



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SIEMENS SYSMEX CS-2500 VE ABBOTT CP-3000

CİHAZLARININ ANALİTİK PERFORMANS

DEĞERLENDİRMESİ

Dr. Mine Büşra PEHLİVAN

UZMANLIK TEZİ

Ağustos 2020

BOLU



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SIEMENS SYSMEX CS-2500 VE ABBOTT CP-3000

CİHAZLARININ ANALİTİK PERFORMANS

DEĞERLENDİRMESİ

Dr. Mine Büşra PEHLİVAN

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Özgür Mehmet YİS

Ağustos 2020

BOLU

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ONAYI
BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY CLINICAL RESEARCHES ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Sayı : 161

26.3.2019

Konu: Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Siemens Cysmex CS2500 ve Abbott CP3000 cihazlarının analitik performans değerlendirilmesi
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Analytical Performance Evaluation of Siemens Cysmex CS2500 and Abbott CP3000 Devices
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Dr.Öğr.Üyesi Özgür Mehmet YİS
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Prof.Dr.Güler BUĞDAYCI, Arş.Gör.Mine Büşra PEHLİVAN, Uzm.Dr.Celal CEYLAN
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2018/212	Tarih (Date): 07.03.2019
	Dr.Öğr.Üyesi Özgür Mehmet YİS'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof. Dr. İdris TÜREL (Başkan)	Farmakoloji	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. İsa YILDIZ (Başkan Yrd.)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mehmet Hamid BOZTAŞ (Üye)	Ruh Sağlığı Hastalıkları	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Erkan KILINÇ (Bildirimlerden sorumlu üye)	Fizyoloji	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Oya KALAYCIOĞLU (Üye)	Biyoistatistik	BAİBÜ İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Hayati ATALA (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	BAİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Tamer ÇANKAYA (Üye)	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	BAİBÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Makbule TOKUR KESGİN (Üye)	Hemşirelik	BAİBÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Kutlu AYDIN (Üye)	Antrenörlük	BAİBÜ Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu	
Dr.Hatice Selen SÖYLEMEZ (Üye)	Eczacı	Özel Eczane (BOLU)	
Av. Huri Hülya GÜNEŞ COŞKUN (Üye)	Hukukçu	Özel Hukuk Bürosu (BOLU)	
Ramazan KAYNARPINAR (Sivil-Üye)	Esnaf	Serbest Meslek (BOLU)	

ETİK UYGUNLUK BEYANI

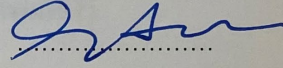
Bu tezin yazılmasında bilimsel ve etik kurallara uyulmuştur, başkalarının eserinden yararlanılması halinde atıfta bulunulmuştur, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmamıştır ve bu tezin bir kısmı veya tamamı başka bir yerde tez çalışması olarak sunulmamıştır.

Mine Büşra PEHLİVAN

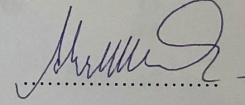
	BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI	DOKÜMAN KODU: ASS. FR.06
		YAYIN TARİHİ: 11.06.2020
	TEZ ONAY BELGESİ	REVİZYON NO 00
		REVİZYON TARİHİ: 00
		SAYFA NO: 01

Adayın Adı Soyadı : Mine Büşra PEHLİVAN
 Anabilim Dalı/Bilim Dalı : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
 Tezin Başlığı : Siemens Sysmex CS-2500 Ve Abbott CP-3000
 Cihazlarının Analitik Performans Değerlendirmesi
 Tezin Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Özgür Mehmet YİS
 Tezin Savunma Tarihi : 25/08/2020

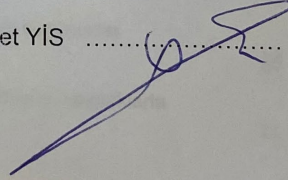
Jüri Başkanı Prof. Dr. Güler BUĞDAYCI



Üye Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ



Üye Dr. Öğr. Üyesi Özgür Mehmet YİS



DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
DEKAN V.



TEŞEKKÜR

Mesleki anlamda hep ilerlememi sağlayan, eğitimciliğinin yanında bana anne şefkatiyle yaklaşan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Prof. Dr. Güler BUĞDAYCI 'ya; kendisiyle çalışma fırsatı yakaladığım kısa sürede nezaketiyle, içtenliğiyle kalbimde büyük bir yeri olan kıymetli hocam Doç. Dr. Buket TEKÇE 'ye; güler yüzünü hiçbir zaman eksik etmeyen, desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Özgür Mehmet YİS'e; birlikte çalıştığımız süre boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat ALIŞIK'a; değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıkları için, uzmanlığa giden bu yolda bana ışık oldukları için, her zaman özleyeceğim bir çalışma ortamı sundukları için ve eğitimim boyunca gösterdikleri sabır, ilgi ve anlayış için sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistan arkadaşlarım Dr. Merve ATEŞ'e, Dr. Utku Görkem ERDOĞAN'a ve Dr. Mehmet Alp SERT'e, Uzm. Dr. Muhammet Engin ÖZCAN'a ve tüm laboratuvar çalışanlarına tez çalışma ve yazım sürecinde verdikleri emekler için teşekkür ederim.

Ailem oldukları için kendimi şanslı hissettiğim ve şükrettiğim, attığım her adımda beni koşulsuz destekleyen, daima gurur duyup onlara layık olmaya çalıştığım, bugün olduğum kişi olmamı sağlayan canım annem Songül BOZKÜRK'e ve canım babam Osman BOZKÜRK'e sonsuz sevgi ve saygı ile teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği günden bugüne her zaman yanımda olan, sabır ve anlayışıyla bu zorlu sürecin her saniyesini benimle paylaşan, bana her zaman sevgiyle bakan biricik hayat arkadaşım Dr. Murat PEHLİVAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve yürekten sevgilerimi sunarım.

