından dolayı hemolizde sürekli hatalı yüksek değerlerle sonuçlanır (9, 12).

Eritrositler yüksek konsantrasyonlarda organik fosfat esterleri içerirler ve bu esterler serum fosfatazlarıyla hidrolize olduğundan hemolize örneklerde inorganik fosfat konsantrasyonu artmıştır (49). AST aktivitesi litredeki her 100 mg hemoglobine bağlı olarak % 2 artar. Litrede 100 mg hemoglobin serum LDH aktivitesini % 10, serum potasyum konsantrasyonunu % 0.6 artırır (33). Serum protein elektroforezinde serbest hemoglobin beta-globulin fraksiyonunda band oluşabilir (31). Ayrıca kan hücrelerinin lizisi nedeniyle plazma ve serum arasındaki farklılıklar (esasen trombositler tarafından); nöron spesifik enolaz, potasyum ve asit fosfataz serumda artar (8).

Ekstrasellüler konsantrasyonu intrasellüler konsantrasyona göre yüksek olan moleküllerde dilüsyonel etki ile yalancı azalmalar gözlenir. Örneğin; alkalen fosfotaz (ALP), gama glutamil transferaz (GGT), glukoz, sodyum değerleri dilüsyonel etkileri nedeniyle belirgin olarak azalır (5, 6, 31).

Primer ve sekonder hemostazın aktivasyonunu tetikleyen ve RBC membranından salgılanan tromboplastik-like maddesinin salgılamasına bağlı fizyolojik hemostaz karmaşasına neden olur (31).

Demir testinde hemolizin interferansı farklıdır. 1µmol hemoglobin monomeri, 1µmol demir içerir. Örnekte 386 mg/dL'lik serbest hemoglobin varlığı demir test sonuçlarında dramatik bir artışa yol açar; ancak, bilinmeyen nedenlerden dolayı, belirli demir tahlilleri, negatif hata gösteren durumlarda bile, hataya diğerlerinden daha az duyarlıdır. Grafmeyer, bunun reaksiyon ortamının pH'sına, kullanılan deterjanlara ve spektral interferansa bağlı olabileceğini önermiştir. Özellikle, demir hemoglobin moleküllerinden ayrılmadığından interferans muhtemelen yapısal olarak optiktir ve bir boş örnek kullanılarak elimine edilebilir. Buna karşılık, demir hemoglobin moleküllerden ayrıldığında mevcut bir interferans yaygındır (45).

Hemoglobin bir protein olduğu için, hemolize örneklerdeki serbest formunun varlığı, total protein test sonuçlarını artırabilmektedir. Masif hemolizin varlığında bile (yani örnekteki serbest hemoglobin'in >386 mg/dL nin üzerinde olması) açığa çıkan intrasellüler proteinlerin göreceli miktarı ılımlı olacaktır, bu miktar göreceli olarak bazı dönemlerde anlamlıdır. İlave olarak spektral interferansın varlığından dolayı hata büyük olacaktır (23).

2.7.2. Spektral İnterferans

Bu, eklenen absorbanslar yasasına dayanır. Test için kullanılan dalga boylarında absorbe olan bütün maddeler ölçülen konsantrasyonda açık bir artışa neden olacaktır (45). Hemoglobin 340 nm civarında absorbe olmaya başlar ve böylece NADH ve NADPH'ın absorbans özelliklerine dayanan yöntemleri etkiler (12, 32). Hemoglobin karakteristik dalga boyu olan 415 nm ışığı çok kuvvetli absorbe eder (Soret piki). 530 ve 600 nm'ler arasında daha düşük, 540 ve 570 nm de iki pik daha yapar. Bu yüzden bu dalga boylarındaki ölçümler büyük çapta etkileşime girerler. Spektral interferantlar, analitik reaksiyon sırasında kimyasal değişime uğramaksızın yapılan fotometrik ölçümlerde (özellikle 415, 540, 570 nm de) analitinkine benzer cevap oluştururlar. Kör değerinde artmış absorbansa veya değişime neden olurlar. Örneğin, alanin aminotransferaz (ALT), kreatinin, kreatin kinaz (CK), demir, lipaz, üre (5, 6, 31, 32, 45, 49).

Hemoglobinin yapısı, bulunduğu ortama göre değişkenlik gösterir; asidik ortamda presipite olur, bazik ortamda hematine dönüşür, redükte olabilir, methemoglobine, karboksi- hatta sülfhemoglobine dönüşebilir; bunların hepsi ayrı ayrı farklı interferans paterni ve spektrumları belirtir (45). Bununla beraber spektral interferans lineer seyrederek ve AST, ALT, CK ve LDH gibi bazı enzimlerin tahmin edilenden yüksek çıkmasına doğru kalıcı bir meyil meydana getiren serum veya plazmadaki serbest hemoglobinin son konsantrasyonuna bağlıdır. Bilirubin, demir, lipaz ve GGT ölçümleri üzerine böyle interferansların etkisi sıklıkla serbest hemoglobin ve reaktifler arasındaki bir kimyasal reaksiyonda spektral üst üste binme olabilir. ALP' nın alkali bir ortamdaki reaksiyon boyunca hemoglobinin denatürasyonuna neden olduğu düşünülür (50).

2.7.3. Kimyasal İnterferans:

Kan hücre bileşenleri, analitik reaksiyonun kimyasalları ile reaksiyona girerek analitin ölçümünde doğrudan veya dolaylı interferansa neden olurlar. Reaktif solüsyonlarındaki çeşitli anormal maddelerin varlığı, ürünlerin bazısını tüketerek reaksiyonu farklı derecelerde interferans meydana getirebilir. Eritrositler, hemoglobinin yanı sıra çeşitli yapısal proteinleri, enzimleri, lipitleri, karbonhidratları içerirler ve bunların çoğu tahlil reaktifleriyle yarışmaya veya etkileşime girerler (32). Oksihemoglobinin

absorbe olduğu dalga boylarının birinin yerini tutan 540 nm de azobilirubin ölçüldüğü için bilirubin tayini üzerine hemoglobinin etkisi paradigmatik bir örnektir.

Hemolize örneklerde meydana gelen artmış CK konsantrasyonları, reaksiyon şartları altında tamamen inhibe olmayan intrasellüler adenilat kinazın açığa çıkmasını sürdürerek iyi bilinen kimyasal bir interferans olarak açıklanabilir.

Hemolize örneklerde meydana gelen artmış bilirubin konsantrasyonları reaksiyon sürecinde pH değiştiğinde hemoglobin hematine veya methemoglobine dönüşebilmektedir ve ölçülmekte olan bilirubinde, hemoglobin peroksidaz tarafından yıkılmaktadır. Bu yüzden, Jendrassik-Grof yönteminin kullanımı tipik olarak bilirubin konsantrasyonlarını hatalı olarak düşük gösterecektir; çünkü hemoglobinin peroksidaz aktivitesi azo boyası formasyonunu inhibe etmektedir (inhibisyon tipik olarak plazma veya serumdaki serbest hemoglobin'in 80 mg/dL kadar çıktığında gözlenir) (51).

Yalnızca yüksek serbest hemoglobin konsantrasyonları daha düşük serum ürik asit değerlerine neden olur ancak üreaz-katalaz yöntemi (kageyama reaksiyonu) interferansa, üreaz-peroksidaz yönteminden daha duyarlıdır (32).

Örneğin hücreden açığa çıkan hemoglobinin pseudoperoksidaz aktivitesi, diazonium renk oluşumunu engellemesinden dolayı bilirubin ölçümünü bozabilir(8, 24, 31). Örnek üzerinde klinik açıdan anlamlı bir sapmaya neden olan serbest hemoglobin eşik değerleri Tablo 5'de verilmiştir (24). Parametrelerin hemolizden etkilenme şekilleri Tablo 6'da verilmiştir (31).

Tablo 5. Örnekte klinik açıdan anlamlı bir sapmaya neden olan serbest hemoglobin eşik değerleri (24).

Hafif hemoliz (30 – 60 mg/dL)	• Potasyum • Amino transferazlar • Laktat dehidrogenaz
Orta derecede hemoliz (60-200 mg/dL)	• Kardiyak belirteçler • β-human koryonik gonadotropin (β-hCG) • Glukoz • Kreatin kinaz • Protrombin zamanı (PT) • Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT)
İleri derecede hemoliz (≥ 200 mg/dL)	• ALP • ALT • CK • GGT • Demir • Magnezyum • $\text{PO}_4^{=}$

Tablo 6. Parametrelerin hemolizden etkilenme şekli (31).

PARAMETRE	YORUM
Aspartat aminotransferaz (AST)	Eritrositlerdeki AST aktivitesi plazmadakinden 40 kat daha yüksektir. Normal referans aralıklarında AST aktivitesine sahip hastalarda örnekte 150 mg/dL düzeyinde bir hemoliz olduğunda AST aktivitesi yüksek çıkar.
Bilirubin	Jendrassik-Grof yöntemi kullanılırsa yalancı düşük değerler elde edilir, çünkü hemoglobinin pseudoperoksidaz aktivitesi, azo boyasının oluşumunu inhibe eder. Bu inhibisyon, serum serbest hemoglobin konsantrasyonu 80 mg/dL'nin üstündeyse meydana gelir.
Kreatin kinaz (CK)	Eritrositteki adenilat kinazın açığa çıkması, enzimatik olarak ölçülen CK ve CK-MB düzeylerini arttırmaktadır. Kimyasal tepkime karışımına eklenen adenilat kinaz, AMP ve diadenozinpentafosfat ile inhibe olmamaktadır. Burada sonuç olarak ölçüm sinyalinde bir artış meydana gelmektedir.
Demir	Hemoglobin büyük bir demir kaynağıdır. Bununla birlikte ortama katılan demirin etkinliği anlamlı olmamaktadır. Çünkü demir-porfirin bağlanması, demir-transferrin bağlanmasından daha kuvvetlidir ve demir ölçümü için kullanılan yöntemler sadece transferrinden serbestleşen demiri ölçmektedir.
Total protein	Hemoglobinin total protein ölçümüne etkisi küçük, ama anlamlıdır.
Ürik asit	Sadece yüksek hemoglobin konsantrasyonlarında düşük çıkar. Ürikaz-katalaz yöntemi (Kageyama reaksiyonu), interferansa, ürikaz-peroksidaz yönteminden daha duyarlıdır.
Potasyum	Kırmızı hücrelerdeki potasyum konsantrasyonu, plazmadan yaklaşık 25 kat daha fazladır. İn vitro hemoliz gözlemlenebilir olmasa da potasyum miktarında artış ortaya çıkar.
İnorganik fosfat	Kan hücrelerinde yüksek oranda fosfat bulunur, ama büyük kısmı organik bileşiklere bağlıdır. Serumda organik fosfat esterlerinin eklenmesi sonucunda inorganik fosfat salınımı meydana gelebilir ve böylece yalancı yüksek fosfat düzeyleri ölçülebilir. Bu nedenle serum, hücrelerden 2 saat içinde ayrılmalıdır.
Serum protein elektroforezi	Hemoglobin-haptoglobin kompleksleri alfa2 ve beta globin bantları arasında bant vermektedir. Serbest hemoglobin ise beta-globin fraksiyonunda diffüz kırmızı bir bant olarak görülür.
İmmünoassayler	İmmünoassayler, kit üreticileri tarafından interferans açısından değerlendirilmektedir. Üreticiler bu değerlendirmelerde örneklerle çoğunlukla sadece hemoglobin (çoğunlukla insan methemoglobini) eklemektedir. Fakat kan hücreleri hemoglobinin yanında immünoassayleri bozacak daha başka maddeler de içermektedir. Bu nedenle üreticilere tam bir hemoliz testi yapıp yapılmadığı sorulmalıdır.

2.8. Klinik Laboratuvarlarda Hemolize Örneklerin Tespiti

Hemoliz (*in vivo* veya *in vitro*) santrafüj ile kan şekilli elemanlarından (eritrosit, lökosit, trombosit) ayrıldıktan sonra görsel inceleme ile tespit edilebilir (6). Hemoliz ikterik olmayan örneklerde serum veya plazmanın kırmızı renkli olmasıyla anlaşılır. Eğer serbest hemoglobin konsantrasyonu 30 mg/dL'nin üzerindeyse hemoliz gözle

farkedilebilir. Bu konsantrasyonun altındaki serbest hemoglobin tespiti ise immünelometre (46) ya da spektrometre ile mümkün olmaktadır (31). Gözle değerlendirme zaman alıcı, yüksek oranda sübjektif ve standartlaştırmaya elverişsizdir (52). Hemolize olmuş serum örneklerinin gerçek prevelansının düşük veya yüksek gösterilmesinden dolayı yeterince güvenilir değildir. Eğitimli gözlemcilerin bile serumdaki yanlış ölçümün derecesini tespit edememektedirler. Yüksek bilirubin konsantrasyonu, görsel olarak hemolizi tespit etme yeteneğini daha da azaltmakta ve bu yüzden yüksek bilirubin konsantrasyonunun yaygın olduğu yerlerde, yenidoğanlardan alınan örneklerde hemoliz olasığının ciddi ölçüde hafife alınmasına neden olmaktadır.

Ana Maria Simundic ve ark. tarafından yapılan çalışmada lipemik, ikterik ve hemolizli örneklerin tespitinde görsel inceleme ve otomatize spektrofotometri kullanımının uyumu değerlendirilmiştir. Sonuçta lipemi, ikter ve hemoliz gibi interferans kaynaklarının tespitinde görsel değerlendirmenin otomatize değerlendirmelere göre daha fazla hataya neden olduğunu gözlemişlerdir. Gözlemciler arasındaki değerlendirme uyumunun düşük olması, standart operasyon prosedürleri ve renkli skalalar kullanılsa bile insan gözünün örneklerin rengi ve türbiditesi hakkında doğru ve tekrar edilebilir değerlendirmeler yapamadığı tespit edilmiştir (52). Laboratuvar tekniğindeki yeni gelişmeler, çeşitli preanalitik süreçlerin uzun aşamalardan, otomasyona doğru artan bir eğilimi göstermektedir. Yeni otomatize tahlil cihazları ile birlikte bazı gelişmelerde, serum içeriğini otomatik olarak sunmaktadır (53). Modern biyokimya otoanalizörlerinde hemolizli örnekleri tespit edebilecek donanımlar bulunmaktadır (24, 52). Serum indeksleri (hemoliz indeksi) içeren değerlendirmeler daha yeni yaklaşımlardır (24).

Bazı otomatize cihazlar, otomatik olarak HI (hemoliz indeksi) tespit eden sistemler içermektedirler.

Bu sistemler interferansla alakalı kabul edilebilir tablolar baz alınarak serum veya plazmadaki serbest hemoglobin hızlı bir şekilde spektrofotometrik ölçümünü içerir. Son çıktı örnekteki serbest hemoglobin konsantrasyonunun kantitatif (konsantrasyon) veya semikantitatif (değer) ölçüsüdür. Bu da düşük kalitedeki örnekten etkilenmesi muhtemel sonuçları laboratuvar profesyonelliği ile tanımlanmasına olanak sağlaması ile analitik spesifik eşik değerleri tanımlayabilir (6).

Bu yaklaşım görsel incelemenin ötesinde bazı avantajlar taşır, standardize olduktan sonra çok hafif ve hafif hemolizli örneklerin tespit kalitesi artırır ve test sonuçlarının

güvenirliliği artırır (14,53). Hemoliz indeksi preanalitik kalitenin bir ölçüsü olarak kullanılabilir (24).

Farklı üretici firmalar arasında yöntem açısından değişiklikler bulunabilir, ancak genel olarak tümü mg/dL birimine karşılık gelen hemoliz ünitesindeki hemoglobin konsantrasyonu şeklinde bildirilen hemoliz indeksine dayanmaktadır (6).

$$1 \text{ mg/dL} = 1 \text{ HI} = 0.621 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

Bu ilişkinin 1000 mg/dL'ye kadar lineer olduğu belirtilmiştir (54). Serum indeksinin tespitindeki test prensibi; serum ve plazma numunelerinde bulunan hemoliz, lipemi ve ikter seviyelerinin yarı-kantitatif bir gösterimini sağlamak için seyreltilmiş numunelerin farklı bikromatik dalgaboyu çiftlerinde absorbans ölçümlerinin hesaplanmasına dayanır (55). Pek çok vakada serum endikatörlerinin sınırları firma tarafından tanımlanmaktadır. Ancak bu durum örnekte bakılabilecek her bir testin sonuçlarının belirli bir interferans düzeyinden nasıl etkilenebileceği laboratuvarlar tarafından da modifiye edilebilir (14).

Serum indekslerinin tayin edilmesinden sonra otoanalizör her bir test uygulanmasında verilen H, I ve L sınırları ile karşılaştırır. Bu sınırların altındaki değerlerde olan olası bir interferansın klinik olarak önemi yoktur.

Ölçülen değerler her bir test için belirtilen sınırlardan daha yüksekse, analizör ölçülen sonuçlar için alarm verir: Bir indeks değeri hangi parametrenin sınırından yüksek ise ilgili parametrenin yanına yüksek indeks uyarısı alınır.

Bunun kullanıcı için faydası: parametre interferanstan etkilenmişse indeks seviyesinin prospektüsten manuel olarak kontrol edilmesi gerekli olmayacak ve numunenin kalitesi, numune çalışırken aynı anda değerlendirilmiş olacaktır (20). Her rapor numunenin görünümünü belirten not içermelidir.

2.9. Hemolize Örneklerin Yönetimi

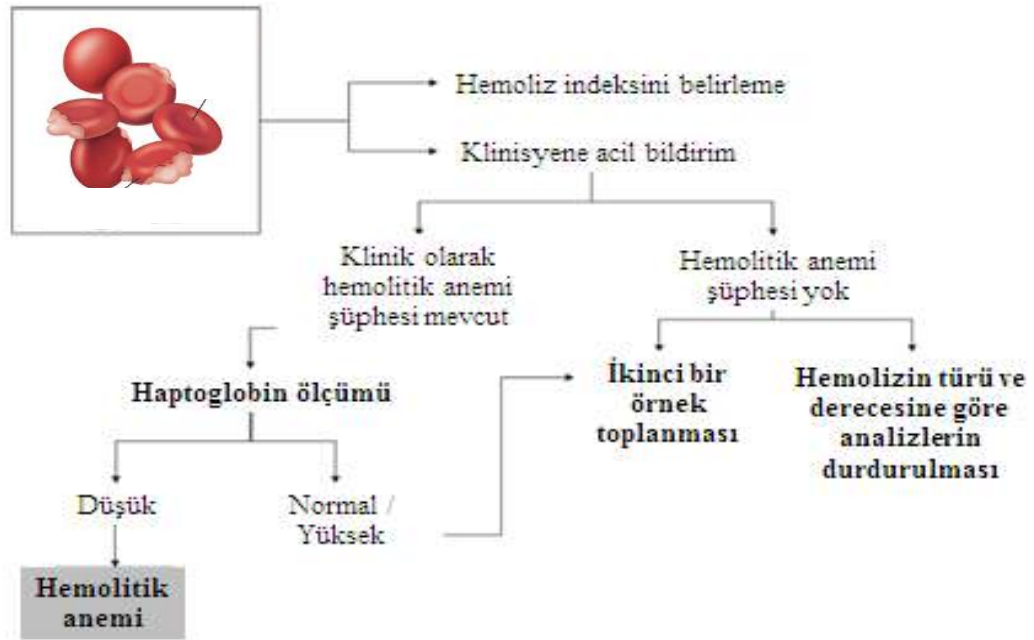
In vitro hemoliz, çoğunlukla uygunsuz örnek alımı, taşınımı ve işlenmesi sebebiyle geliştiğinden pek çok durumda önlenabilir özelliktedir. Ancak hemolitik örneklerin insidansında, flebotomi uygulamasının laboratuvar dışı personelini tarafından uygulanması sebebiyle artış görülmektedir. Bu sebeple örnek alınması ve gönderilen örneklerin

değerlendirilmesine yönelik rehberler ve öneriler şarttır. Flebotomistlerin uygun şekilde eğitimi ile birlikte, laboratuvar testlerinde hemoliz tarafından oluşturulan interferans türü hususunda da bilgilendirmek gereklidir (6).

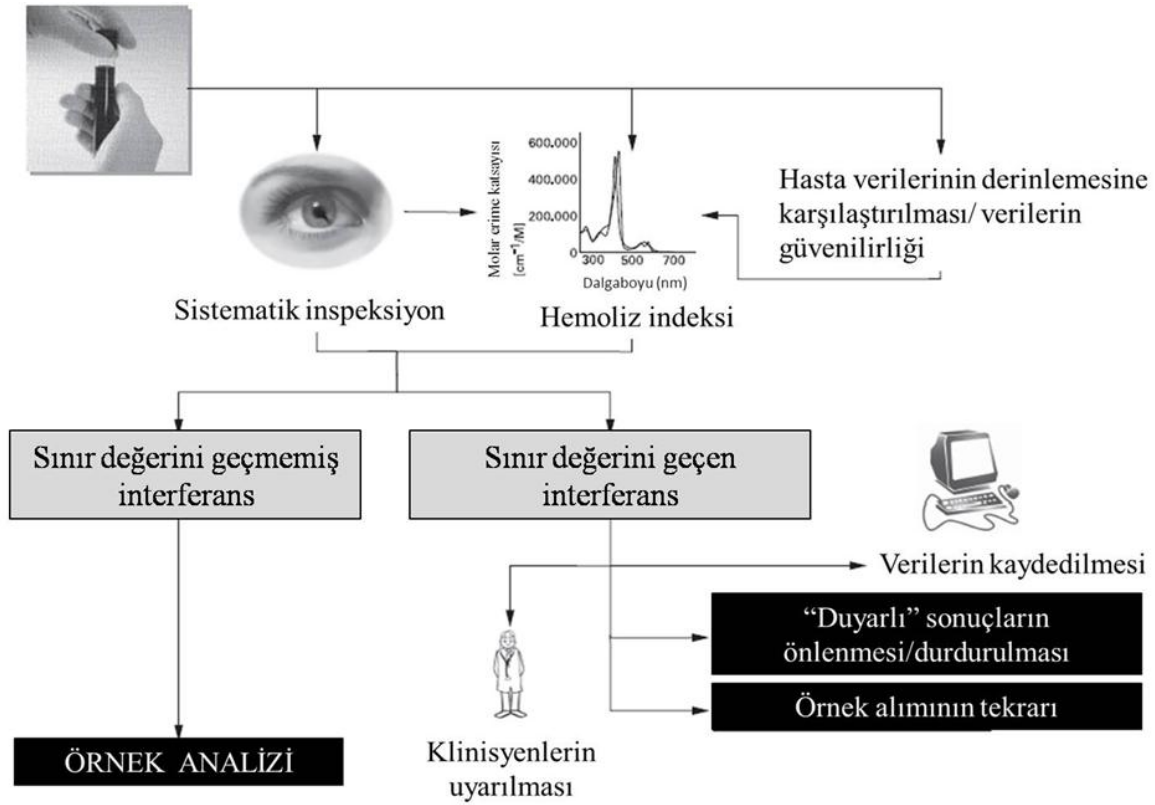
İkinci adımda laboratuvardaki spesifik hemolizli numunelerin tanımlanması ve özellikle test sonuçlarını etkilemesi muhtemel olan hemoliz düzeyini belirlenmesidir. Bu teknolojinin uygulanması pek çok sebepten ötürü önerilir; bu sayede hemoliz düzeyinin görsel olarak değerlendirilmesinin getirdiği kısıtlamaları bertaraf etmeye yarar sağlamakta, hafif düzeyde hemolitik örneklerin (serum hemoglobini 60 mg/dL) tanınmasını kolaylaştırmakta ve aynı laboratuvar ve farklı bölümlerdeki operatörlerin davranışlarını standartize etmektedir.

Hemolizli örneklerin idaresi laboratuvar çalışanlarının zamanını alır ve en aza indirilmesi mümkün olmayan potansiyel bir sorundur (28).

Hemolize örneklerin eskiden yönetimine ilişkin örnek bir strateji Şekil 5’de verilmiştir (24). Hemolize örneklerin Hemoliz indeksi ile yönetimine ilişkin örnek bir strateji Şekil 6’da verilmiştir (23).



Şekil 5. Hemolize örneklerin yönetimi (24).



Şekil 6. Hemolize örneklerin HI ile yönetimi (23).

Hemolitik örneğin tanımlanmasından sonra üç potansiyel yaklaşım önerilmektedir.

1. Test sonuçlarının hemoliz sebebiyle gelişen potansiyel interferans endikasyonu ile rapor edilmesi
2. Hemolizin derecesine göre veri düzeltilmesi
3. Hekimi uyarma ve yeniden örnek talebi (6).

1. Test sonuçlarının hemoliz sebebiyle gelişen potansiyel interferans endikasyonu ile rapor edilmesi

Hemolizin derecesine göre (HI ile hesaplanan) tahmin edilen analit konsantrasyonunun verilmesi ya da hemolize bir örnekten elde edilen sonucun basitçe belirtilmesi ve buna bağlı olarak analitik ve biyolojik interferansın belirli bir derecesine ait hatanın olabileceğini açıklayarak laboratuvar sonucuna eşlik eden bir yorumla verileri bildirmektir. Sonraki aşamada sonuçlara bazı uyarı veya alarm işareti eşlik edebilir.

Hemolitik örneklerin % 97-98 kadarı *in vitro* hemoliz kaynaklıdır, bu örneklerden elde edilen laboratuvar verileri hatalı olabilmektedir. Uygunsuz örneklerden elde edilen

laboratuvar verilerinin bildirilmediği Dünya Sağlık Örgütü ve İtalyan Laboratuvar Tıp SIBioC ve SIMeL Birliklerinin yayınladıkları önerilerde bulunmaktadır. Laboratuvar bildirimlerinde açıklayıcı bir yorumun, özellikle acil ve yoğun bakımda sıklıkla göz ardı edilebilmektedir. Direkt bildirim hastanın sorumluluğundaki sağlık çalışanlarını uyarmada oldukça etkilidir. Sonuç olarak, laboratuvar bildirimleri de dahil uygunsuz örneklerden elde edilen laboratuvar verileri, kalıcı olarak Laboratuvar Bilgi Sistemi (LIS) veritabanında depolanmakta ve hasta verilerinin dikey olarak karşılaştırılmasında yanıltıcı ve güvenilir bilgilerin gözden geçirilmesine neden olmaktadır (23).

2. Hemolizin derecesine göre veri düzeltilmesi

Hemoliz interferansı ile başa çıkmanın ilk yolu hemolizden daha az etkilenen analiz yönteminin tercih edilmesidir. Ardından, analitik interferansın baskılanması tahlil öncesi hazırlık boş örnek ölçümü ve çoklu dalga boyu analizi ile spektral interferansların düzenlenmesi mümkündür. Analitik interferansın belirli bir derecesi henüz elimine edilmiştir, bu yaklaşım son konsantrasyonun hücre içi kaçak veya dilüsyonel etkilerle etkilendiği analitlerin sonuçlarını bildirmede uygulanamaz (23). Uygunsuz örneklerden klinik olarak kullanışlı bilgiyi sağlamak amacıyla etkilenen sonuçlar düzeltilebilir. Örneğin yalancı hiperkaleminin hemoliz düzeltilmesi açısından kurallar ve düzeltme katsayıları tanımlanmıştır. Bu düzeltme hesabı yapılırken öncelikle her analit için serbest serum hemoglobin konsantrasyonu ve gözlenen sonuç sapması arasında lineer regresyon analizi yapılır ve ortaya çıkan regresyon çizgisinin eğimi ile örnekteki serbest serum hemoglobinin miktarı çarpılarak düzeltme katsayısı hesaplanır. Hipotetik olarak, düzeltilmiş hesaba göre alınan serum potasyum düzeyi referans sınırlar içindeyse yeni bir örnek almak gerekli değildir. Hatta bazı sistemler hemolitik örnekleri baştan test edip bu hesaplamaları yaparak düzeltilmiş sonuçları otomatik olarak verebilmektedir (5).

3. Hekimi uyarma ve yeniden örnek talebi

Hemolizin, bilirubin ve lipid gibi diğer interferan maddelerin artmasıyla maskelenmediği örneklerde görsel tespitle hemoliz derecesi yanlış yorumlanabileceğinden hemolizin niceliği (tercihen HI'nin otomatik tahminini kullanılarak) tespit edilmelidir (23).

Diğer bir yaklaşımda hafif hemolizin bir çok test değeri üzerine ihmal edilebilir (klinik) etkileri olduğu ana fikrine bağlıdır. Bu yüzden hemolizin derecesi biyolojik veya analitik interferansın eşik değerini oldukça aşıyorsa, uygunsuz örnekler sistematik bir biçimde kayıt altına alınmalıdır.

Sonraki adımda, özellikle hemolitik anemiden büyük ölçüde şüphelenildiğinde laboratuvar personeli ve klinisyenler arasında iyi bir irtibatın sağlanmış olmasıdır. Bu husus, altta yatan nedenin çoğunlukla yaşamı tehdit eden bir hastalığın güvenilir bir biçimde tanımlanmasını ve hızlı bildirimi için son derece önemlidir. Eş zamanlı olarak hemolizin varlığına ve/veya kapsamına göre etkilenen bütün testler baskılanmalı / durdurulmalı (cihaz veya yönetimin lokal tedbirlerine göre) ve laboratuvar personeli yeni bir örnek istemelidir. İkinci örneğin hemolitik olup olmadığına bağlı olarak hastanın intravasküler hemolizden yakındığı hipotezinin reddi veya doğrulanmasına izin verdiği ve karşıabilir HI (hemoliz indeksi) sunduğu için, yeni bir örnek istem uygulaması daha faydalıdır (23).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Biyokimya Otoanalizör (ROCHE COBAS 8000)

Otomatik Kan Sayım Cihazı (Beckmann Coulter LH 750)

Santrifüj (EPPENDORF 5810)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Analizler ve Metodları

ALP Kiti , PNP AMP buffer

ALT Kiti, UV without P5P

AST Kiti, UV without P5P

D.BIL Kiti, Diazo yöntemi

T.BIL Kiti, Diazonyum iyon yöntemi

CK Kiti, UV NAC activated

CK-MB Kiti, İmmunolojik yöntem

GGT Kiti, δ -glutamil-3karboksil-4nitroanilide

DEMİR Kiti, Ferrozine yöntemi

LDH Kiti, Piruvat $\xrightarrow{uv}$ Laktat

İnorganik fosfat Kiti, Molibdat UV

ISE Kiti, ISE İndirekt yöntem

Serum İndeks Kiti

3. 2. Metod

3.2.1. Deneyin Planlanması ve Çalışılması

Bu çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi, klinik biyokimya laboratuvarında 2012-80 nolu etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Bu çalışma retrospektif ve prospektif kısımları olan bir araştırmadır.

Retrospektif aşamasında hastanemiz Klinik Biyokimya Laboratuvarından 31.01.2011-31.12.2011 tarihleri arasında poliklinik ve servis bazında laboratuvarımıza gelen numunelerin H.I (Hemoliz indeks) değerlerine Laboratuvar İşletim Sisteminin (LİS) istatistik programından ulaşılmış ve buna göre servis ve polikliniklere ait hemoliz indeks dağılımı belirlenmiştir.

3.2.1.1. Preatalitik Yaklaşım

Alınan verilere göre Hemoliz indeks dağılımı yüksek olan üç servis pilot bölge olarak belirlenmiştir. Bunlar; Acil servis, Göğüs hastalıkları servisi ve Dermatoloji servisi. İlgili servislerde kan alan personele, genel bilgiler kısmındaki Tablo 4’de belirtilen kurallar çerçevesinde hemolizi etkileyen ve önleyen faktörleri içeren eğitim verilip düzeltici önlemler alınmıştır. Eğitim sonrası döneme ait 16.04.2012- 30.08.2012 tarihleri arasında ilgili servislerden laboratuvarımıza gelen numunelerin HI değerlerine Laboratuvar İşletim Sistemi (LIS) istatistik programından ulaşılmıştır.

3.2.1.2. Analitik Yaklaşım

CLSI, EP7A, IFCC ve C56-A protokolleri çerçevesinde yapılmıştır. Çalışmamızın ikinci kısmı olan *in vitro* hemoliz çalışması ile hemolizin etkilediği bazı testler için sınır eşik değerlerin belirlenmesi, belirgin etkileşimlerin tespiti hemoliz indeks kullanılarak belirlenmiştir. Rutin klinik kimya laboratuvarına gelen kan örnekleri bu amaçla değerlendirilmiştir.

3.2.2. Hemolizat Hazırlanması

Lippi ve ark. uyguladıkları yöntem modifiye edilerek hemolizat hazırlandı (56). Toplam 6 ml EDTA' lı tüpe alınan kan örneği 3000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek plazması ayrılarak atıldı. Dipte kalan hücre paketi 8 ml serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve her yıkama işlemi sonrası 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Son yıkamayı takiben santrifüj edilip yıkama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra yıkamış eritrosit paketi üzerine eşit hacimde distile su ilave edildi. Distile su ilave edilen hücre paketi -20°C'de 30 dakika bekletilerek eritrositlerin patlaması ve hemoliz olmaları sağlandı. Örnekler 3000g'de 10 dakika santrifüj edilip üstte kalan hemolizat ayrıldı (5). Elde edilen hemolizatın hemoliz indeks değeri tespit edildi.