Mine Büşra PEHLİVAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	ii
ETİK UYGUNLUK BEYANI.....	iii
TEZ ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
SİMGE ve KISALTMALAR.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HEMOSTAZ	3
2.1.1 Primer hemostaz.....	3
2.1.2. Sekonder hemostaz.....	5
2.1.2.1. Kaskad/şelale modeli	5
2.1.2.1.1. Ekstresek yolak.....	6
2.1.2.1.2. İntrensek yolak	7
2.1.2.1.3. Ortak yol.....	8
2.1.2.1.4. Doğal antikoagülan sistem	9
2.1.2.2. Hücre temelli model.....	10
2.1.2.2.1. İnisiyasyon fazı.....	11
2.1.2.2.2. Amplifikasyon fazı	12
2.1.2.2.3. Propagasyon fazı	12
2.1.3. Tersiyer hemostaz (Fibrinoliz).....	13
2.2. HEMOSTAZ İLE İLGİLİ TESTLER	14
2.2.1. Primer hemostaz testleri.....	15
2.2.2. Sekonder hemostaz testleri.....	16
2.2.3. Tersiyer hemostaz testleri	17
2.3. APTT, PT VE D-DİMER ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ.....	18
2.3.1. APTT ve PT ölçüm yöntemleri	18

2.3.2. D–dimer ölçüm yöntemleri	19
2.4. YÖNTEM DEĞERLENDİRİLMESİ.....	20
2.4.1. Kesinlik	21
2.4.2. Doğruluk	21
2.4.3. Referans aralık doğrulama	22
2.4.4. Metot karşılaştırma.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. KESİNLİK DEĞERLENDİRMESİ	24
3.2. DOĞRULUK DEĞERLENDİRMESİ	24
3.3. REFERANS ARALIK DOĞRULAMA ÇALIŞMASI.....	25
3.4. CİHAZ KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMASI.....	25
3.5. KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER	26
3.5.1. Sysmex CS–2500 cihazı teknik özellikleri	28
3.5.2. Abbott CP–3000 cihazı teknik özellikleri	28
3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. KESİNLİK DEĞERLENDİRMESİ SONUÇLARI	30
4.2. DOĞRULUK DEĞERLENDİRMESİ SONUÇLARI	32
4.3. REFERANS ARALIK DOĞRULAMA ÇALIŞMASI SONUÇLARI	33
4.4. CİHAZ KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMASI SONUÇLARI.....	33
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
7. KAYNAKLAR	48

TABLO LİSTESİ

Tablo	Sayfa No
Tablo 4. 1. APTT kesinlik değeriendirmesi sonuçları	30
Tablo 4. 2. PT kesinlik değeriendirmesi sonuçları	31
Tablo 4. 3. D–dimer kesinlik değeriendirmesi sonuçları.....	32
Tablo 4. 4. Doğruluk değeriendirmesi sonuçları	33



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 2. 1. Ekstresek yolak.....	7
Şekil 2. 2. İntresek yolak	8
Şekil 2. 3. Ortak yolak	9
Şekil 4. 1. APTT testi Passing – Bablok regresyon analizi	34
Şekil 4. 2. APTT testi Bland – Altman grafiği	34
Şekil 4. 3. PT–INR testi Passing – Bablok regresyon analizi.....	35
Şekil 4. 4. PT–INR testi Bland – Altman grafiği.....	36
Şekil 4. 5. D–dimer testi Passing – Bablok regresyon analizi	37
Şekil 4. 6. D–dimer testi Bland – Altman grafiği	37

SİMGE ve KISALTMALAR

$\bar{x}$: Ortalama

ACT: Aktive pıhtılaşma zamanı

ADP: Adenozin difosfat

AMP: Adenozin monofosfat

APTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

AT: Antitrombin

Ca^{2+} : Kalsiyum iyonu

CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendments

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CV: Varyasyon katsayısı

ELISA: Enzime bağlı immün sorban yöntem

F: Faktör

GP: Glikoprotein

HMWK: Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen

INR: International Normalized Ratio

NPV: Negatif tahmin değeri

PAI: Plazminojen aktivatör inhibitörü

PT: Protrombin zamanı

r : Korelasyon katsayısı

SD: Standart sapma

TAFI: Trombin ile aktiveleştirilebilen fibrinoliz inhibitörü

TF: Doku faktörü

TFPI: Doku faktörü yolu inhibitörü

tPA: Doku plazminojen aktivatörü

TT: Trombin zamanı

uPA: Ürokinaz plazminojen aktivatörü

VWF: Von Willebrand Faktör

VWH: Von Willebrand Hastalığı

SIEMENS SYSMEX CS-2500 VE ABBOTT CP-3000

CİHAZLARININ ANALİTİK PERFORMANS

DEĞERLENDİRMESİ

ÖZET

Amaç: Hemostaz testleri tarama, tanı, ilaç izlemi gibi birçok amaçla klinisyenler tarafından istenmektedir. Otomatik koagülasyon cihazları son 50 yıl içinde kullanılmaya başlanmış ve ciddi şekilde geliştirilmiştir. Kullanılan yöntemlerin, kitlerin ve cihazların çeşitliliği, preanalitik birçok faktörden etkilenmesi bu testlerde standardizasyonu zorlaştırmıştır. Standardizasyon için en temel yöntemlerden biri metot karşılaştırmadır. Bu çalışmada CS-2500 ve CP-3000 cihazlarının analitik performanslarının değerlendirilmesi ve metot karşılaştırması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: APTT, PT ve D-dimer testleri için referans aralık doğrulama çalışması, her iki cihazda kesinlik, doğruluk değerlendirilmesi ve metot karşılaştırma çalışması yapılmıştır. Kesinlik değerlendirilmesi için iç kalite kontrol materyali, doğruluk değerlendirilmesi için dış kalite kontrol örnekleri kullanılmıştır. Referans aralık doğrulama ve metot karşılaştırma çalışması için toplam 220 hastanın örnekleri kullanılmıştır. Kesinlik ve doğruluk değerlendirilmesinde %CV ve % bias değerleri hesaplanmıştır. Cihaz karşılaştırma çalışmasında Blant – Altman, Passing – Bablok regresyon analizi ve korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Tüm çalışmalar CLSI protokollerine uygun şekilde yapılmıştır.