3.2.3. Biyokimyasal Parametreler

Laboratuvarda kullanım dışı kalmış kan numunelerinden biyokimyasal olarak normal sınırlardaki, sağlıklı görünen örneklerden toplam 25 ml serum havuzu elde edildi. Hazırlanmış olan hemolizattan her bir serum havuzuna HI'i 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 olacak şekilde hesaplanarak eklendi. Aşağıdaki serum parametreleri aynı gün ardışık üçer kez çalışıldı.

Serum alkalin fosfotaz (ALP), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), direkt bilirubin (D.BIL) ,total bilirubin (T.BIL), kreatin kinaz (CK), CK-MB, gama glutamil transferaz (GGT), demir (IRON) , laktat dehidrogenaz (LDH), inorganik fosfat ($PO_4^{=}$) , potasyum (K^+) , serum indeksi (SI) tayinleri Roche Cobas 8000 otoanalizöründe kendi orijinal reaktifleri ile yapıldı.

Hemoglobin analizi için Beckman Coulter LH 750 tam kan sayım analizörü kullanıldı.

Otoanalizörlerde tayin edilen tüm parametreler günlük kalite kontrol uygulamalarının ardından gerçekleştirildi.

Hemolizin parametrelere etkisi Fraser'a göre hata ölçüleri (57) ve CLIA 88 (58) kriterleri kullanılarak değerlendirildi.

Serum indeks tayin prensibi: Analizörler, hemoliz için 570 nm (birincil dalga boyu) ve 600 nm (ikincil dalga boyu), lipemi için 660 nm (birincil dalga boyu) ve 700 nm (ikincil dalga boyu), ikter için 480 nm (birincil dalga boyu) ve 505 nm (ikincil dalga boyu)

absorbansları ölçmek üzere hasta örneklerinden bir kısım alır ve salin (% 0.9 sodyum klorür) içinde seyreltilir. Hesaplama formülleri spektral çakışmanın telafi edilmesine yönelik düzeltmeleri içerir. Bu absorbans değerlerinden biyokimya otoanalizörüyle aşağıdaki faktörler kullanılarak serum indeks değerleri hesaplanır:

A= 25 (geleneksel birimler) veya 40 (uluslararası birimler)

B= 122000 (geleneksel veya uluslararası birimler)

C= 9 (geleneksel veya uluslararası birimler)

D= 1400 (geleneksel birimler) veya 82 (uluslararası birimler)

E= 19000 (geleneksel veya uluslararası birimler)

F= 180000 (geleneksel veya uluslararası birimler)

C, A ve D, yarı-kantitatif etkileşim seviyelerini sağlamak üzere numune dilüsyonu bağlı ve birime bağlı ölçeklendirme faktörüdür. B, E ve F örtüşen etkileşim spektrasını doğru şekle getiren düzeltme faktörleridir. Absorbans oranlarına bağlı oldukları için numune dilüsyonundan bağımsızdırlar. Serum indeksleri geleneksel veya uluslararası birimden birinde progamlanabilir (55). Serum İndeks Gen 2 absorbans ve dalga boyu grafiği Şekil 7’de verilmiştir (55).

$$L = \frac{1}{C} \cdot (Abs_1)$$

$$H = \frac{1}{A} \cdot (Abs_2 - B \cdot Abs_1)$$

$$I = \frac{1}{D} \cdot (Abs_3 - E \cdot Abs_2 - F \cdot Abs_1)$$

L, H, I Lipemi, hemoliz ve ikter için serum indeksleri

C, A, D Serum indeklerinin absorbans değerlerine ($\times 10^4$) dönüştürme katsayısı

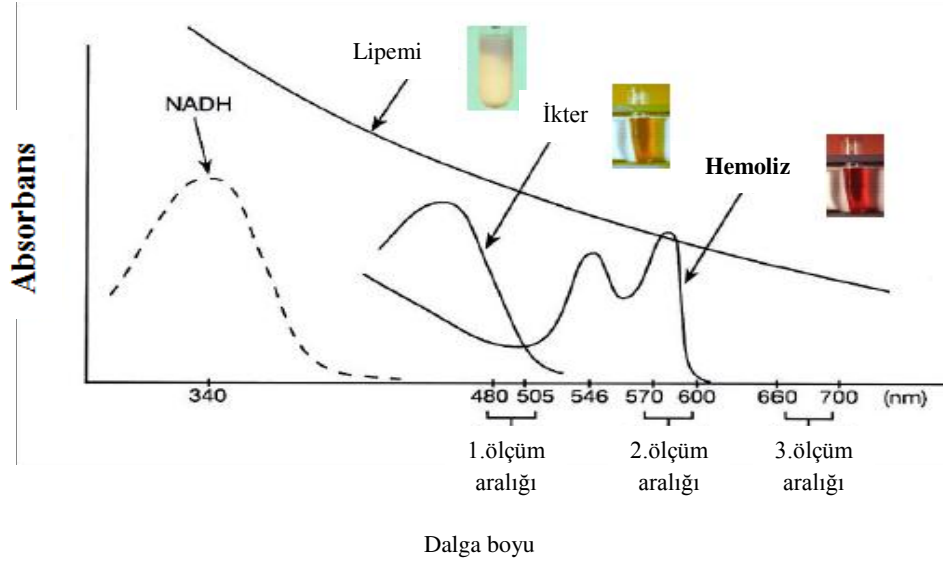
Abs₁ Lipemi için 660 ve 700 nm’de bikromatik absorbans okumaları

Abs₂ Hemoliz için 570 ve 600 nm’de bikromatik absorbans okumaları

Abs₃ İkter için 480 ve 505 nm’de bikromatik absorbans okumaları

B Hemoglobin tayininde lipemi için Abs₂ düzeltme katsayısı

E, F Bilirubin tayininde hemoliz ve lipemi için Abs₃ düzeltme katsayısı



Şekil 7. Serum İndeks Gen 2 absorbans ve dalga boyu grafiği (55).

1. İkter (I), 505/480 nm’de ölçülür ve lipemi ile hemolizden dolayı absorpsiyon için düzeltme yapılır.
2. Hemoliz (H), 600/570 nm’de ölçülür ve lipemiden dolayı absorpsiyon için düzeltme yapılır.
3. Lipemi (L), 700/660 nm dalga boyları kullanılır, çünkü bu aralık hemoliz ve ikterden etkilenmez (55).

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen veriler aritmetik ortalama (X), standart sapma (SD) ve minimum ve maksimum değerler şeklinde ifade edildi. Eğitim öncesi ve sonrası Hemoliz İndeks verilerinin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılıma uymadıkları için Mann-Whitney U testi ile anlamlılıklarına bakıldı. $p < 0.001$ anlamlı olarak kabul edildi. Servislere göre eğitim öncesi ve eğitim sonrası Hemoliz İndeks yüzde değişimlerini belirlemek için ki-kare testi ile anlamlılıklarına bakıldı. $p < 0.001$ anlamlı olarak kabul edildi.

Metodun analitik hassasiyeti varyasyon katsayısı (% CV) hesaplanarak ifade edildi.

$$\% CV = (SD/X) \times 100$$

4. BULGULAR

4.1. Servislerdeki Preanalitik Sürecin Değerlendirilmesi (Preanalitik Veriler)

Flebotomi, yatan hastalar için servislerdeki asistanlar, intörnler, hemşireler tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca laboratuvarımız, ayaktan takip edilen hastalar için hemşireler tarafından flebotominin uygulandığı kan alma birimine sahiptir. Ayaktan takip edilen pediatrik hastalar için pediatri hemşireleri tarafından kan alınan ayrı bir birim daha vardır.

Örnekler, servislerden laboratuvara hem pnömotik sistemle hem de dağıtım personeli (posta) ile ulaştırılmaktadır.

Çalışmamız kapsamında, Göğüs hastalıkları servisi, Dermatoloji servisi ve Acil Servislerdeki flebotomi uygulamalarını belirlemek için kan alan personelle tek tek görüşüldü.

4.2. Servislerin Verileri

Poliklinikler için ortalama HI'ı 8 (0-543) idi. Servisler için bu değerler 39 (0-996) dir. Poliklinik ve servis bazında hemoliz indeks dağılımı Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Poliklinik ve servis bazında hemoliz indeks dağılımı

	n	Median $\pm$ standart sapma	Mean	Min-max
Poliklinikler	86271	7 $\pm$ 25	11	0-952
Erişkin poliklinik	72488	6 $\pm$ 13	8	0- 543
Pediatri poliklinik	13783	16 $\pm$ 51	29	0-952
Servisler	74288	16 $\pm$ 79	39	0-996
Cerrahi servisler	13267	14 $\pm$ 48	26	0-951
Dahili servisler	29110	12 $\pm$ 53	26	0-974
Pediatrik servisler	4510	15 $\pm$ 79	38	0-870
Erişkin yoğun bakım	4009	22 $\pm$ 69	44	0-802
Pediatrik yoğun bakım	3716	47 $\pm$ 162	118	0-996
Acil servis	12983	21 $\pm$ 69	43	0-938
Pediatrik Acil servis	5706	19 $\pm$ 49	31	0-715
Yenidoğan servis	984	175 $\pm$ 247	245	0-996

Poliklinik hastalarında gerçekleştirilen flebotomi ve diğer işlemler optimuma en yakın şartlar olarak değerlendirildiği için poliklinik HI düzeyleri normal ortalama değer olarak alındı ve servis değerleri buna göre belirlendi. Acil servis, Göğüs Hastalıkları ve Dermatoloji servisine gidilerek kan alan personel belirlenerek herbiriyle tek tek görüşülüp preanalitik hata kaynakları değerlendirildi.

İlgili servislerden Dermatoloji ve Göğüs Hastalıkları Servisinde, servis sorumlusu asistanlar tarafından örnekler toplanmaktadır.

Acil serviste intörnler tarafından örnek alımı yapılmaktadır. Acil serviste 2 aylık dönemler ile intörn rotasyonu olmaktadır. 20-25 kişilik gruplar yılda 6 kez değişmektedir. Eğitime başlanılacak dönemde intörn grubu acil servis rotasyonuna başlayalı bir ay olmuştu. İkincil intörn grubuna 2 aylık rotasyonları süresinde eğitim verilebildi.

Hemolitik örneklerin sebepleri incelendiğinde, servislerden kalitesiz örneğe sebep olan en yaygın hatanın, örnek alımında enjektöre çekilen kanın tüplere dağıtımı esnasında iğne ucu çıkartmadan kanın basınçla tüp duvarına çarptırılmasına bağlı olarak örneklerin hemolize uğraması olarak tespit edildi.

Yapılan inceleme sonucunda Dermatoloji ve Göğüs Hastalıkları servisinde örnek toplanmasında enjektör kullanılıyordu ve iğne ucu çıkarılmadan tüplere kanın aktarılması

yapılıyordu. Enjektör yerine vakumlu set veya vakumlu kelebek set kullanılması tavsiye edildi. İlgili servisler enjektör yerine iki uçlu vakumlu kelebek set kullanmaya başladılar.

Acil serviste intörnler kan alırken vakumsuz kelebek set kullanıp kelebeğin uç kısmını enjektöre bağlayıp kan alımını gerçekleştiriyorlardı. Alınan kanın ucuna kelebek seti bağlı olarak enjektörden tüpe boşaltıyorlardı.

Sonuçta, servislere “ hemolizi etkileyen ve önleyen faktörleri” içeren interaktif bir eğitim verildi. Eğitim sonrası dönem acil servis için 16.04.2012- 15.07.2012’dir.

Göğüs hastalıkları ve Dermatoloji için eğitim dönemi 16.04.2012- 28.08.2012’dir. Veriler Tablo 8’de verilmiştir.

HI>100 ve HI>200 numuneler orta ve şiddetli hemolize olan numunelerdir. HI>200’ de çoğu parametre etkilenmekte ve örnek reddini gerektirmektedir. HI>100 ve HI>200 olan numunelerin eğitim öncesi ve eğitim sonrası döneme ait yüzdeleri Tablo 9’da verilmiştir.

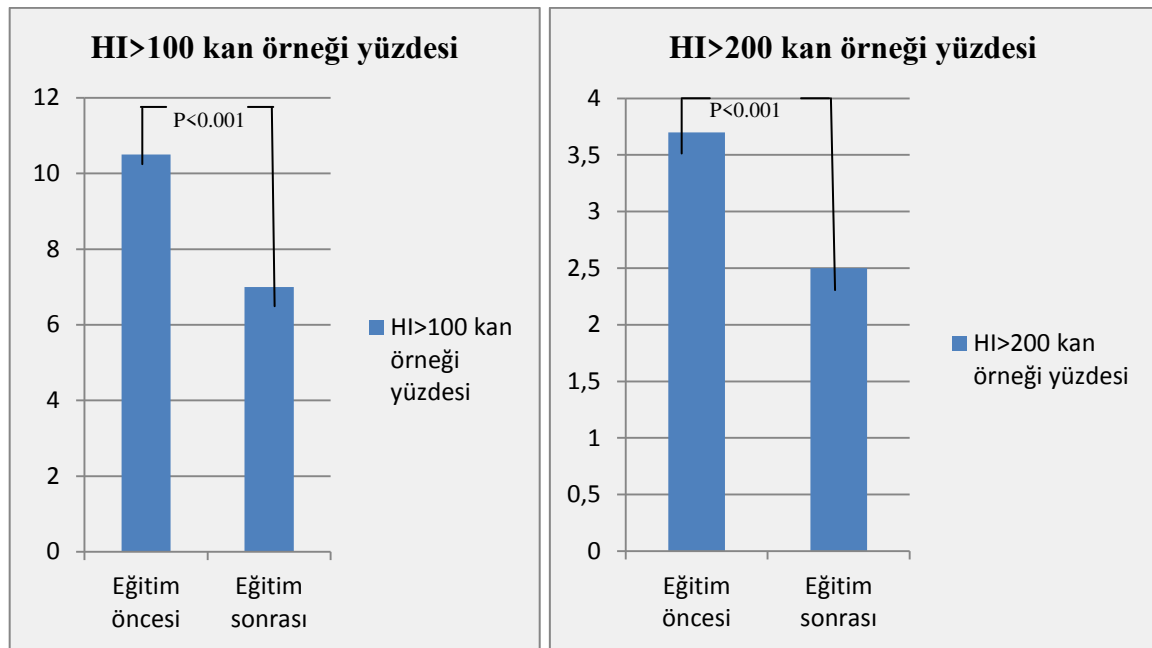
Tablo 8. Eğitim öncesi ve sonrası veriler

Servis	Eğitim öncesi	Eğitim sonrası	P
	Median±standart sapma	Median±standart sapma	
	Mean	Mean	
	(min-max) n	(min-max) n	
Göğüs hastalıkları servisi	18 ± 99 56 (0-919) n = 1521	14 ± 50 29 (0-633) n = 1152	P< 0.001
Dermatoloji Servisi	22 ± 54 38 (0-470) n = 425	15 ± 20 21 (0-168) n = 228	P< 0.001
Acil Servis	21 ± 68 43 (0-938) n = 12983	17 ± 66 36 (0-900) n = 6344	P< 0.001

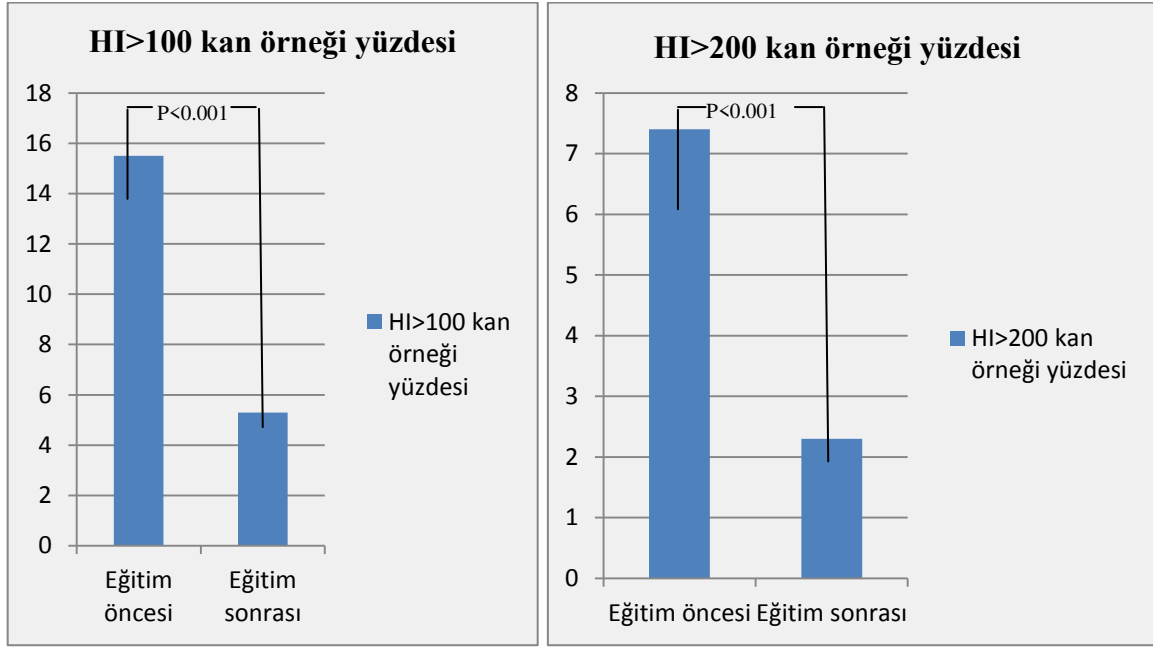
Tablo 9. HI> 100 ve HI>200 kan numunelerin eğitim öncesi ve eğitim sonrası yüzde değişimleri

Servisler	Eğitim öncesi HI>100	Eğitim sonrası HI>100	p	Eğitim öncesi HI>200	Eğitim sonrası HI>200	P
Göğüs hastalıkları Servisi	%15.5	%5.3	P<0.001	%7.4	%2.3	P<0.001
Dermatoloji Servisi	%8	%1.3	P<0.001	%2.1	%0.00	P<0.001
Acil Servis	%10	%7.5	P<0.001	%3.3	%2.6	P<0.001
Toplam	%10.5	%7	P<0.001	%3.7	%2.5	P<0.001

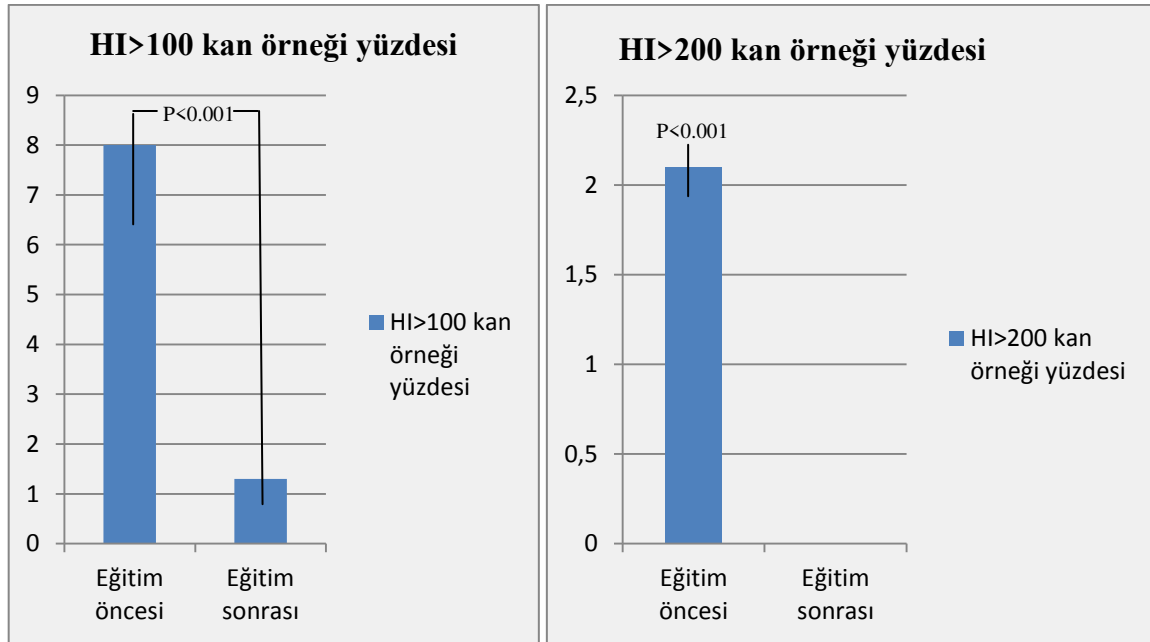
Yüzdelere arasındaki farkı değerlendirmek için ki-kare testi yapılmıştır. Eğitim öncesi ve eğitim sonrası HI>100 ve HI>200 olan kan örnek sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Yüzde değişimleri Şekil 8-11’de verilmiştir.



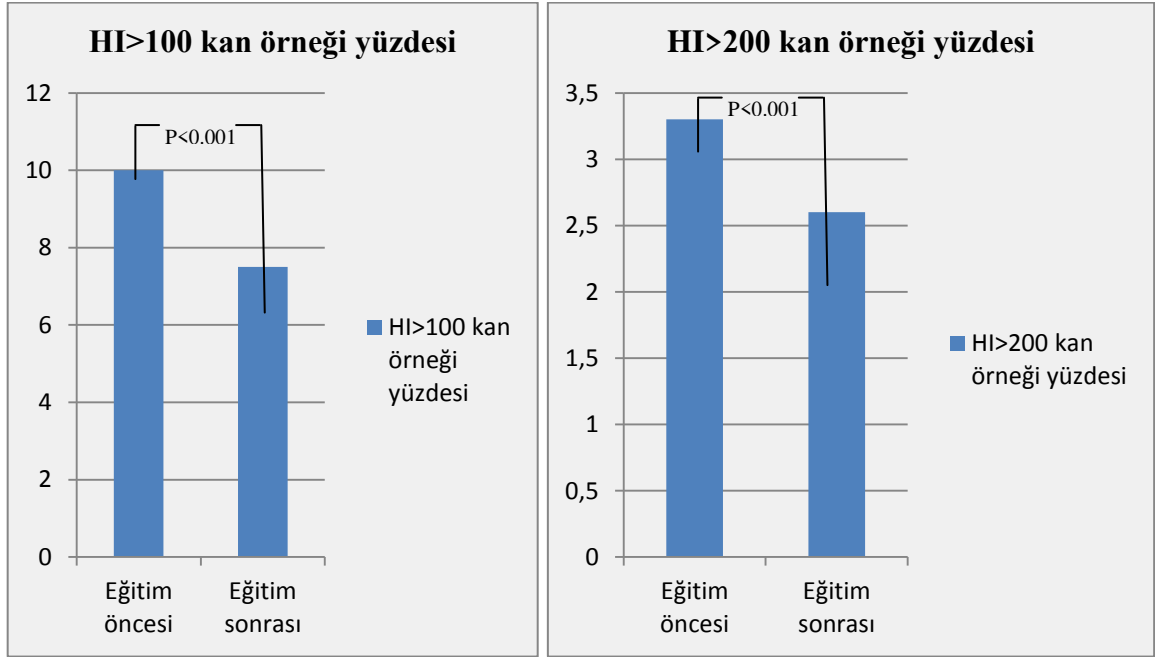
Şekil 8. Toplam üç servisteki HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri



Şekil 9. Göğüs hastalıkları servisi HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri



Şekil 10. Dermatoloji servisi HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri



Şekil 11. Acil servis HI>100 ve HI>200 kan örneği yüzde değişimleri

4.3. Çalışma Yönteminin Performans Verileri (Analitik Veriler)

Serum İndeks ölçümünü yaptığımız yöntemin analitik hassasiyet ve doğruluk değerlendirilmesini 3 seviyede serum havuzu numuneleri ile yaptık. Seviye 1= normal (5), Seviye 2=yüksek (46), Seviye 3=daha yüksek (155). Veriler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Hemoliz İndeksi performans verileri

	n	mean	SD	%CV
ÇALIŞMA İÇİ				
1.seviye	10	4.8	0.4	8.78
2.seviye	10	45.5	0.52	1.5
3.seviye	10	155	2.83	1.8
GÜN İÇİ				
1.seviye	5	5.14	0.37	7.3
2.seviye	5	46.4	0.53	1.1
3.seviye	5	151	3.13	1.9
GÜNLER ARASI				
1.seviye	5	4.8	0.44	9.3
2.seviye	5	44.8	1.09	2.4
3.seviye	5	155	0.54	0.3

SD=standart deviation, CV=coefficient of variation, n=ölçüm sayısı

4.4. Hemoliz İndeks Değerlendirilmesi Sonuçları

Parametrelerin interferans etkisini değerlendirmek için farklı zamanlarda 3 çalışma yapıldı. Seçilen 12 parametrenin hemolizden etkilenim seviyesi belirlendi. Çalışmamız CLSI Tıbbi Laboratuvarlarda EP7-A interferans çalışmalarına göre planlandı.

Bu çalışmada birinci basamağındaki ilk çalışmada HI: 3-98; ikinci çalışmada HI:5-113; üçüncü çalışmada HI: 6-101 arasında AST, D.BIL, T.BIL, CK-MB, K⁺, LDH parametreleri çalışıldı.

İkinci basamağındaki ilk çalışma için HI:102-985; ikinci çalışmada HI: 113-1009; üçüncü çalışmada HI: 101-1037 arasında ALP, ALT, CK, GGT, demir, inorganik fosfat, K⁺ parametreleri Roche Diagnostik Cobas 8000 otoanalizöründe kendi orijinal kitleri ile gerçekleştirildi.

Hemoliz dolayısıyla meydana gelen interferans, ortalama absolü sapma ve relatif sapma yüzdeleri şeklinde ifade edildi. Elde edilen sonuçların kabul edilebilir sapma miktarını Fraser (57) ve CLIA 88 kriterlerine (58) göre belirlendi. Alınan sonuçlar kabul edilebilir sapma miktarından daha fazla sapma gösterdiğinde klinik olarak anlamlılık gösteren değişimlerden bahsedilmektedir.

Çalışmamızda interferans miktarı, örnekteki kan hücre lizatının son konsantrasyonu ile doğru orantılı gibi görünmektedir. Beklediğimiz gibi oluşturulan kan hücre lizatının örneklerle eklenmesi, AST, LDH, K⁺, CK-MB, CK, Demir, inorganik fosfat ölçümlerinde doz bağımlı bir şekilde yükselmeye neden olmuştur, bununla birlikte ALP, ALT, GGT, D.BIL, T.BIL değerlerini lizat bulunmayan düzeyleri ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur.

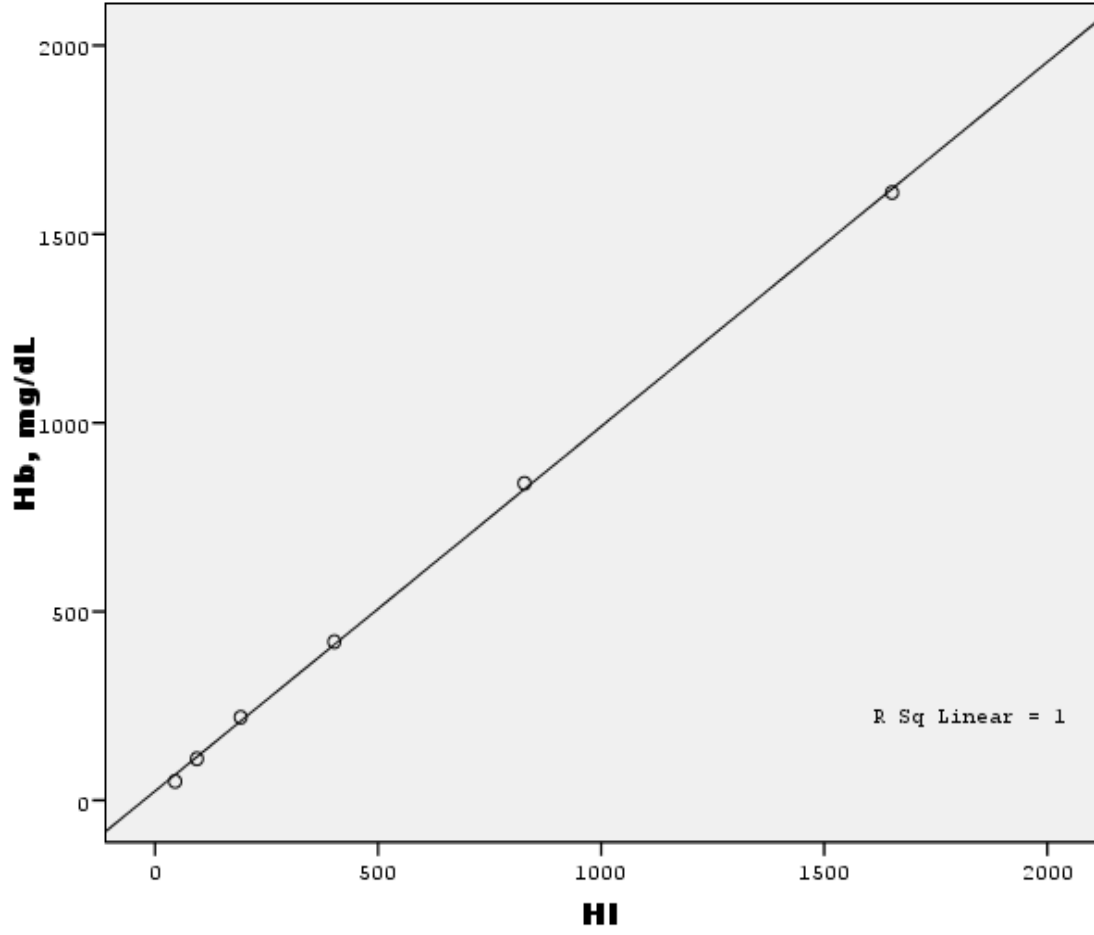
Hafif ve gözle değerlendirilmeyecek düzeyde hemolizi olan örneklerdeki (<60 mg/dL) Fraser'e göre AST, LDH, K⁺, CK-MB seviyelerinde klinik olarak anlamlı değişimler gözlemlendi.

Kreatinin, BUN ve magnezyum parametrelerindeki etkilenim HI 1000 üstünde olduğundan çalışmaya dahil edilmemiştir.

Serumdaki serbest hemoglobin konsantrasyonu ile sonuçlar arasındaki değişimler genellikle lineer ve öngörülebilir şeklinde meydana gelmiştir.

Hemoliz İndeks arttıkça hemolizden kaynaklı interferansın etkisinin arttığı gözlemlendi. Hb (mg/dL) ile HI arasında 1610 mg/dL Hb düzeyine kadar lineer bir ilişki tespit edildi (r =0,999). Hemoglobin ile hemoliz indeks sonuçları korelasyon grafiği Şekil 12'de

verilmiştir. Üç *invitro* hemoliz çalışma sonuçları Tablo 11-13’de verilmiştir. Hemoliz indekse göre parametre değişimleri Şekil 13-14’de verilmiştir.



Şekil 12. Hemoglobin ile hemoliz indeks sonuçlarının kolerasyon grafiği

Tablo 11. 1. *In vitro* hemoliz çalışma sonuçları

Analitler	Fraser ± %	CLIA 88 ± %	% CV n=10	Ortalama ± Standart sapma (% hata)									
				Hemolitik İndeks (HI)									
				Serum havuzu									
				3	16	28	37	48	57	67	78	89	98
AST, U/L	5.4	20	2.8	23±1.0 #	24±0.6 (+4.3)	24±0.6 (+4.3)	24±0.6 (+4.3)	25±1.0 (+8.7)&	25±1.0 (+8.7)	26±0.6 (+13.0)	27±0.6 (+17.3)	27±0.6 (+17.3)	27±0.6 (+17.3)
D.BIL, mg/dL	14.2	-	3.1	0.2±0.0	0.19±0.01 (-5)	0.17±0.01 (-15)&	0.15±0.01 (-25)	0.13±0.01 (-35)	0.12±0.01 (-40)	0.11±0.01 (-45)	0.10±0.01 (-50)	0.08±0.00 (-60)	0.07±0.01 (-65)
T.BIL, mg/dL	10.0	20	4.2	0.58±0.01	0.57±0.01 (-1.7)	0.56±0.01 (-3.4)	0.56±0.02 (-3.4)	0.55±0.01 (-5.2)	0.55±0.01 (-5.2)	0.54±0.01 (-6.9)	0.52±0.01 (-10.3)&	0.51±0.01 (-12.1)	0.5±0.01 (-13.8)
CK-MB, U/L	7.8	3SD	1.0	18.1±1.2	19.4±0.4 (+7.2)	21.3±0.5 (+17.7)&	22.3±0.3 (+23.2)	24.8±0.3 (+37)	25.9±0.7 (+43.1)	27.9±0.4 (+54.1)	30.2±0.3 (+66.9)	31.6±0.7 (+74.6)	33.8±0.6 (+86.7)
K, mmol/L	1.8	0.5 mmol/L	0.9	4.5±0.0	4.66±0.05 (+3.5)&	4.7±0.10 (+4.4)	4.7±0.00 (+4.4)	4.7±0.00 (+4.4)	4.8±0.00 (+6.6)	4.8±0.10 (+6.6)	4.8±0.10 (+6.6)	4.8±0.00 (+6.6)	4.86±0.05 (+8)
LDH, U/L	4.3	20	1.0	340±3.5	365±1.7 (+7.4)&	394±3.2 (+15.9)	407±5 (+19.7)	421±6.2 (+23.8)**	446±4.9 (+31.1)	459±4.6 (+35)	482±7.6 (+41.8)	503±6.1 (+47.9)	523±5.8 (+53.8)