Bulgular: Her iki cihazda da APTT ve PT için hesaplanan %CV değerleri CLSI önerisi olan %5'in altında bulunmuştur. D-dimer kitleri CLSI'nın önerdiği kalite ölçütlerini karşılamaktadır. Her iki cihazda da doğruluk kabul edilebilir sınırlardadır. Üretici firmanın önerdiği referans aralıklar doğrulanmıştır. APTT, PT ve D-dimer için

regresyon denklemleri sırasıyla $y = -3,313 + 1,188x$, $y = -0,0399 + 1,048x$, $y = 0,155 + 0,655x$ şeklinde ve r değerleri sırasıyla 0,904, 0,978 ve 0,974 bulunmuştur.

Sonuç: CS-2500 ve CP-3000 cihazları yeterli doğruluk ve kesinlikte ölçüm yapmaktadır. Metot karşılaştırma çalışmasında cihazlar arasında farklı kitler kullanıldığı için ölçüm farklılıkları vardır ancak genel olarak kabul edilebilir düzeydedir. Her iki cihaz da rutin koagülasyon için laboratuvarlarda kullanıma uygundur. Koagülasyon testleri için sonuçların standardize edilmesi önemlidir. CP-3000 cihazı ülkemizde yeni kullanıma girdiği için karşılaştırma çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: analitik kimya yöntemleri, kan pıhtılaşma testleri, D-dimer, INR, parsiyel tromboplastin zamanı

ANALYTICAL PERFORMANCE EVALUATION OF SIEMENS SYSMEX CS–2500 AND ABBOTT CP–3000 DEVICES

ABSTRACT

Aim: Hemostasis tests are requested by clinicians for many purposes such as screening, diagnosis, and drug monitoring. Automatic coagulation devices have been used in the last 50 years and have been seriously developed. The diversity of the methods, kits and devices used, and being influenced by many preanalytical factors made standardization difficult in these tests. One of the most basic methods for standardization is method comparison. In this study, it was aimed to evaluate analytical performances of CS–2500 and CP–3000 devices and to compare methods.

Material and Method: Reference interval verification study, precision, trueness evaluation and method comparison study were performed for APTT, PT and D–dimer tests. IQC were used for precision assessment, EQC samples were used for trueness assessment. Samples from 220 patients were used for reference interval validation and method comparison study. In evaluating precision and trueness, % CV and % bias values were calculated. In the comparison study, Blant – Altman, Passing – Bablok regression analysis and correlation coefficient were used. All studies were carried out in accordance with CLSI protocols.

Results: The calculated % CV values for APTT and PT in both devices were below 5%, which is the CLSI recommendation. D–dimer reagents meet the quality criteria recommended by CLSI. Trueness is within acceptable limits on both devices. The reference ranges suggested by the manufacturer are verified. Regression equations for APTT, PT and D–dimer were found as $y = -3,313 + 1,188x$, $y = -0,0399 + 1,048x$, $y = 0,155 + 0,655x$, and r values were 0,904, 0,978, 0,974, respectively.

Conclusion: CS-2500 and CP-3000 devices measure with sufficient trueness and precision. In the method comparison study, there are measurement differences as different reagents are used between the devices, but they are generally acceptable. Both devices are suitable for use in laboratories for routine coagulation. It is important to standardize the results for coagulation tests. Since the CP-3000 device has recently been used in our country, it must be supported by comparison studies.

Keywords: Analytical Chemistry Methods, Blood Coagulation Tests, D-dimer, INR, Partial Thromboplastin Time



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Homeostaz, iç ortam bileşenlerinin belirli normal aralıklarda tutulmaya çalışılmasıdır. İç ortam normal aralıklarda kaldığı sürece yaşam devam edebilir. Bu nedenle vücuttaki her organ ve doku homeostazisin sağlanması için belirli görevler üstlenmiştir (1).

Homeostazisin sürdürülmesi için kan temel rol oynar. Kan akışının normal bir şekilde sağlanması, kanama veya tromboz olmaması için koagülasyon ve fibrinoliz arasında kurulmuş karmaşık, iyi düzenlenmiş dengeye hemostaz denir (2). Hemostatik dengenin bozulmasına ise koagülopati denir. Koagülopatilerin etiyolojisinde travma, karaciğer hastalıkları, sepsis, kanserler, cerrahi, ilaç tedavisi, konjenital veya akkiz faktör eksiklikleri gibi birçok neden olabilir. Koagülopatiler hastanelerde takibi yapılan çoğu hastada sıkça görülür ve tromboz veya kanamayla seyreden ciddi sonuçlar ortaya çıkarabilir. Koagülasyon testleri ise koagülopatilerin taranmasında, tanısında, takibinde ve ilaç etkinliği değerlendirmede sıkça kullanılmaktadır. Bu nedenle hemostatik parametrelerin hızlı, doğru, güvenilir bir şekilde ölçülmesi ve izlenebilir olması hasta sağlığı açısından oldukça önemlidir (3,4).

Ölçümler için günümüzde birçok cihaz kullanılmaktadır. Cihaz performansları kitlerle birlikte ölçüm sonuçlarını etkilemektedir (5). Cihazların performanslarını değerlendirmek ve metot verifikasyonu yapmak doğru sonuç verme açısından önemlidir.

Metot verifikasyonu; kullanılan metotların laboratuvar da rutin kullanım sırasında gerekli performansı sağlamanın koşullarını belirlemek, yeterli doğrulukta sonuç vermesini sağlamak ve belirtilen performansı kontrol altında tutmak amacı ile yapılan çalışmalar bütünüdür. Bakanlığımız hastane denetimlerinde kullandığı Sağlıkta Kalite Standartlarında metot verifikasyonunu opsiyonel bir kalite göstergesi olarak

bildirmiştir (6). Laboratuvara yeni gelen cihazlar da kullanıma girmeden önce metot doğrulama ve karşılaştırma çalışmaları yapılarak kullanıma alınmalıdır.