Analitler	Fraser ±%	CLIA 88 ± %	% CV n=10	Ortalama ± Standart sapma (% hata)										
				Hemolitik İndeks (HI)										
				Serum havuzu										
				3	102	205	305	410	519	622	714	822	916	985
ALP, U/L	6.4	30	1.3	85±1.0 #	83±1.2 (-2.4)	78±1.2& (-8.2)	72±0.6 (-15.2)	66±1.2 (-22.3)	61±0.0 (-28.2)	57±0.6 (-32.9)**	53±0.6 (-37.6)	49±0.6 (-42.8)	44±0.0 (-48.2)	44±1.6 (-48.2)
ALT, U/L	12	20	1.7	24±0.0	24±0.6 (0.0)	24±0.6 (0.0)	23±2.5 (-4.2)	23±2.6 (-4.2)	21±3.8& (-12.5)	18±2.6 (-25.0)**	17±3.0 (-27.9)	16±0.7 (-33.3)	15±7.6 (-37.5)	14±1.5 (-41.6)
CK, U/L	11.5	30	1.6	205±1.0	208±1.5 (+1.5)	213±3.1 (+3.9)	217±0.0 (+5.8)	218±0.6 (+6.3)	228±3 (+11.2)	229±0.6& (+11.7)	231±1.5 (+12.7)	240±4 (+17.1)	241±5 (+17.6)	252±2 (+22.9)
GGT, U/L	10.8	30	2.7	23±1.0	21±1.2 (-8.7)	20±1.0& (-13.0)	16±1.5 (-30.0)**	14±1.2 (-39.1)	12±1.0 (-47.8)	10±1.7 (-56.5)	9±1.5 (-60.8)	6±2.5 (-73.9)	6±1.5 (-73.9)	2±1.6 (-91.3)
Demir, mg/dL	8.8	30	1.7	85±0.0	87±0.6 (+2.40)	90±1.6 (+5.88)	93±0.0& (+9.40)	95±0.5 (+11.76)	97±1.7 (+14.11)	102±2 (+20.00)	104±1.5 (+22.30)	106±3.5 (+24.70)	112±2.9 (+31.76)	113±1.5 (+32.90)
K, mmol/L	1.8	0.5 mmol /L	0.9	4.5±0.0	4.9±0.05 (+8.8)&	5.1±0.05 (+13.3)**	5.3±0.10 (+17.8)	5.5±0.05 (+22.2)	5.8±0.05 (+28.8)	6.1±0.05 (+35.5)	6.3±0.15 (+40.0)	6.5±0.05 (+44.4)	6.7±0.10 (+48.8)	6.9±0.05 (+53.3)
PO4, mg/dL	3.2	10	0.9	3.53±0.03	3.59±0.01 (+1.70)	3.61±0.02 (+2.30)	3.63±0.01 (+2.83)	3.64±0.01 (+3.11)	3.66±0.03 (+3.68)&	3.68±0.03 (+4.20)	3.73±0.04 (+5.60)	3.73±0.01 (+5.66)	3.76±0.03 (+6.51)	3.8±0.05 (+7.64)

Sonuçlar ölçülen değerlerin ortalaması olarak verilmiştir.

& Fraser'a göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir.

** CLIA kriterlerine göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar renkli olarak gösterilmiştir.

Tablo 12. 2. *İn vitro* hemoliz çalışma sonuçları

Analitler	Fraser ± %	CLIA 88 ± %	% CV n=10	Ortalama ± Standart sapma (% hata)									
				Hemolitik İndeks (HI)									
				Serum havuzu									
				5	27	38	48	58	68	80	90	101	113
AST, U/L	5.4	20	2.3	25±0.57 #	25±0.57 (0.0)	25±0.00 (0.0)	26±1.15 (+4)	27±1.52 (+8)&	27±0.57 (+8)	27±1.00 (+8)	27±0.57 (+8)	28±1.00 (+12)	29±0.57 (+16)
D.BIL, mg/dL	14.2	-	1.8	0.18±0.0	0.16±0.0 (-11.1)	0.15±0.0 (-16.6)&	0.14±0.0 (-22.2)	0.10±0.0 (-44.4)	0.10±0.0 (-44.4)	0.08±0.0 (-55.5)	0.08±0.0 (-55.5)	0.07±0.0 (-61.1)	0.06±0.0 (-66.6)
T.BIL, mg/dL	10.0	20	2.1	0.47±0.01	0.46±0.03 (-2.10)	0.46±0.02 (-2.10)	0.44±0.02 (-6.38)	0.44±0.02 (-6.38)	0.44±0.02 (-6.38)	0.44±0.02 (-6.38)	0.41±0.02 (-12.70)&	0.4±0.03 (-14.80)	0.39±0.02 (-17.00)
CK-MB, U/L	7.8	3SD	2.1	17±0.36	19.8±0.25 (+16.4)&	21.8±1.02 (+28.2)	22.6±0.34 (+32.9)	24.5±1.20 (+44.1)	26.2±0.05 (+54.1)	27.8±1.50 (+63.5)	30±0.79 (+76.4)	30.9±2.10 (+81.7)	33.7±0.97 (+98.2)
K, mmol/L	1.8	0.5 mmol/L	1.2	4.5±0.05	4.5±0.06 (0.0)	4.5±0.06 (0.0)	4.5±0.06 (0.0)	4.5±0.06 (0.0)	4.6±0.00 (+2.2)&	4.6±0.00 (+2.2)	4.7±0.06 (+4.4)	4.7±0.06 (+4.4)	4.7±0.06 (+4.4)
LDH, U/L	4.3	20	1.0	429±4.36	476±3.06 (+10.9)&	495±0.03 (+15.3)	514±3.79 (+19.8)	533±9.50 (+24.2)**	550±1.73 (+28.2)	575±1.53 (+34)	588±3.06 (+37)	616±3.06 (+43.5)	635±4.90 (+48)

Analitler	Fraser ±%	CLIA 88 ± %	% CV n=10	Ortalama ± Standart sapma (% hata)										
				Hemolitik İndeks (HI)										
				Serum havuzu										
					5	113	210	320	431	543	645	737	852	956
ALP, U/L	6.4	30	2.5	79±2.0 #	78±1.15 (-1.2)	73±1.00 (-7.6)&	66±0.57 (-16.4)	60±2.08 (-24.0)	55±2.80 (-30.3)**	53±0.57 (-32.9)	48±0.57 (-39.2)	44±0.00 (-44.3)	40±0.57 (-49.3)	38±0.57 (-51.8)
ALT, U/L	12	20	2.1	26±0.57	26±0.00 (0.0)	26±1.00 (0.0)	24±0.57 (-7.6)	24±1.52 (-7.7)	23±0.57 (-11.5)	23±2.30 (-11.5)	22±0.57 (-15.4)&	22±3.05 (-15.4)	18±0.57 (-30.8)**	18±0.57 (30.8)
CK, U/L	11.5	30	1.3	121±1.52	126±1.52 (+4.1)	131±0.57 (+8.2)	140±1.73 (+15.7)&	142±2.08 (+17.3)	149±2.08 (+23.1)	152±2.00 (+25.6)	161±3.78 (+33.0)**	167±2.51 (+38.0)	171±3.05 (+41.3)	174±2.64 (+43.8)
GGT, U/L	10.8	30	1.0	26±0.0	26±1.00 (0.0)	22±1.73 (-15.3)&	19±2.08 (-26.9)	18±4.35 (-30.7)	16±2.08 (-38.4)**	14±4.00 (-46.1)	14±2.65 (-46.1)	14±3.61 (-46.1)	8±4.36 (-69.2)	6±6.11 (-76.9)
Demir, mg/dL	8.8	30	0.6	93±0.58	94±0.58 (+1.1)	95±1.15 (+2.1)	97±0.58 (+4.3)	98±2.60 (+5.4)	99±1.15 (+6.4)	101±0.58 (+8.6)	102±2.31 (+9.7)&	105±2.08 (+12.9)	108±2.52 (+16.1)	106±1.15 (+13.9)
K, mmol/L	1.8	0.5 mmol/L	2.2	4.4±0.10	4.7±0.05 (+4.5)&	4.9±0.05 (+11.3)**	5±0.05 (+13.6)	5.3±0.10 (+20.4)	5.4±0.11 (+22.7)	5.7±0.05 (+29.5)	5.8±0.10 (+31.8)	6.0±0.05 (+36.3)	6.1±0.11 (+38.6)	6.4±0.15 (+45.4)
PO4, mg/dL	3.2	10	1.1	5.50±0.5	5.50±0.05 (0.0)&	5.44±0.06 (-1.1)	5.39±0.01 (-2)	5.23±0.03 (-4.9)	5.14±0.06 (-6.5)	5±0.03 (-9.1)	4.99±0.05 (-9.2)	4.89±0.02 (-11.1)	4.79±0.01 (-12.9)	4.79±0.09 (-12.9)

Sonuçlar ölçülen değerlerin ortalaması olarak verilmiştir.

& Fraser'a göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir.

**CLIA kriterlerine göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar renkli olarak gösterilmiştir.

Tablo 13. 3. *In vitro* hemoliz çalışma sonuçları

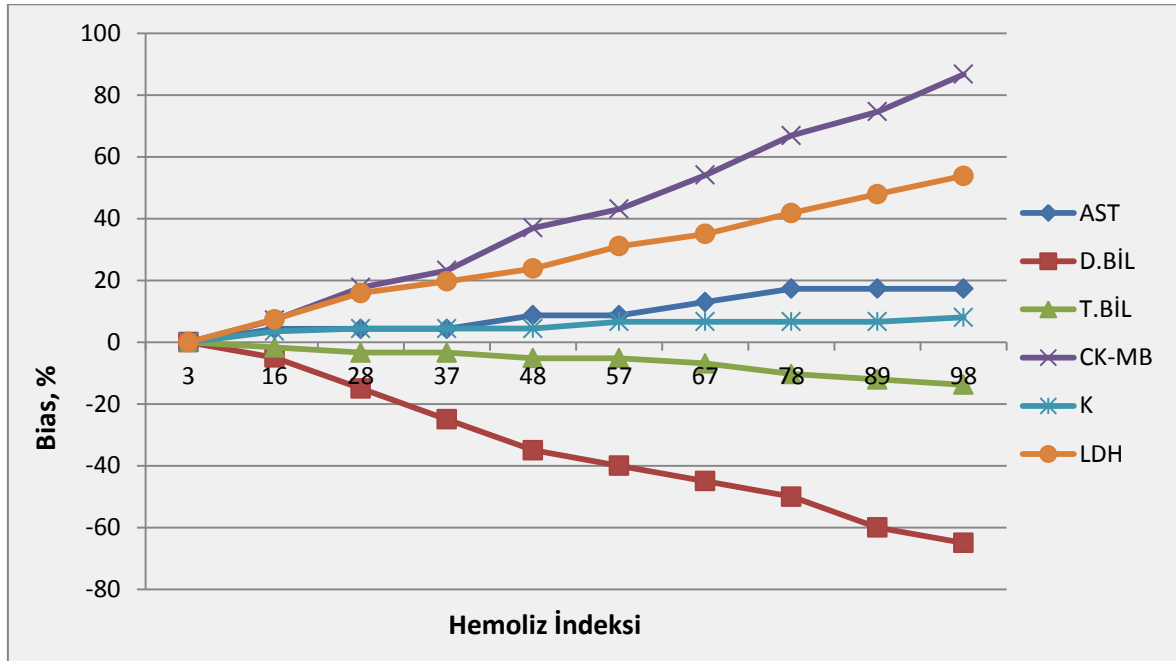
Analitler	Fraser ±%	CLIA 88 ± %	% CV n=10	Ortalama ± Standart sapma (% hata)									
				Hemolitik İndeks(HI)									
				Serum havuzu									
				6	32	37	44	54	63	77	84	92	101
AST, U/L	5.4	20	2.2	21±0.00 #	23±0.00 (+9.5)&	23±0.60 (+9.5)	23±0.60 (+9.5)	24±0.57 (+14.2)	24±0.57 (+14.2)	24±0.57 (+14.2)	25±0.57 (+19.0)	26±0.00 (+23.8)**	26±0.57 (+23.8)
D.BIL, mg/dL	14.2	-	2.7	0.2±0.02	0.18±0.00 (-10.0)	0.17±0.00 (-15.0)&	0.15±0.00 (-25.0)	0.14±0.00 (-30.0)	0.14±0.00 (-30.0)	0.11±0.01 (-45.0)	0.1±0.01 (-45.0)	0.1±0.00 (-50.0)	0.09±0.00 (-55.0)
T.BIL, mg/dL	10.0	20	2.4	0.62±0.01	0.58±0.01 (-6.40)	0.58±0.01 (-6.40)	0.57±0.01 (-8.00)	0.57±0.00 (-8.00)	0.57±0.00 (-8.00)	0.56±0.00 (-9.70)	0.56±0.00 (-9.70)	0.55±0.00 (-11.29)&	0.55±0.00 (-11.29)
CK-MB, U/L	7.8	3SD	1.5	15.77±0.05	18.9±0.17 (+19.8)&	19.9±0.10 (+26.1)	21.2±0.62 (+34.4)	22.2±0.20 (+40.7)	23.5±0.70 (+49.0)	26.5±0.40 (+68.0)	26.7±0.75 (+69.3)	28.7±0.68 (+81.9)	29.9±0.05 (+89.6)
K, mmol/L	1.8	0.5 mmol/L	1.3	4.4±0.06	4.5±0.00 (+2.3)&	4.5±0.00 (+2.3)	4.5±0.00 (+2.3)	4.5±0.00 (+2.3)	4.5±0.05 (+2.3)	4.5±0.05 (+2.3)	4.6±0.05 (+4.5)	4.6±0.05 (+4.5)	4.6±0.00 (+4.5)
LDH, U/L	4.3	20	1.9	353±2.10	405±1.20 (+14.7)&	411±2.10 (+16.4)	427±4.70 (+20.9)**	443±1.00 (+25.4)	468±4.60 (+32.6)	488±9.50 (+38.2)	501±2.50 (+41.9)	518±9.10 (+46.7)	539±1.20 (+52.7)

Analitler	Fraser ±%	CLIA 88 ± %	% CV n=10	Ortalama ± Standart sapma (% hata)										
				Hemolitik indeks (HI)										
				Serum havuzu										
6	101	185	288	396	490	583	719	797	890	1037				
ALP, U/L	6.4	30	0.7	80±0.50 #	79±0.57 (-1.25)	74±0.00 (-7.50) &	69±1.15 (-13.75)	64±0.57 (-20.00)	59±1.52 (-26.25)	55±1.00 (-31.30)**	50±0.57 (-37.50)	46±0.57 (-42.50)	43±0.57 (-46.25)	36±1.00 (-55.00)
ALT, U/L	12	20	0.7	20±0.00	20±0.57 (0.00)	22±0.57 (0.00)	19±0.57 (-5.00)	19±0.57 (-5.00)	19±0.00 (-5.00)	19±2.51 (-5.00)	19±2.08 (-5.00)	19±0.57 (-5.00)	17±1.52 (-15.00)&	17±3.00 (-15.00)
CK, U/L	11.5	30	1.1	136±1.50	140±1.52 (+2.90)	145±1.52 (+6.60)	149±2.00 (+9.50)	153±3.60 (+12.50) &	161±2.00 (+18.30)	162±0.02 (+19.10)	170±3.60 (+25.00)	173±2.51 (+27.20)	176±3.00 (+29.40)	187±2.00 (+37.50)**
GGT, U/L	10.8	30	2.1	27±0.50	26±1.73 (-3.70)	26±0.37 (-3.70)	23±1.52 (-14.80) &	22±1.15 (-18.50)	22±3.05 (-18.50)	18±1.50 (-33.30)**	17±3.78 (-37.00)	16±5.85 (-40.70)	16±1.52 (-40.70)	12±1.50 (-55.50)
Demir, mg/dL	8.8	30	1.2	68±0.00	68±0.00 (0.00)	68±0.00 (0.00)	72±1.20 (+5.80)	72±1.20 (+5.80)	74±1.20 (+8.82) &	77±0.60 (+13.20)	79±0.00 (+16.17)	80±1.50 (+17.60)	87±1.50 (+27.90)	89±2.30 (+30.80)
K, mmol/L	1.8	0.5 mmol/L	1.3	4.4±0.06	4.6±0.11 (+4.50) &	4.7±0.00 (+6.80)	4.9±0.06 (+11.30)**	5±0.06 (+13.60)	5.17±0.06 (+15.90)	5.3±0.00 (+20.40)	5.5±0.00 (+25.00)	5.63±0.06 (+27.90)	5.9±0.06 (+34.00)	6±0.06 (+36.30)
PO4, mg/dL	3.2	10	0.9	3.62±0.03	3.66±0.02 (+1.10)	3.65±0.02 (+0.82)	3.63±0.02 (+0.27)	3.63±0.05 (+0.27)	3.6±0.05 (-0.55)	3.58±0.02 (-1.10)	3.53±0.02 (-2.40)	3.52±0.03 (-2.76)	3.49±0.06 (-3.59) &	3.35±0.10 (-7.45)

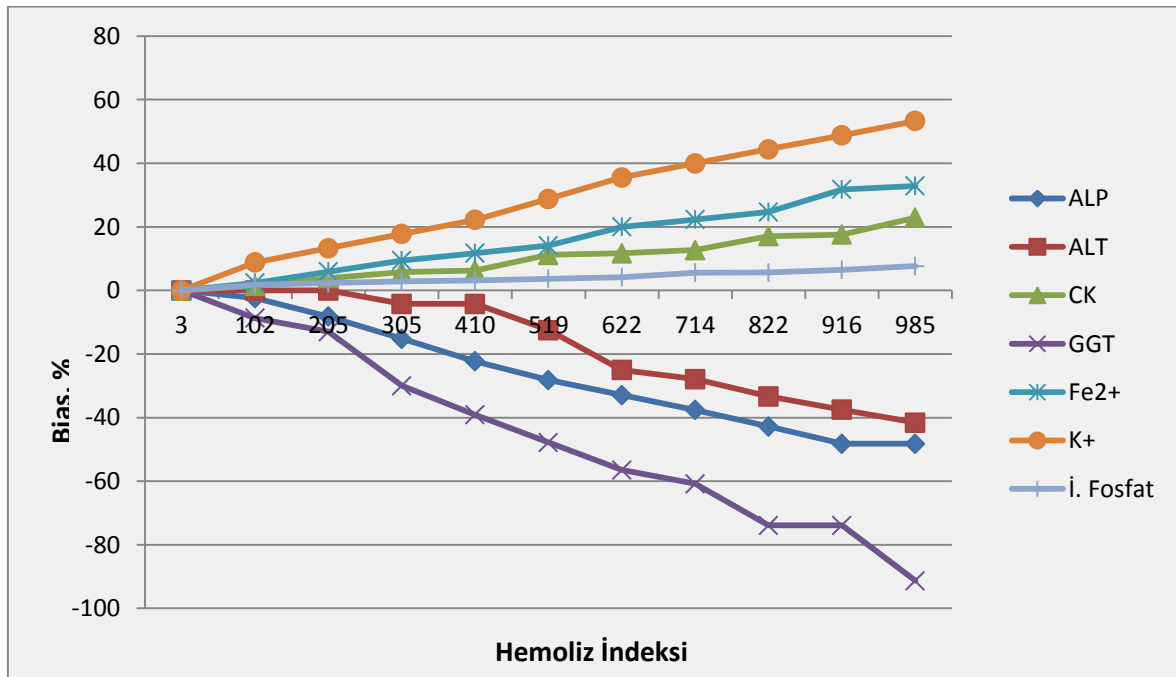
Sonuçlar ölçülen değerlerin ortalaması olarak verilmiştir.

& Fraser'a göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir

**CLIA kriterlerine göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar renkli olarak gösterilmiştir



Şekil 13. Hemoliz indekse göre parametre değişimleri: AST, D.BİL, T.BİL, CK-MB, K⁺, LDH



Şekil 14. Hemoliz indekse göre parametre değişimleri: ALP, ALT, CK, GGT, Fe²⁺, K⁺, PO₄⁼

Birinci çalışmamızdaki inorganik fosfat değerleri literatür verileri ile uyumlu olarak hemoliz derecesi arttıkça hemolizden kaynaklanan interferans etkisinin arttığı gözlenmiştir. Ancak ikinci ve üçüncü çalışmamızda inorganik fosfat değerleri hemoliz derecesi arttıkça interferans etkisinin azaldığı tespit edilmiştir.

Üç çalışmadaki sonuçların hemolizden net etkilenim seviyelerini hesaplanmıştır. Sonuçlar Fraser ve CLIA 88 klinik kabul edilebilirlik sınırlarındaki HI değerleri ile rölatif sapma yüzdelere oranlanarak hesaplanmıştır. Üç çalışma sonuçlarının aritmetik ortalaması alınmıştır. Fraser ve CLIA 88 göre parametrelerin alt sınır eşik seviyesi belirlenmiş ve Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. Fraser ve CLIA 88 kriterlerindeki yüzde değişimlere göre tespit edilen sınır eşik değerleri

parametreler	Fraser % $\pm$	Fraser HI	CLIA 88 % $\pm$	CLIA HI	ROCHE HI
ALP, U/L	6.4	178#	30	522#	200
ALT, U/L	12	677	20	732	200
AST, U/L	5.4	38	20	118	40
D.BİL, mg/dL	14.2	32	-	-	25
T.BİL, mg/dL	10.0	83	20	166	50
CK, U/L	11.5	309	30	835	200
CK-MB, U/L	7.8	16	3SD	-	10
GGT, U/L	10.8	195	30	443	200
DEMİR, mg/dL	8.8	480	30	944	200
LDH, U/L	4.3	13	20	43	15
PO4, mg/dL	3.2	427	10	1350	300
K,mmol/L	1.8	16	0.5	234	100

Sonuçlar ölçülen değerlerin ortalaması alınarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Uygunsuz örnekler birçok biyokimyasal ve hematolojik testin doğruluğunu anlamlı derecede etkileyebilmektedir. Böyle örneklerin başarılı bir şekilde tespiti ve yönetimi hem tıbbi laboratuvarların büyük sorumluluklarından birisidir, hem de ISO 15189 standartlarına göre akredite olmuş her laboratuvar için bir zorunluluktur (52).

Laboratuvar test süreçlerinin analiz-dışı evreleri, son on yıldır laboratuvar hatalarının majör kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bütün laboratuvar ölçümlerin de hataların büyük çoğunluğu preanalitik safhada yapılmaktadır (59). Preanalitik fazda birçok hata kaynağı mevcuttur (5). Preanalitik problemlerin çoğu; kan alma, ulaştırma, işleme ve depolamada hatalı prosedür veya materyallerden kaynaklanmaktadır, bunun yanında ulaştırma, işleme ve depolama sorunların az bir kısmını oluşturmaktadır (24). Hemoliz, klinik laboratuvar ölçümlerinde en yaygın preanalitik hatalardan biridir ve etkileşimlerin (interferansların) en sık sebebidir (53). Hemolize örnekler, klinik laboratuvarlarda çok sık olarak gözlenmekte ve bütün uygunsuz örneklerin çoğunluğunu (% 40-70) oluşturmaktadır (58). Hemoliz numune redlerinin en sık sebebidir (5). Kan örneğinin alınması, dağıtımı, ulaştırılması, işlenmesi ve depolanması ile ilgili çok çeşitli faktörler hemolizli örneğe sebep olur.

Kan alma personelleri muhakkak bu hata ve interferans kaynaklarından haberdar olmalı, doğru ve standartlaştırılmış bir kan alma tekniği uygulamalıdır (5). Flebotomi, örneğin kalitesi için çok önemlidir ve en kritik preanalitik adım olarak kabul edilir (59). Billic Zulle ve ark. , Hırvat laboratuvarlarında ekstra-analitik uygulamaların kalitesini araştırmak için ulusal çapta enine kesitsel bir sürvelans çalışmasında laboratuvar süreçlerinin sıklığını tanımlayıcı cümleler halinde sorular hazırlamış ve soruları üç gruba ayırmışlardır: 1.örneğin kabulü için gerekli kriterler düşünülerek hazırlanan sorular 2. Flebotomi düşünülerek hazırlanan sorular ve 3.sonuçların bildirimi üzerine hazırlanan sorular. Bu çalışmada laboratuvar personelinin bildirdiğine göre en düşük kalite, personel tarafından gerçekleştirilen flebotomiye bağlı prosedürlerle ilgiliydi. Bu veriler, test

sürecindeki ekstra-analitik işlemlerin gelişmesi ve örneğin toplanması için gerekli tüm ekibin (hekimler, hemşireler ve laboratuvar çalışanları) sürekli eğitim faaliyetlerine tabi tutulması gerektiğini daha çok desteklemektedir. Biyolojik örneklerin toplanmasına bağlı uygulamalara ve stratejilere özel bir önem verilmelidir (59). Hemolizli örneklerin prevelansı, preanalitik kalite için uygun bir göstergedir (52).

Çalışmamızda servislerdeki preanalitik yönetim (kan alımında kullanılan yöntemleri, numune transport işlemleri) değerlendirildi. Çalışmamızın başlangıcında hastanemizdeki servislerden laboratuvarımıza ulaşan tüm serum örneklerinin hemoliz düzeyi belirlendi. Hemoliz indeks tespitini laboratuvarımızda kullandığımız Cobas 8000 ve Cobas 6000 otoanalizörlerinde serum indeks reaktifi kullanarak gerçekleştirdik. Bu sistem laboratuvarımıza gelen her numunenin klinik olarak interferansla alakalı kabul edilebilir tablolar baz alınarak, serumdaki serbest hemoglobinin hızlı bir şekilde spektrofotometrik ölçümünü içermektedir. Kan örneğinin analit bazlı hemolizden etkilenip etkilenmediğini göstermektedir. Hemoliz indeksi, örnek toplanılan merkezlerin ve servislerin örneklerinin kalitesinde anlamlı bilgiler sağlamasıyla birlikte, hemolize örneklerin standardize tespiti ve yönetimi için otomatik cihazlarda en uygun çözümdür (53). Hemoliz indeksi hastane içi ve servislerde kalite kontrol indikatörü olarak kullanılabilir. Kan almada kullanılan yöntemlerden en iyi preanalitik yöntemi değerlendirmek ve geliştirmek için kullanışlıdır (7).

Çalışmamızda poliklinikler için ortalama HI'ı 8 bulundu. Servislerdeki genel ortalama HI'ı 39'dür. Servislerdeki hemoliz indeks düzeyi baz alınarak üç servise eğitim verilmesi planlandı. Bu servisler ve ortalama HI'ları; Göğüs hastalıkları servisi 56, Dermatoloji servisi 38 ve Acil servisinde 43 olarak bulundu. Poliklinik hastalarında gerçekleştirilen flebotomi ve diğer işlemler optimuma en yakın şartlar olarak değerlendirildiği için poliklinik HI düzeyleri normal ortalama değer olarak alındı ve servis değerleri buna göre belirlendi. Seçilen üç servis ortalama değerleri poliklinik HI değerlerinin en az üç katından fazla idi.

Hemolize neden olabilecek muhtemel faktörler kısaca şöyle özetlenebilir;

1. Anatomik ve fizyolojik faktörler: Antekubital venler haricindeki diğer alternatif bölgeler (örneğin küçük distal venler), altta yatan hastalıklar
2. Ekipman faktörleri: Plastik, küçük, IV kataterler

3. Teknik faktörler: Zor katater yerleştirme, kan toplama zorluğu, çok sayıda ve başarısız IV katater yerleştirme girişimleri, enjektöre kan alırken ve tüpü doldururken aşırı güç kullanılması olarak sınıflandırılabilir (23).

Bu faktörler dikkate alınan servis ve birim bazında hemoliz etkileri değerlendirildiğinde şu tespitler yapılmıştır.

Göğüs hastalıkları servisi ve Dermatoloji servisinde, asistanlar enjektörle kan alma işleminin gerçekleştirdiği gözlemlendi. Enjektörden tüplere kan aktarımının uygun olmadığı belirlendi. Acil serviste iki şekilde kan alma işlemi yapılmıyordu; birincisi hemşireler tarafından açılan damar yolundan IV kateterden kan alımı, ikincisi intörnler tarafından enjektöre bağlı kelebek setle kanın alınmasıydı. Yapılan gözlem sonucunda enjektörden kanın tüplere aktarılması esnasında, iğne ucu çıkarılmadan kanın basınçla tüp duvarına çarptırılmasına bağlı olarak kanın hemolize uğramasının en sık yapılan hata olduğu saptandı.

Carroro ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda hemoliz nedenlerini şöyle bulmuşlardır: olguların % 30.7'sinde kanın iğneden şırıngaya hızla alınması; % 20'sinde kelebekten şırıngaya hızla alınması % 16.5'inde IV kataterden şırıngaya hızlı alınması, % 1.5'inde infüzyon yolundan şırıngaya hızla alınmasıdır (30). Grant'in yaptığı çalışmada da kanın şırıngayla alınmasının vakumlu tüp sistemiyle alınmasına nazaran daha fazla hemolize neden olduğu (% 9) gösterilmiştir (60).

Lippi ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada kelebek setlerle alınan kanlarda hemoliz derecesinin düz iğne setleriyle alınanlardan farklı olmadığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar Sonntag'ın (49) yaptığı çalışmanın sonuçları ile uyum arz etmektedir. Bu sonuçlara göre anlaşılmaktadır ki uygun şekilde kullanıldığı zaman kelebek setler düz iğnelere iyi bir alternatiftir (23). Bu bilgiler ışığı altında iki uçlu kelebek set uygulamasının servis ve polikliniklerimizde damar yapısı daha frajil olan kişilerde kullanılması yönünde eğitimler verilmiştir. Tek iğneli kelebek setleri ile mümkün olduğunca kan alma işlemlerinde kullanılmaması, hatta idarece fazla satın alınması önerileri yapılmıştır.

Çalışmamızda verdiğimiz eğitimde " hemolizi etkileyen ve önleyen faktörleri" içeren interaktif seri eğitimler yapılmıştır. Eğitimle birlikte kan alımında kullanılan materyal değişimine gidildi. Enjektör yerine iki uç iğneli kelebek setleri kullanılması tavsiye edildi. Servisler örnek alımında uygun olmayan damar yapılı hastalarda kelebek set kullanmaya başladı.

Servis eğitimi sonrası Göğüs Hastalıkları HI ortalaması 56'dan 29'a, Dermatoloji servisi HI ortalaması 38'dan 21'e, Acil servis HI ortalaması 43'den 36'a inmiştir (Tablo 8).

Eğitim sonrası HI değerlerinde gözlenen düşüşlerin anlamlı olduğu saptandı ($p<0.001$). Böylece servislerdeki preanalitik yöntemin incelenmesi ve eksikliklerin verilen eğitimle giderilmesi ile servislerden gelen hemolizli numune oranı azaltarak laboratuvar kalite performansını artmıştır. Hastanemizdeki eğitimlerde sağlık çalışanları iki ayda bir rotasyona tabi tutulduklarından vereceğimiz eğitimin sürekli olması gerekmektedir.

Acil servislerde, yoğun hasta sirkülasyonu, kanamalı hastalarda damar yolu bulunmasının güçlüğü, hastanın ilk laboratuvar bilgilerine erken ulaşma isteği gibi faktörler eğitimde öğretilen yöntemlerin uygulanmasında güçlükler sebep olmaktadır.

Çalışmamızın verileri göstermiştir ki flebotomistlerin uygun eğitimleri ile birlikte hemolize örnekleri etkileyebilen analitik ve biyolojik interferansların tiplerinin ayrıntılı bilgisinin verilmesi preanalitik fazdaki herhangi bir adımdaki hata oluşma ihtimalini minimize etmek için gereklidir (23).

Laboratuvar hatalarının geniş bir çoğunluğu eğitim ve standardizasyon eksikliğine ve organizasyon bozukluğuna bağlıdır, bu yüzden uygunsuz örneklerin tespiti ve yönetimi için konsensüs önerileri veya rehberlerin uygulanması, hem aynı laboratuvar da hem de farklı laboratuvarlar arasında teknisyenin davranışını standartlaştırmayı sağlamaya yardımcı olduğundan faydalı olmaktadır. Bölümler arası işbirliğinin oluşturduğu iletişimin gelişmesi örneklerin kalitesinin artmasında ve en iyi uygulamaların yaygınlaşmasında gereklidir. Ancak bu süreç periferiyal flebotomi yerlerinde ve kliniklerinde kesintisiz bir denetim gerektirir. Aslında örnek toplayan kişiler ayrıntılı bir biçimde neyi niçin yapması gerektiklerini anladıklarında örnek toplama şekillerine ve prosedüre daha iyi uyum sağlayacaktır (23).

Hasta bakımında laboratuvar testlerinin etkisi; medikal, biyokimyasal ve teknolojik gelişmeleri içeren çeşitli sebeplerden dolayı geçmiş yıllara kıyasla artmıştır. Şu anda laboratuvar test sonuçları, klinik karar vermenin % 70-80'inden daha fazla katkı sağlamaktadır (61).

Klinik laboratuvarların ve teknolojinin gelişmesi sonucu analitik fazda hata yapma oranı azalmıştır. Laboratuvarlarda gözlenen analitik hata oranı % 7 iken preanalitik hata oranının % 46 olduğu bilinmektedir. Bu da preanalitik fazda hata oranının azalmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Hemoliz, preanalitik fazda gözlenen ve

sonucun güvenilirliğini etkileyen en önemli varyasyon kaynağıdır (62). Hemoliz biyolojik ve analitik sebeplerden dolayı sonuçlar üzerine etkili olmaktadır. İnterferans düzeyi lizisin derecesine ve kullanılan analiz yönteminin ne olduğuna göre değişiklik göstermektedir (5).