Ülkemizde Abbott (Abbott Park, Illinois, U.S.A.) ve Sekisui (Sekisui Medical Co. Ltd. 1-3., Nihonbashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo/103-0027, Japan) ortaklık ürünü olan CP-3000 otomatik koagülasyon cihazı yeni kullanıma girmiştir. Literatürde Siemens Sysmex CS-2500 (CS-2500) (Sysmex Corporation, 1-5-1 Wakinohama-Kaigandori, Chuo-ku, Kobe 651-0073, Japan) ve CP-3000 cihazlarının metot karşılaştırmaları hakkında bilgi yoktur. Bu çalışmada CS-2500 ve CP-3000 cihazlarının analitik performanslarının değerlendirilmesi ve protrombin zamanı (PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) ve D-dimer test ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMOSTAZ

Hemostaz bir damar hasarı (kesilme veya inflamasyon) sonrası kan kaybının en aza indirilmesi ve mümkünse durdurulması için vücutta gerçekleşen fizyolojik süreç olarak tanımlanır. Kanamanın durduğu nokta genellikle pıhtılaşma olarak adlandırılrsa da aslında sıralı adımlarla gelişen hemostatik sürecin sadece bir parçasıdır (7).

Hemostaz primer, sekonder ve tersiyer olarak üçe ayrılmıştır ancak bu süreçler birbirinden bağımsız değildir. Endotel zedelenmesini takiben gerçekleşen vazokonstriksiyon ve trombosit tıkaçının oluşması sürecine primer hemostaz, koagülasyon faktörlerinin etkinleşmesiyle fibrin tıkaç oluşturmaya sekonder hemostaz denir. Oluşan fibrin tıkaçının parçalanması ve kan akışının yeniden sağlanması sürecine ise fibrinoliz veya tersiyer hemostaz denir (8).

Damar endotel hücreleri, vasküler düz kaslar, trombositler, koagülan ve antikoagülan proteinler, fibrinolitik proteinlerin hepsi hemostaz sistemini oluşturur (9).

2.1.1 Primer hemostaz

Hemostaz sürecinin ilk basamağı olan bu evrede vasküler düz kaslar, damar endoteli ve trombositler görev alır. Endotel hücreleri yüzeylerinde bulundurdıkları reseptörler ve salgıladıkları çeşitli maddelerle kan akışının düzgün bir şekilde devam etmesini sağlarlar. Sağlıklı endotelden salgılanan prostasiklinler ve nitrik oksit (NO) trombositlerin agregasyonunu önler. Bu maddeler vazodilatör etki yapmalarının yanında trombositte adenosin monofosfat (AMP) düzeylerini artırıp agregasyonu inhibe eder. Endotel hasarı sonrası ise saniyeler içinde vasküler düz kaslarda vazokonstriksiyon gerçekleşir ve kan akışını azaltır (9).

Trombositler kemik iliğinde bulunan megakaryosit hücrelerinin çekirdek içermeyen fragmanlarından oluşmaktadır. 1860'lı yıllarda hemostazdaki kritik fonksiyonları keşfedilmiştir (10–13).

Trombosit sitoplazmasında alfa granüller, delta (yoğun, dens) granüller ve lizozomlar bulunur. Çeşitli biyolojik aktif maddeleri saklaması ve salgılaması ile trombositler, diğer hücrelerin işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar (14).

Trombositler, trombin tarafından uyarıldıkları zaman granüllerinden ve sitoplazmalarından 300'den fazla protein salgılayabilirler. Bu maddeler arasında Von Willebrand faktör (VWF), doku faktörü (TF), doku tromboplastini ve doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) bulunmaktadır. VWF, trombosit yapışması için gerekli bir plazma proteini olarak primer hemostazda görev almasının yanı sıra dolaşımdaki faktör (F) VIII'i stabilize ederek pıhtılaşmaya katkıda bulunur ve sekonder hemostazda da görev almış olur. TF ve TFPI da diğer hemostaz evrelerinde görev almaktadır (8,15,16).

Endotel hasarında trombositler glikoprotein (GP) Ia/IIa ve GP VI yoluyla direkt veya VWF – GP Ib /IX reseptörü aracılığıyla dolaylı yoldan açığa çıkan subendotelyal kollajene bağlanır ve buna adezyon denir. Bu bağlanma trombosit aktivasyonuna ve şekil değişikliğine neden olur. Aktivasyon sonucu trombosit alfa granüllerinden FV, fibrinojen (FI) ve VWF gibi proteinler; delta granüllerden epinefrin, adenosin difosfat (ADP), serotonin, inorganik polifosfat bileşikleri ve kalsiyum gibi protein olmayan bileşenler salınır. Trombosit sitoplazmasından ise tromboksan A₂ denilen en güçlü trombosit aktivatörü salınır ve ADP ile diğer trombositleri aktive eder. Trombositlerin tamamen aktivasyonu ile trombosit yüzeyindeki GPIIb/IIIa reseptörüne plazmadaki fibrinojen bağlanır ve trombositler agregasyon için şekil değiştirir. Agregasyonda GPIIb/IIIa proteini ana rol oynar ve sonuçta geçici, yumuşak bir trombosit tıkaçı oluşur (13,14,17).

Hemostazın ilerleyen evrelerinde dolaşımdaki pıhtılaşma faktörleri, yaralanma bölgesindeki primer trombosit tıkacı üzerinde hızla bir fibrin örgüsü oluşturur ve kan pıhtısını sabitler (16).

Trombositler sadece salgıladıkları maddelerle değil membranlarının makromoleküler enzim komplekslerinin tutunması için bir fosfolipid yüzeyi sağlamasıyla da plazma pıhtılaşmasını destekler ve hemostazın diğer aşamalarıyla ilişki sağlar (18). Ayrıca trombosit kontraktıl proteinleri, küçük yaralanmaların kenarlarını birbirine yaklaştırarak pıhtı retraksiyonuna aracılık eder (19,20).

2.1.2. Sekonder hemostaz

Bu evrede plazmada çözünür olan fibrinojen çözünmeyen fibrine (F1a) çevrilir ve buna koagülasyon evresi denilebilir.

Hücre temelli pıhtılaşma modeline göre, koagülasyon üç ayrı aşamaya ayrılabilir. Bu aşamalar, düşük miktarlarda aktif pıhtılaşma faktörlerinin üretildiği bir başlatma (inisiyasyon) aşaması; aktif pıhtılaşma faktörlerinin miktarının arttığı yükselme (amplifikasyon) fazı ve pıhtılaşma faktörlerinin, aktiveleştirilmiş trombositlerin prokoagülan membranlarına bağlandığı ve fibrin pıhtılarının olduğu bir yayılma (propagasyon) fazıdır. Çeşitli kaynaklarda amplifikasyon ve propagasyon fazı tek aşama olarak alınıp üçüncü aşama pıhtının lokalize edildiği terminasyon aşaması olarak anlatılmıştır (21).

Hücre temelli modelle beraber kaskad/şelale modelindeki intrinsek ve ekstrinsek yol şeklindeki klasik ayırım hala yaygın olarak kullanılmaktadır (22,23).

2.1.2.1. Kaskad/şelale modeli

Bu modelde ayırım ekstrinsek, intrinsek ve ortak yol şeklinde yapılmıştır. Ekstrinsek yol (TF yolu) TF'nin serbest bırakılmasıyla başlatılır. İntrensek yol (kontakt

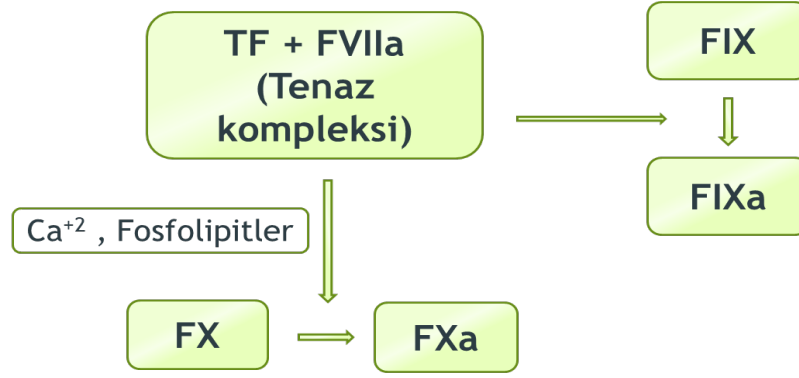
aktivasyon yolu) plazmanın temas faktörlerinin [yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK), prekallikrein ve FXII] aktivasyonu ile başlatılır. Ortak yol, ekstresek veya intrinsek yolların sonucunda FX'un üretilmesiyle fibrin pıhtısı oluşması arasındaki adımları içerir. Bu yollar in vivo ve in vitro ortamda aynı şekilde ilerlemez. İn vitro olarak, temas faktörleri, pıhtılaşma kaskadı aktivasyonunda önemli bir rol oynar, ancak bu faktörler in vivo olarak fizyolojik pıhtılaşmada normalde rol oynamaz. Yani ekstresek yolak normal fizyolojik hemostazda daha önemli yere sahiptir. Bununla beraber in vivo hemostazda temas faktörleri gerekmemesine rağmen, mikroorganizmalardan türetilen uzun zincirli polifosfatlar temas faktörlerini aktive edebilir ve mikroorganizmalara konak tepkisinde rol oynayabilir (16).

2.1.2.1.1. Ekstresek yolak

Düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi subendotelyal hücreler normalde kanla temas etmezler. Vasküler olmayan bu hücrelerin eksprese ettiği integral membran proteini olan TF, plazma proteini FVII için bir reseptör görevi yapar. Ekstresek yolak, endotel hasarında vasküler olmayan hücre yüzeylerinde yer alan TF'nin açığa çıkması sonucu TF ile FVIIa arasında bir kompleks oluşmasıyla başlatılır (23). Fizyolojik konsantrasyonlarda, TF ile bağlanmayan FVIIa, çok az aktivite gösterir. Zimojen FVII'nin FVIIa'ya ilk dönüşüm mekanizması tartışmalıdır. Ancak büyük olasılıkla TF etkisinden değil otokatalitik aktivasyondan kaynaklanmaktadır (24,25).

TF ve FVIIa kompleksine ekstresek yolun tenaz kompleksi denir. Bu kompleks kalsiyum (Ca^{+2}) (büyük kısmı aktive trombositlerden gelir) ve negatif yüklü fosfolipitler (hücre zarlarının ana bileşenleri) varlığında, proteolitik etkiyle FX'u yine bir proteaz olan FXa'ya dönüştürür. Bu kompleks aynı zamanda FIX'u da aktive eder (26,27).

Ekstresek yolakta görev alan faktörler Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