Laboratuvarımıza gelen numunelerin kalitesinin değerlendirilmesinde hemoliz indeksi kullanılabilir. Çalışmamız hemoliz indeksinin hemoliz riskini minimize etmede ve sağlık bakım kalitesini arttırmada yardımcı olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte preanalitik interferans kaynaklarının tespitinde ve yönetiminde otomatize sistemler kullanmayan laboratuvarlarda uygunsuz numuneler laboratuvar personeli tarafından gözle tespit edilmektedir. Gözle değerlendirme hem zaman alıcı bir işlemdir hem de yüksek oranda sübjektif ve standartlaşmaya elverişsizdir. Bu nedenle gözle yapılan değerlendirme potansiyel bir hata kaynağı olabilmektedir (52). Günümüzde hemolizden kaynaklı interferansın değerlendirmenin otomatik sistemler ile yapılmasının ve serum indeksinin rapor edilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (62). Ana-Maria Simundic ve ark. yaptıkları çalışmada hemolizli örneklerin tespitinde gözle değerlendirmenin yüksek oranda güvenilirlik arzettiğini ve bu değerlendirme için serum indekslerini raporlayan otomatize sistemler kullanılması gerektiğini tespit etmişlerdir (52). Serum indeksleri rutin laboratuvar pratiğinde kullanım sürecinin standart hale getirilmesine katkıda bulunan kolay, hızlı ve ucuz bir uygulamadır. Farklı üreticiler arasında bazı farklılıklar olsa da bu sistemler serum ve plazmanın farklı dalga boylarındaki absorbanların ölçümüne dayanır (geleneksel olarak 340-410-470-600 ve 670 nm) (62). Södenberg ve ark. (25) dan sonra hemolitik indeks ile ilgili ikinci çok merkezli çalışmanın sahibi olan Lippi ve ark. (7) da cihazların çoğu için HI konusunda karşılaştırılabilir sonuçların elde edildiğini göstermişlerdir. Ancak üreticiler tarafından belirlenen spesifik eşik değerleri belirgin olarak farklıdır. Bu sınırlar laboratuvar tarafından interferansın testleri etkileme derecesine göre değiştirilebilir (62).

Birçok laboratuvar hemolizli numuneyi direkt olarak reddeder. Oysa yaygın olarak kullanılan biyokimyasal testlerin çoğu belli hemoliz derecesine kadar kullanılan metoda bağlı hemolizden etkilenmez (62).

Hemolizli örneklerdeki sonuçların bir takım tıbbi hatalara ve hasta sağlığına zarar veren durumlara yol açabileceği düşünülerek serum indeksi ile uygunsuz örneklerin uygun yönetimi ve dikkatli moniterizasyonu hayati derecede önemlidir (59).

EPSC-IFCC WG-LEPS süveyans araştırmasında, katılımcılara hemolize örneklerle nasıl başa çıktıkları sorulmuştur. Yanıt verenlerin %44'ü 'bütün istenen tahlilleri

gerçekleştirildiğini, ancak hemolizden oldukça etkilenen sonuçların bildirilmediğini', % 56'sı örneğin reddedildiğini beyan etmişlerdir. Böylece şurası açıktır ki, farklı klinik laboratuvarlar bu problemle başa çıkmada aynı uygulama yaklaşımına sahip değillerdir (23).

Testlerin kabul edilebilirlik limitlerinin belirlemesi ve bütün testler üzerinde hemolizin etkisinin değerlendirmesi gereklidir. Bu yüzden biyolojik örnekler için maksimal tolere edilebilen sistematik hata ve yanlışlıklar tespit edilmeli ve onaylanmış yöntem veya bir referans kullanılarak gözlenen materyallerle karşılaştırılmalıdır (63).

Literatürde hemolizin testlere etkisi konusundaki bulgular benzer olmakla birlikte analitlerin hemoglobin konsantrasyonlarından etkilenme derecesi konusunda farklı değerlendirmeler bulunmaktadır (64). Hangi derecedeki hemolizin hangi parametreyi nasıl etkilediği konusunda net kurallar mevcut olmadığı gibi, hemolizli örneklerde yapılacak biyokimyasal testlerin nasıl yönetilmesi ve raporlanması gerektiği konusunda net rehberler yoktur (5).

HI otomatik analiz cihazlarında hemoliz tespiti için etkin bir yöntemdir. Uzun yıllardır laboratuvarlar HI'ini analitik interferansı engellemek ve hemolize örnekleri otomatik olarak red edilmesi için kullanmışlardır (14). Bu teknolojinin kullanımı; hemolizin görsel olarak değerlendirilmesinin doğal kısıtlamalarının üstesinden gelmek, gerçekte görsel değerlendirme ile tespit edilemeyen ancak bazı ölçümlerde uygunsuz olduğu fark edilebilen hafif derecedeki hemolizin tanınmasını geliştirmek (50-60 mg/dL altındaki serbest hemoglobin düzeylerinde) gibi nedenlerden dolayı kullanışlıdır (23).

Bizim çalışmamızda Hb (mg/dL) ile HI arasında, 1610 mg/dL Hb düzeylerine kadar lineer bir ilişki tespit edildi ($r = 0.999$). (Şekil 9)

Hemoliz faktörünün klinik kimyasal analizlere interferansı ile ilgili bir çok çalışma vardır. Cobas 8000 otoanalizörü için HI sınırını belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada; hemoliz derecesi arttıkça hemolizden kaynaklanan interferansın etkisinin arttığı gözlemlendi. Hemolizin etki edeceği muhtemel testlerin hangi seviye hemolizden ne kadar etkilendiği tespit edildi. Artan hemoliz derecelerine göre parametrelerdeki değişim tespit edilip sonuçlar CLIA 88 ve Fraser göre klinik kabul edilebilirlik limitleri içinde değerlendirildi.

Bizim çalışmamızda literatür verileriyle uyumlu olarak (5, 65) interferans düzeyi arttıkça AST, K^+ , LDH, demir, inorganik fosfat, CK, CK-MB ölçümlerinde daha yüksek değerler; T.BIL, D.BIL, ALP, GGT ölçümlerinde daha düşük değerler tespit edildi. Köseoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada LDH, AST, potasyum düzeylerinin serbest

hemoglobin konsantrasyonu arttıkça yükseleceğini, TBIL konsantrasyonunun da azalacağını tespit etmişlerdir (66).

Hemoliz, biyolojik ve analitik sebeplerden dolayı test sonuçları üzerine etkili olmaktadır (3).

In vitro hemolizin laboratuvar test sonuçlarına etkisi aşağıdaki sebeplerle ortaya çıkmaktadır.

1. Hemoglobin ve diğer hücre içi bileşenlerin serum veya plazmaya çıkmasından dolayı bazı analitlerin düzeyinde hatalı yükselmelere ya da dilüsyonel etkilere sebep olması
2. Serbest hemoglobinin analitik süreçteki kimyasal reaksiyonlara interferans göstermesi
3. Yöntem ve analit konsantrasyonuna bağlı spektrofotometrik interferans (hemoglobinin yüksek absorbans verdiği 415, 540 ve 570 nm’de optik absorbansın ya da blank ölçümün artışı nedeniyle)

Yüksek hemoglobin konsantrasyonu olan numunede bu mekanizmaların birkaç tanesi birarada gözlenebilmekte ve bu nedenle interferans etkisinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca bunlara lipemi ve ikterik indeks ve etki mekanizmaları da ilave edildiğinde çok daha kompleks etkileşimler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenledir ki uluslararası literatürler hemoliz, lipemi ve iktire bağlı hataların serum indekslerle düzeltici faktörleri kullanarak düzeltilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır.

AST, LDH, K⁺, inorganik fosfat, ALT gibi analitlerin intrasellüler ve ekstrasellüler düzeyleri arasında büyük farkların olması interferansa sebep olmaktadır (3). Hemolizden en fazla etkilenen enzim eritrosit içi konsantrasyonu plazmadakinden 160 kat fazla olan LDH’dır. Dolayısıyla hemolizde bu enzimde artış görmek doğaldır. Potasyumun eritrosit içindeki konsantrasyonu plazmadakinden 22 kat fazladır. Çalışmamızdaki potasyum düzeyi Fraser klinik kabul edilebilirlik sınırlarına göre hafif hemoliz seviyesinde etkilenmiştir (65).

CK analizlerinde artışın sebebi, hemolizle dışarı çıkan intrasellüler adenilat kinazın analiz esnasında tam olarak inhibe edilemiyor oluşuna bağlıdır.(3)

İnorganik fosfatta görülen artışın nedeni eritrosit içindeki organik fosfat esterlerinin fosfatazlarla parçalanmasıdır (65).

Demir ölçümlerindeki artış spektral çakışmayla açıklanmaktadır (66). Bizim çalışmalarımızda da CK, inorganik fosfat, demir düzeylerinde pozitif interferans bulunmuştur.

Serbest hemoglobinin pseudoperoksidaz aktivitesi bilirubin ölçümünde kullanılan azo boyasının oluşumunu inhibe etmesiyle meydana gelir (66). Literatür verileriyle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da bilirubin konsantrasyonu düşük bulunmuştur.

Lippi ve ark'larının yaptıkları çalışmada lizis miktarı arttıkça ALT, AST, CK, demir, LDH, magnezyum, fosfat ve potasyum değerlerinde artış meydana gelmiştir; ALP, GGT değerlerinde ise azalma gözlemlenmiştir. Bizim çalışma verilerimiz Lippi ve ark'larının yaptığı çalışma (5) ile uyumludur ancak ALT düzeyinde farklılık tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak yüksek serum hemoglobin konsantrasyonu olan numunelerde interferans mekanizmalarının birkaç tanesi üstüste gelebilmekte ve bazen biri bir yöne diğeri ters tarafa etki gösterebilmekte ve bu da durumu kolay anlaşılabilir hale getirmektedir.

Üretici firma otoanalizörlerine ait reaktif bilgilerinde serum ve plazma için serum indeks temelli interferans listesinde belirtildiği üzere ALT için hemoliz interferansının her iki yönde değişiklik (artış veya azalış) olabileceği belirtilmiştir. Bu bilgi temelinde Lippi ve ark.'larına (5) göre lizisin artışıyla ALT düzeyi artarken bizim çalışmamızda lizisin artışıyla ALT düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızın eksik yönü yüksek düzeylerdeki analitte hemolizin etkilerinin belirlenmemiş olmasıdır. Burada belki de ALT'de normal seviyede değerlendirildi. Patolojik ALT düzeylerinde ne olduğu sorunu çok açık değildir.

Hemolizli numunelerin otomatik saptanması ve bununla ilgili alınacak önlemlere ait kural bazlı algoritmalar (63) hayatı tehdit edebilecek in vivo hemoliz gibi klinik bozuklukların hızlı ve etkili bir şekilde belirlenmesini sağlar (64). Bu nedenle her bir analiz sonuçları ile birlikte serum indekslerinin rutin bildirimi hususuna dikkat edilmelidir. Klinik laboratuvarların kalite sistemlerini değerlendirmek, izlemek ve güvenilir kalite göstergelerini oluşturmak için devam eden süreçte serum indeksleri numune bütünlüğünün saptanması ve kalite yönetimi için önemli faydalar sağlar (14). Hemoliz indeksi sadece örnek kalitesini kontrol etmekle kalmayıp, preanalitik kalitenin öngörülmesi ve takibini de kolaylaştırmaktadır (14).

Tüm dünyada maliyet etkin politikalara uyumluluk, laboratuvar çalışmalarını yapı ve aktivite yönünden yeniden organizasyona gitmeye itmiştir. Bununla birlikte bazı

teknolojik gelişmeler laboratuvar testlerinin güvenilirliğini ve tutarlılığını arttırmada, kaliteyi yükseltmede ve preanalitik safhanın tüm açılarının gözlenmesinde kolaylaştırıcı özellikler sağlamaktadır. Hemoliz indeksinin uygulanması ve geliştirilmesi, *in vitro* diagnostik endüstrinin tutarlılığını ve hasta güvenliğini yükseltmektedir (14).

Hemolize örnek prevalansı preanalitik kalite için uygun bir ölçek olmaktadır (67). Numune alımı esnasındaki işlemlerin standart bir kalite seviyesinde tutulması, hem laboratuvar kaynaklarının daha doğru ve etkin kullanımını, hem de hasta bakımı ile ilgili daha iyi bir düzeye kavuşmamızı sağlayacaktır. Bu ise laboratuvar testlerinin nasıl etkilendiğinin iyi bilinmesi ve personele iyi anlatılması ile mümkündür. *In vitro* hemoliz ve beraberinde gelen analitik interferans sorunu, standart kan alma prosedürlerinin uygulamaya sokulması ile bir çözüme kavuşturulabilir. Öte yandan klinik olarak anlamlı hemolize sahip örnekleri tanımak için neler yapılması gerektiği (otoanalizörlerde hemoliz indeks tespiti) ve örneklerle nasıl yaklaşılması gerektiği ile ilgili rehberlerin oluşturulması gerekmektedir (5).

Sonuç olarak bireye dayalı hemolizin belirlenmesi iş gücü ve zaman kaybını önler. Yanlış hemoliz tespitlerine bağlı test tekrarlarını ve laboratuvar maliyetlerini azaltabilir. Numune hacminin az olduğu ve tekrar numune alımının zor olduğu pediatrik numuneler ve diğer değerli numunelerin kullanımı arttırılabilir. Hemolize bağlı gelişen hatalı sonuçların birçoğu elimine edilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Hemoliz indeks uygulamasına başlandı.
2. Ortalama hemoliz indeks değerleri poliklinikler için 8, servisler için ise 39 olarak belirlendi.
3. Hemoliz indeksi yüksek olan servisler arasından 3 servis pilot birim olarak seçildi. Bu servislerdeki yüksek hemolizin muhtemel nedenleri tespit edilerek düzeltici faaliyetler uygulandı. Eğitim öncesi ve sonrası Göğüs hastalıkları servisinde ortalama HI'ı 56'dan 29' a, Dermatoloji servisinde HI 38'den 21'e, Acil serviste 43'den 36'a anlamlı derecede düştüğü tespit edildi ($p<0.001$). Her üç servis bazında hemoliz indeksi 100 üzerinde olanlarda % 3.5 ve 200 üzerinde olanlarda ise % 1.2 anlamlı azalmalar tespit edildi.
4. Analitik çalışmalarımızda, değerlendirilen her bir test için Fraser ve CLIA 88 denk gelen alt sınır eşik değerleri belirlendi.

6.2. Öneriler

1. İleri düzey eğitim ve araştırma laboratuvarlarında kullanılan klinik kimya analizörleri preanalitik safhanın değerlendirmesi için mutlaka hemoliz indekslerini ölçebilecek alt yapıda olmalı.
2. Hemoliz indekse bağlı numune redleri belirlenen kantitatif değerler üzerinden yapılmalı.
3. Hemoliz indeks değerlerinin izlenerek birim bazında hatalar tespit edilmeli ve düzeltici faaliyetler gerçekleştirilmeli. Bu işlem laboratuvar kalite yönetiminin bir parçası olarak dinamik bir süreç halinde yürütülmeli.
4. Analitik olarak, laboratuvarlar öncelikle ilgili cihaz firmasının sunduğu alt eşik değerleri kullanmalı. Eğer imkân varsa bu değerler kendi laboratuvar şartlarında tesbit edilmeli.

5. Postanalitik süreçte; hemoliz indeksinden alt sınır değere bağlı olarak etkilenmemiş olan testler rapor edilmeli, bu değerin üzerinde etkilenen testler yönü ve derecesi belirtilmek üzere rapora yansıtılmalı, ileri düzeyde hemolizden etkilenen testler ise rapor edilmeden yeni numune talebi gerçekleştirilmeli.
6. Hemolize bağlı oluşan interferanslarda numune reddinden ziyade etkilenmiş ilgili testin raporlanmaması daha doğrudur.
7. Hemoliz etkilenimine bağlı ilgili test üzerinde düzeltmelerin yapılması günümüz literatür bilgilerine göre önerilmemektedir.
8. *In vivo* hemoliz düşündüren durumlarda klinisyenler mümkün olan en kısa sürede uyarılmalı ve durumun tespiti yapılmalıdır.

7. ÖZET

Klinik Biyokimya Otoanalizörlerinde Hemoliz İndeks Kullanımı

Preanalitik hatalar, laboratuvar hatalarının % 50-60'ını oluşturur. Hemoliz, lipemi ve ikterden oluşan serum indeksleri en yaygın preanalitik hatalardır. Günümüzde ulaşılması istenen temel hedeflerden biri de, ileri otomatize sistemleri kullanarak klinik kimya laboratuvarlarındaki bu hataları azaltmaktır. Serum indeksinin görsel değerlendirilmesi ile örneklerin reddi, en sık kullanılan yöntemdir. Bu çalışmanın amacı: 1.Hemoliz indeksinin belirlemek, 2.Klinik ve polikliniklerden geliş durumlarına göre hemoliz indeks dağılımının göstermek, 3.seçilmiş pilot kliniklerde önleyici ve düzeltici faaliyetler yoluyla bu hemoliz indeks değerlerini düşürmek, 4.Son olarak mevcut literatürün ışığı altında hemolizden etkilenmiş numuneler için test rapor formatı önermektir.