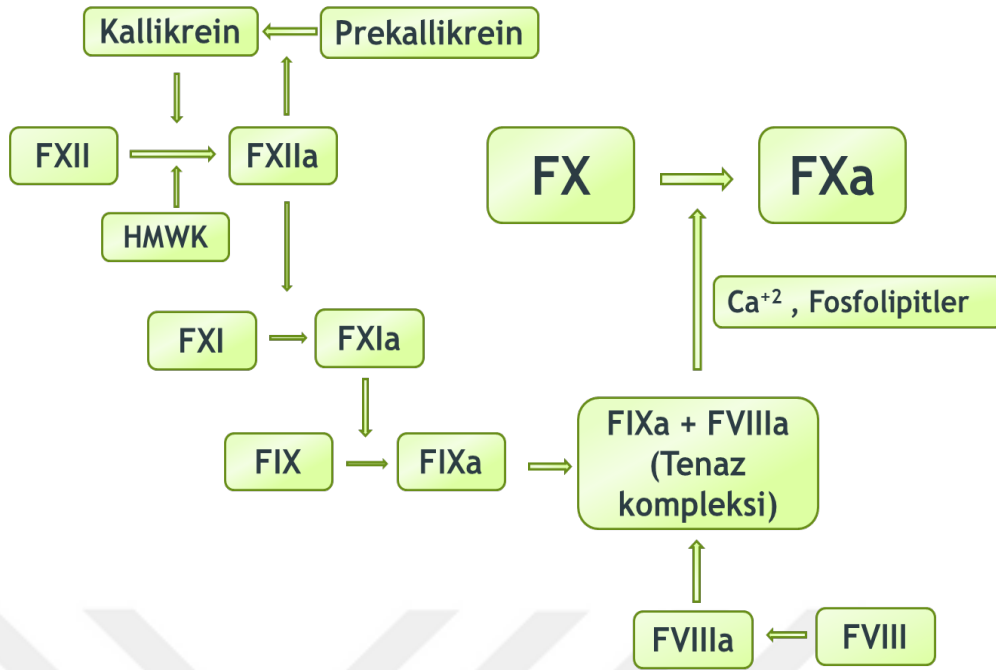
Şekil 2. 1. Ekstresek yolak

2.1.2.1.2. İntrensek yolak

Hageman faktörü (FXII) adı verilen bir plazma proteini, cam veya aktifleştirilmiş trombositin membranı gibi negatif yüklü bir yüzeye temas ettiğinde, aktifleşir ve FXIIa oluşur. Trombosit zarına tutunabilen HMWK, FXII'nin negatif yüklü yüzeye tutturulmasında kofaktör görevi görür. Ancak, FXII'nin FXIIa'ya HMWK destekli dönüşüm hızı sınırlıdır. Az miktarda FXIIa biriktikten sonra, prekallikreini kallikreine dönüştürür. Kallikrein, pozitif geri besleme ile FXII'nin FXIIa'ya dönüşümünü hızlandırır. FXIIa, prekallikreinden kallikrein oluşturarak kendi kendini artırmasının yanında proteolitik etkiyle FXI'i FXIa'ya dönüştürür. FXIa ise FIX'u proteolitik etkiyle aktifleştirir (28).

FIXa, FVIIIa, Ca^{+2} ve negatif yüklü fosfolipitler ile intrinsek yolun tenaz kompleksini oluşturur. FVIIIa'nın kofaktör olarak görev yaptığı bu reaksiyonda tenaz kompleksi FX'u FXa'ya dönüştürür (29).

İntrensek yolakta görev alan faktörler Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



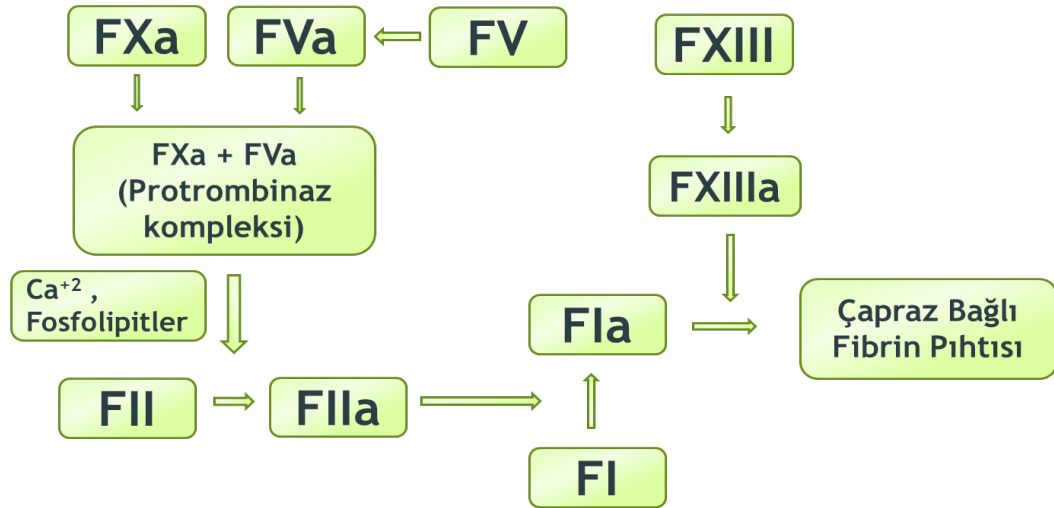
Şekil 2. 2. İntrensek yolak

2.1.2.1.3. Ortak yol

Ortak yol, intrinsek yoldan veya ekstrinsek yoldan veya her ikisinden FX'un aktivasyonu ile başlar. FXa, ortak yolun ilk proteazıdır. FXa, bir protrombinaz kompleksi oluşturmak için kofaktör FVa ile birleşir. Protrombinaz kompleksi protrombini (FII), Ca^{+2} ve fosfolipitler varlığında aktif enzim olan trombine (FIIa) dönüştürür. Trombin ise fibrin pıhtısını oluşturmak için plazmada çözünen fibrinojeni fibrin monomerlerine dönüştürür ve bu monomerler hızla polimerize olarak pıhtıyı oluşturur (26,27).

Trombin FXIII'ü de aktive eder ve FXIIIa fibrin polimerleri arasında çapraz bağ oluşturur ve pıhtıyı kararlı hale getirir (29). Trombin ayrıca protrombinden yeni trombin oluşumunu katalize edebilir ve koagülasyonun etkili bir şekilde amplifikasyonu ile sonuçlanan FVa ve FVIIIa kofaktörlerinin oluşumunu katalize edebilir (30).

Ortak yolda görev alan faktörler Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. Ortak yolak

2.1.2.1.4. Doğal antikoagülan sistem

Endotel hasarı olan bölgede bir fibrin – trombosit pıhtısı oluştuğunda, çevredeki hasarsız bölgelerde trombotik tıkanmayı önlemek için pıhtılaşma süreci sınırlandırılmalıdır. Pıhtılaşma kontrol edilmezse tüm vasküler sistem boyunca yayılabilir (31).

Oluşan pıhtının sınırlarını düzenleyen üç tür doğal antikoagülan vardır: antitrombin (AT, eski adı: antitrombin III), TFPI ve protein C sistemi (32,33).

AT, trombin üretiminin ve fonksiyonunun en önemli inhibitörlerinden biri olarak kabul edilir. Endotelial hücreler üzerinde heparin benzeri moleküllere bağlanarak aktive olan AT; trombin, FIXa, FXa, FXIa ve FXIIa gibi diğer serin proteazların aktivitesini inhibe eder. Heparin, antitrombinin yaptığı bu doğal proteaz inhibisyonunu güçlü bir şekilde artırır (8).