Ortalama hemoliz indeksleri poliklinikler için 8, yataklı servisler için ise 39 bulunmuştur. Göğüs hastalıkları, cildiye ve acil servisler pilot birimler olarak seçilmiştir. Bu servislerde preanalitik hata faktörleri tespit edildikten sonra düzeltici ve önleyici eylemler ve eğitim çalışmaları verilmiştir. Çalışmanın başlama noktasında hemoliz indeks değerleri Göğüs Hastalıkları kliniği 56, dermatoloji servisi 38 ve acil servis için 43 bulunmuştur. Düzeltici çalışma periyodundan sonra hemoliz indeks değerleri sırasıyla 29, 21 ve 36 olarak anlamlı derecede azalmış bulunmuştur ($p<0.001$).

Hemoliz interferansı, örnekteki serbest hemoglobinin son konsantrasyonuyla direkt olarak ilişkilidir. Bu çalışmada Hb (mg/dL) ve hemoliz indeksi 1610 mg/dL Hb düzeyinin altında iyi bir korelasyon göstermiştir ($r=0.999$). Hemoliz, AST, K^+ , LDH, demir, inorganik fosfat, CK ve CK-MB ölçümlerinde pozitif bir interferans göstermiştir. ALP, ALT, D.BIL, GGT ve T.BIL ölçümlerinde negatif interferans gözlenmiştir.

Hemoliz, preanalitik hataların ve numune redlerinin en sık nedenidir.Hemoliz indeks ölçen klinik kimya otoanalizörleri, modern klinik kimya laboratuvarlarında hemolizli örneklerin belirlenmesi için kullanılmalıdır. Hemolizli örneklerin yönetiminde kullanılacak standart protokoller oluşturulmalı ve uygulanmalıdır. Preanalitik safhadaki hemolizin ana nedenleri devamlı olarak takip edilmelidir. Hemoliz için önleyici ve düzeltici aktiviteler laboratuvar kalite yönetim sisteminin bir parçası olmalıdır.

SUMMARY

Usage Of Hemolysis Index In Autoanalyzers At Clinical Biochemistry Laboratory

Preanalytical errors consist of % 50-60 laboratory errors. The serum indexes including hemolysis, lipemia and icterus are the most common pre-analytical errors. Nowadays one of the main objectives is to reduce these errors in clinical chemistry laboratories by using advanced automated systems. The most common way is to reject the samples by visual evaluation of serum index. The aims of the study were 1.To determine the hemolysis index 2. To show the hemolysis index distributions according to origin of sample from clinics and policlinics 3. To reduce the hemolysis indices by doing the preventive and corrective activities in pilot clinic 4. Finally to suggest the test report format for sample with affected hemolysis in view of the current literature data.

The mean indexes of hemolysis were found to be 8 for policlinics and 39 for services. Chest diseases, dermatology and emergency services were selected as pilot clinics. Corrective and preventive actions and education training were applied in this clinics were identified. Hemolysis index values were determined as 56 for Chest Diseases service, 38 for Dermatology service, and 43 for emergency service at starting point of the study. The after improving study period hemolysis index values were found to be significantly decreased as 29, 21 and 36, respectively ($p < 0.001$).

Hemolysis interference is directly associated with concentration of free hemoglobin in the sample. In the present study, Hb (mg/dL) and hemolysis index were showed a good correlation with under the level of 1610 mg/dL Hb ($r = 0.999$). The assays of AST, K^+ , LDH, iron, inorganic phosphate CK and CK-MB were showed positive interference with hemolysis. In addition, ALP, ALT, D.BIL, GGT and T.BIL were showed negative interferans.

The most common cause of the pre-analytical errors and the rejections of samples is hemolysis. Clinical chemistry otoanalyzer measuring hemolysis index should be used for the determination of samples with hemolysis in modern clinical chemistry laboratory. Standard protocols for management of the affected samples with hemolysis must be prepared and followed. Main causes of hemolysis in pre-analytical phase should be monitored continuously. Preventive and corrective activities for hemolysis should be a part of laboratory quality management system.

9. KAYNAKLAR

1. Türkmen H.Y., Serdar M.A., Haşimi A., Cihan M., Kurt İ., Akman Ş, Kutluay T., Erbil M.K.: Hemoliz ve lipeminin biyokimyasal testlere etkisi ve lipemik etkinin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi*, 49: 5-10, 2007.
2. Lippi G., Banfi G., Buttarello M., Ceriotti F., Daves M., Dolci A., Caputo M., Giavarina D., Montagnana M., Miconi V., Milanesi B., Mosca A., Morandini M., Salvagno G.L. : Recommendation for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med*, 45(6): 728-736, 2007.
3. Dimeski G.: Interference testing. *Clin Biochem Rev*, 29 Suppl 1: 43-48, 2008.
4. Ji JZ., Meng QH. : Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Roche Cobas 6000 assay. *Clin Chim Acta*, 412(17-18): 1550-1553, 2011.
5. Lippi G., Salvagno G.L., Montagnana M., Brocco G., Guidi G.C. : Interference of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med*, 44 (3): 311-316, 2006.
6. Lippi G., Blanckaert N., Bonini P., Green S., Kitchen S., Palicka V., Vassault A.J., Plebani M. : Hemolysis an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med*, 46(6): 764-772, 2008.
7. Lippi G., Salvagno G.L., Blanckaert N., Giavarina D., Green S., Kitchen S., Palicka V., Vassault A.J., Plebani M. : Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clin Chem Lab Med*, 47(8): 934-939, 2009.
8. Guder W.G., Fonseca-Wollheim F., Heil W., Schmitt Y.M., Töpfer G., Wisser H., Zawta B. : The haemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J Lab Med*, 24 (8): 357-364, 2000.
9. Saibaba K.S., Bhaskar M.V., Rao P.V., Ramana G.V., Dakshinamurty K.V.: Interferens in clinical chemistry analysis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 13 (2): 55-62, 1998.
10. Rin G.: Preanalytical workstation as a tool for reducing laboratory errors. *Journal of Medical Biochemistry*, 29(4): 315-324, 2010.

11. Fiedler GM, Thiery J. :The incorrect laboratory result. Part 1: Pre and postanalytical phase. *Internist (Berl)*, 45(3): 315-329, 2004.
12. Kroll M.H., Elin J.R. : Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem*, 40(11): 1996-2005, 1994.
13. Lippi G., Guidi G.C., Mattiuzzi C, Plebani M.: Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*, 44(4): 358-365, 2006.
14. Plebani M., Lippi G.: Hemolysis index: quality indicator or criterion for sample rejection? *Clin Chem Lab Med*, 47(8): 899-902, 2009.
15. Benet LZ, Sheiner LB: Pharmacokinetics: the Dynamics of drug absorption, distribution and elimination. İn: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, Newyork. Macmillan 13-22, 1985.
16. Lacher D.A., Elsea A.R.: Effect of a lipid-clarifying reagent on result of Beckman ASTRA methods. *Clin Chem*, 32(2): 394, 1986.
17. Özer C.,Topkaya Ç., Belçik İnal B., Tonbaklar Bilgi P., Aral H., Güvenen G.: Glukoz oksidaz yöntemine lipeminin etkisi. *İstanbul Tıp Dergisi*,12(2): 61-64, 2011.
18. Sampson M., Ruddel M., Elin R.J. : Effect of specimen turbidity and gliserol concentration on nine enzymatic methods for triglyceride determination. *Clin Chem*, 40(2): 221-226, 1994.
19. Guder W.G., Narayaxan H.W., Zawta B: Samples : From the patient to the laboratory, Git Welag, GMBH 1996.
20. Roche Diagnostics GmbH, SI2 Serum Index Gen.2 insructions, Germany.
21. Lictman M.A., Bestler E., Kipps J.T. : Williams Hematology. seventh editon. The McGraw-Hill Medical, 377-393, 2006.
22. Gürdöl F., Ademoğlu E. : Biyokimya, 631-639, 2006.
23. Lippi G., Cervellin G., Favaloro E., Plebani M.: İn vitro and İn vivo Hemolysis 2012.
24. Lippi G., Plebani M., Somma S., Cervellin G.: Hemolyzed specimens: a major challange for emergency departmens and clinical laboratories. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(3): 143-153, 2011.
25. Söderberg J., Jansson P.A., Wallin O.,Grankvist K., Hultdin J. : Haemolysis index: - An estimate of preanalytical quality in primary healty care. *Clin Chem Lab Med*, 47(8): 940-944, 2009.
26. Sciacovelli L., Plebani M. : The IFCC Working Group on laboratory errors and patient safety. *Clin Chim Acta*, 404(1): 79-85, 2009.

27. Global Preanalytical Scientific Committee, Available at: [http:// www.specimenscare.com](http://www.specimenscare.com)
Last accessed. 22 june 2011.
28. Carrara P., Servidio G., Plebani M. : Haemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem*, 46(2): 306-307, 2000.
29. Hashimoto C.: Autoimmune hemolytic anemia. *Clin Rev Allergy İmmunoloji*, 16(3): 285-295, 1998.
30. Mehta A., Mason P.J., Vulliamy T.J.: Glucose 6-phosphatase dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Clin Hematoloji*, 13(1): 21-38, 2000.
31. Thomas L.: Hemolysis as interference and interference factor. *eJIFCC vol.13 no 4*: Available at: <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol 13 no 4/130401002.htm>, 2010.
32. Guder W.G. :Haemolysis as an influence and interference factor in clinical chemistry. *J. Clin Chem Clin Biochem*, 24(2): 125-126, 1986.
33. Donald S. Young, M.B., Ph. D, Edward W. Berners, Jr., Ph. D., and Doris M, Haverstick, Ph. D. : Specimen collection and processing, Burtis C.A. , Ashwood E. R., Bruns D.E., ed Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostices. 4 th ed. Missri, elsevier saunders, 41-56, 2006.
34. Lippi G., Salvagno G.L., Montagnana M., Franchini M., Guidi G.C.: Venous stasis and routine hematologic testing. *Clin Lab Haematoloji*, 28(5): 332-337, 2006.
35. Fang L., Fang SH., Chung YH., Chein S.T.: Collecting factors related to the haemolysis of blood specimens. *Journal of Clinical Nursing*, 17(17): 2343-2351, 2008.
36. Becton Dickinson White Paper VS5391: Evaluation of Sample Quality and Analytic Result between Specimens Collected in Vacutainer Tubes and Current Syringe Collections. Franklin Lakes, NJ: Becton Dickinson; 2001.
37. Wilcox G.J., Barnes A., Modanlou H.: Does transfusion using a syringe infusion pump and small-gauge needle cause hemolysis? *Transfusion*, 21(6): 750-751, 1981.
38. Clinical Laboratory Standards Institute. CLSI H4-A6. Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Blood Specimen by Skin Puncture; Approved Standard-Sixth Edition, Vol. 24, No.21, 2008.
39. Meites S., Lin S.S., Thompson C.: Studies on the quality of specimens obtained by skin puncture of children. 1. Tendency to haemolysis and haemoglobin and tissue fluid as contaminants. *Clin Chem*, 27(6): 875-878, 1981.
40. BD Vacutainer. Evacuated Blood Collection System product insert, june 2004.
41. Mensel B., Wenzel U., Roser M., Lüdemann J., Nauck M.: Considerably reduced centrifugation time without increased hemolysis: evacuation of the new BD Vacutainer SSTTMII Advance. *Clin Chem*, 53(4): 794-795, 2007.

42. Tamechika Y., Iwatani Y., Tohyama K., Ichihara K.: Insufficient filling of vacuum tubes as a cause of microhemolysis and elevated serum lactate dehydrogenase levels. Use of a data-mining technique in evaluation of questionable laboratory test results. *Clin Chem Lab Med*, 44(5): 657-661, 2006.
43. Büttner J., Borth R., Boutwell J.H., Broughton P.M.G., Bowyer R.C. : IFCC provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. *J. Clin Chem Biochem*, 14(6): 265-275, 1976.
44. Ismail A., Shingler W., Seneviratne J., Burrows G.: In vitro and in vivo haemolysis and potassium measurement. *Br Med J*, 330(7497): 949, 2005.
45. Grafmeyer D., Bondon M., Manchon M., Leviloin P.: The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. Result of an interlaboratory study. *Eur J. Clin Chem Clin Biochem*, 33(1): 31-52, 1995.
46. Lammers M., Gressner AM.: Immunonephelometric quantification of free haemoglobin. *J Clin Chem Clin Biochem*, 25(6): 363-367, 1987.
47. Blank D.W., Kroll M.H., Ruddel M.E., Elin R.J.: Hemoglobin interference from in vivo hemolysis. *Clin Chem*, 31(9): 1566-1569, 1985.
48. Cordova Martinez A., Villa G., Aguilo A., Tur J.A., Pons A.: Hand strike-induced hemolysis and adaptations in iron metabolism in Basque ball players. *Ann Nutr Metab*, 50(3): 206-213, 2006.
49. Sontannig O. : Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem*, 24(2): 127-139, 1986.
50. Steen G., Vermeer H.J., Naus A.J., Goevaerts B, Agricola P.T., Schoenmakers C.H. : Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. *Clin Chem Lab Med*, 44(4): 413-419, 2006.
51. Algeciras-Schimmich A., Cook W.J., Milz T.C., Saenger A.K., Karon B.S. : Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clin Biochem*, 40(16-17): 1311-1316, 2007.
52. Simundic A.M., Nikolac N., Ivankovic V., Ferenec-Ruzic D., Magalic B., Kuaternik M., Topic E.: Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye. *Clin Chem Lab Med*, 47(11): 1361-1365, 2009.
53. Simundic A.M., Topic E., Nikolac N., Lippi G. . Hemolysis detection and management of hemolyzed specimens. *Biochem Medica*, 20(2):154-159, 2010.
54. Verfaillie C.J., Delanghe J.R.: Hemolysis correction factor in the measurement of serum neuron-specific enolase. *Clin Chem Lab Med*, 48(6): 891-892, 2010.

55. Roche tanıtım kataloğu, Serum Indices: Reduction of clinical errors in laboratory medicine, 2007 Roche.
56. Lippi G., Musa R., Aloe R., Mercadanti M., Pipitone S. : Influence of temperature and period of freezing on the generation of hemolysate and blood cell lysate. Clin Biochem, 44(14-15): 1267-1269, 2011.
57. Ricos C., Alvarez V., Cava F., Garcia-Lario J.V., Hernandez A., Jimenez C.V., Minchinela J., Perich C., Simon M. : Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest, 59(7): 491-500, 1999.
58. Medicare, Medicaid and CLIA programs; regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)-HCFA. Final rule with comment period. Federal Register, 57(40): 7002-7186, 1992.
59. Šümundić A.M., Nikolac N., Vokasović I., Vrkic N. : The prevalence of preanalytical errors in a Croatian ISO 15189 accredited laboratory. Clin Chem Lab Med, 48(7): 1009-1014, 2010.
60. Grant M.S. : The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples. J Emerg Nurs., 29(2): 116-121, 2003.
61. Kurec A., Wyche K.L.: Institute for Quality in Laboratory Medicine Series: controversies in laboratory medicine: nursing and the laboratory: relationship issues that affect quality care. MedGenMed, 8(3): 52, 2006.
62. Yiğitbaş T., Şentürk B.A, Baskın Y., Öney M., Üstüner F. :Hemolizin rutin acil biyokimya testlerine etkisi. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 8(3): 105-110, 2010.
63. Vassault A., Grafmeyer D., Naudin C., Dumont G., Bailly M., Henny J.: Protocol for the validation of methods. Ann Biol Clin, 44: 686-745, 1986.
64. Vermeer H.J., Steen G., Naus A.J., Goevaert S.B., Agricola P.T., Schoenmakers C.H. : Correction of patient result for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach. Clin Chem Lab Med, 45(1): 114-119, 2007.
65. Yücel D., Dalva K. : İn vitro hemolizin rutin biyokimyasal testler üzerine etkileri. Turk J Resc Med Sci, 9: 248-253, 1991.
66. Köseoğlu M., Hur A., Atay A., Çuhadar S. : Effect of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. Biochemia Medica, 21(1) :79-85, 2011.
67. Kirchner M.J., Funes V.A., Adzet C.B., Clar M.V., Escver M.I., Girano J.M., Barellas R.M., Alsina C.P., Aquila C.R., Isem R.T., Navarra C.V. : Quality indications and specifications for key processes in clinical laboratories: a preliminary experience. Clin Chem Lab Med, 45(5): 672-677, 2007.