TFPI, trombositlerde ve küçük damarların endotelinde bulunan, insanda üç izoformu bulunan bir proteindir. Dolaşımdaki TFPI'nin yüzde sekseni lipoprotein şeklinde geri kalan %20'si ise serbest halde bulunur. TFPI, pıhtılaşmayı iki farklı

şekilde inhibe eder. Birincisi, serbest FXa'nın doğrudan inhibisyonu yoludur. Diğer yolda TFPI, FXa ve TF/FVIIa'ya kompleks oluşturur ve geçici TF/FVIIa/FXa kompleksi ile pıhtılaşmayı inhibe eder (34–36).

Protein C sistemi şunlardan oluşmaktadır: trombomodulin, protein C ve protein S. Trombomodulin, sağlam endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan transmembran bir proteindir. Trombin, trombomoduline bağlandığı zaman protein C aktive olur. K vitaminine bağımlı bir plazma glikoproteini olan protein C aktif hale geldiğinde FVa ve FVIIIa inaktivasyonu antikoagülan olarak görev yapar.

Protein C aktivitesi, başka bir K vitaminine bağımlı inhibitör kofaktör protein S tarafından arttırılır. Protein S, FVa ve FVIIIa'ya karşı aktivitesini arttırarak protein C'ye bir kofaktör görevi görür. İnsan plazmasında protein S'nin yaklaşık %30'u serbest protein olarak dolaşır; geri kalan kısım tamamlayıcı düzenleyici protein C4b bağlayıcı proteine bağlanır. Sadece serbest protein S formu aktifleştirilmiş protein C için bir kofaktör olarak işlev görür (37,38).

Çalışmalar, protein S'nin sadece aktive protein C için değil TFPI'ya bağlı doğrudan FXa inhibisyonu için de önemli bir kofaktör olarak görev yaptığını göstermiştir. TFPI–protein S kompleksi plazmada bulunur ve protein S eksikliği de düşük TFPI seviyeleri ile sonuçlanır, bu da protein S'nin plazmada TFPI stabilitesini geliştirdiğini gösterir (35,39,40).

2.1.2.2. Hücre temelli model

Kaskad/şelale modeli pıhtılaşma anlayışında önemli bir ilerlemeyi temsil etmiştir ve faydalı bir model olarak uzun yıllar hizmet etmiştir. Ancak yakın tarihli klinik ve deneysel çalışmalar, kaskad/şelale hipotezinin in vivo hemostaz olaylarını

tamamen yansıtmadığını göstermektedir ve bu modelin bazı eksiklikleri anlaşılmaya başlanmıştır (41).

Kaskad/şelale modelinde FXII, prekallikrein veya HMWK eksikliklerinde in vitro testler belirgin şekilde uzamakta iken neden klinik kanama eğilimi olmadığına dair bir açıklama yoktur. Ayrıca kaskad/şelale modeli, intrinsek yolağın tenaz faktörleri olan FVIII ve FIX'a ekstrinsek yolakta ihtiyaç olmamasına rağmen, bu faktörlerin eksikliğinin klinik olarak ciddi kanama ile sonuçlanmasının nedenini de açıklayamamaktadır (42).

2000'li yıllarda FVIIa/TF kompleksinin sadece FX'u değil, aynı zamanda FIX'u da aktive ettiği ortaya çıkarılmıştır. Bu veriler, ekstrinsek ve intrinsek yolların farklı işlevlerini göstermiş ve önceki modellerin yenilenmesi gerektiğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar hücre temelli hemostaz modelinin altını çizerek, pıhtılaşmanın inisiyasyon ve propagasyon aşamalarının farklı hücrelerin yüzeyinde meydana geldiğini göstermiştir. Kabul edilen yeni modele göre, FVIIa/TF kompleksinin aktivitesi, in vivo hemostazda ana başlatıcı olaydır (24,41).

2.1.2.2.1. İnisiyasyon fazı

Hücre temelli modelde inisiyasyon aşaması, kaskad/şelale modelinde ekstrinsek yolak ile örtüşür. İnisiyasyon aşamasında görev alan proteinler ve gerçekleşen olaylar ekstrinsek yolakla aynıdır. Bu modele göre, intrinsek FXI–FXII yolu sadece ekstrinsek TF yolu tarafından başlatılan bir amplifikasyon döngüsü görevi görür. İnisiyasyon aşamasında TF taşıyan hücrelerde az miktarda trombin üretilir ve bu trombinin başlıca işlevleri, trombositlerin aktivasyonu, aktive pıhtılaşma faktörleri için reseptörlerin ve bağlanma alanlarının açığa çıkarılmasıdır (8).

2.1.2.2.2. Amplifikasyon fazı

Trombositler aktivasyon sonucu yüzeylerinde kısmen aktifleştirilmiş FV formları eksprese ederler. Trombin, FV'yi FVa ya dönüştürür ve protrombinaz aktivitesini artırır. İnisiyasyon aşaması sırasında oluşan trombin, yine aktifleştirilmiş trombosit yüzeyinde FVIII'i aktive eder. FVIII/VWF kompleksi ayrışır ve VWF hasarlı bölgede daha fazla trombosit adezyonu ve agregasyonu olmasına aracılık eder. Ayrıca bu az miktardaki trombin, trombosit yüzeyinde FXI'i aktive eder. FVIIIa, aktif trombositlerin yüzeyinde FIXa'yla beraber FXa oluşumunu desteklemek için bir kofaktördür. Faktörlerin birbirlerinin etkilerini artırdığı bu evreye hücre temelli modele göre amplifikasyon fazı denir (8,43,44).

2.1.2.2.3. Propagasyon fazı

Propagasyon fazı, aktifleştirilmiş trombositlerin yüzeyi gibi prokoagülan fosfolipitleri içeren yüzeylerde meydana gelir. İnisiyasyon fazı sırasında aktifleştirilen FIXa, trombosit yüzeyinde FVIIIa'ya bağlanabilir. İlave FIXa da amplifikasyon fazı sırasında aktifleşen trombosit bağlı FXIa tarafından karşılanır. FXIa, FIX'u FIXa'ya dönüştürür ve daha sonra trombinle aktive edilmiş FVIII ile birleştirir. Fosfatidilserine maruz kalan trombosit hücre zarlarında, FIXa – FVIIIa birleşimi yani tenaz kompleksi, FX'un FXa'ya dönüşümünü katalizler. FXa, amplifikasyon fazı sırasında aktifleşen trombositte bağlı FVa ile hızla birleşir. FXa – FVa birleşimi yani protrombinaz kompleksi fibrin lifleri oluşturmaya yeterli miktarda bir trombin patlamasına neden olur. Son adım olarak, trombin ile aktive edilen FXIIIa, bitişik fibrin zincirleri arasında kovalent çapraz bağların oluşumunu katalize ederek elastik, polimerize bir fibrin pıhtısı üretir (31,37,43,45).

Pıhtının sınırlandırıldığı son evreye hücre temelli modelde terminasyon fazı denir (31). Bu modelde protein C sistemi ve AT trombinin propagasyon fazının düzenlenmesinde etkilidir, TFPI ise öncelikle FVIIa – TF kompleksini inhibe ederek inisiyasyon fazının düzenlenmesinde etkilidir (32,33).

2.1.3. Tersiyer hemostaz (Fibrinoliz)

Fibrinoliz, oluşan fibrin tortularının zamanında uzaklaştırılmasını sağlayan ve böylece kan akışının devamını sağlayan, hassas şekilde düzenlenmiş bir evredir (46). Sadece pıhtının eritilmesi için değil doku onarımı için de gereklidir.

Normal akan kanda, fibrinoliz inhibitörlerinin olması nedeniyle fibrinoliz gerçekleşmez. Fibrinoliz ayrıca, pıhtı yokken fibrinolizi önlemeye yarayan optimal işlev için kofaktör olarak fibrin gerektirir (47).

Karaciğerde sentezlenen plazminojen, en önemli fibrinolitik proteazdır. Endotel hasarı sonrası salgılanan plazminojen aktivatörleri tarafından plazmine dönüştürülür ve plazminojen aktivasyonu, fibrin ile güçlendirilir. Plazmin polimerize fibrini parçalara ayırır ve oluşan ürünlerin hepsi topluca fibrinojen yıkım ürünleri olarak adlandırılır. Çapraz bağlı fibrin molekülleri FXIIIa tarafından oluşturulur ve D–dimer fragmanı bu moleküllerin bozulmasıyla üretilir (46).

Doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) memelilerde plazminojenin 2 fizyolojik aktivatörüdür. tPA, dolaşımdaki ana plazminojen aktivatördür, uPA da ekstravasküler dokudaki ana aktivatördür. tPA; bradikinin, histamin, asetilkolin, alfa adrenerjik ajanlar ve trombosit aktive edici faktör dahil çeşitli tetikleyicilere yanıt olarak endotel hücreler tarafından salgılanır. tPA'nın enzimatik aktivitesi fibrin yokluğunda çok zayıftır. uPA; fibroblast benzeri hücreler,

epitel hücreleri, monositler ve endotel hücreleri tarafından sentezlenir. tPA'nın aksine uPA, fibrin yokluğunda plazminojeni aktive edebilir (48,49).

Trombin ile aktiveleştirilebilen fibrinoliz inhibitörü (TAFI), Plazmin inhibitörü (eski adı antiplazmin) ve plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI – 1 ve PAI – 2) fibrinolitik sistemi düzenleyen major inhibitörlerdir (50). Trombin ile aktive edildiğinde TAFI, plazmin oluşumunu azaltır, fibrin pıhtısını stabilize eder ve pıhtılaşma ile fibrinoliz arasında düzenleyici bir bağlantı kurar (46).

2.2.HEMOSTAZ İLE İLGİLİ TESTLER

Anormal hemostaz süreci klinik açıdan ciddi sonuçları olan birçok hastalıkla ilişkili olabilir. Bu hastalıkların en önemlileri hemofili, von Willebrand hastalığı (VWH), arteriyel veya venöz tromboza neden olan çeşitli trombofilik bozukluklardır. Bu hemostaz bozuklukları kalıtsal veya edinsel olabilir.

Şüpheli veya klinik olarak ortaya çıkan hemostaz bozukluklarına yaklaşımda pıhtılaşma testleri şu dört ana nedenle kullanılır: yüksek riskli cerrahi geçirecek hastaların ameliyat öncesi taraması, artmış kanama eğilimini düşündüren klinik öyküsü olan hastaların tanı için araştırılması, bilinen hemostatik anormallikleri olan hastaların izlemi, çeşitli nedenlerle hemostaz üzerine etkili tedavi alan kişilerin tedavilerinin takibi. Bu amaçlarla modern hemostaz laboratuvarı, doğru ve eksiksiz değerlendirmeler için yeterli testleri çalışabilmelidir (33).

Hemostaz işleyişi değerlendirilirken evre evre ele alınmakta, primer, sekonder ve tersiyer hemostaz değerlendirmesi için farklı testler bulunmaktadır. Bazı testler rutin laboratuvarlarda uygulanabilirken bazıları özelleşmiş hemostaz laboratuvarlarında yapılmaktadır. Bu nedenle rutin hemostaz testleri ve özel hemostaz testleri olarak da ayırım yapılmıştır (51).

2.2.1. Primer hemostaz testleri

Primer hemostaz değerlendirilirken bu aşamada görevli olan trombositler, endotel hücreleri ve VWF gibi proteinler miktar ve aktivite yönleriyle değerlendirilir. Bu amaçla kanama zamanı, Von Willebrand panel testleri, trombosit sayısı ve fonksiyon testleri kullanılabilir.

Kanama zamanı 1910 yılında Duke tarafından keşfedilmiştir ve ilk in vivo trombosit fonksiyon testidir. Ivy yöntemi ile geliştirilmiştir ancak buna rağmen duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür. Ayrıca girişimsel ve zaman alıcı bir testtir. Trombosit sayısı <75 bin/mm³ ise yapılmaz. Özel laboratuvar ve ekipman gerektirmemesi nedeniyle tarama testi olarak kullanılmıştır. Ancak dezavantajlarına da bakıldığında artık tarama testi olarak kullanılması önerilmemektedir (52,53).

Trombosit sayısı ve boyutu periferik yaymanın mikroskopta incelenmesiyle veya otomatize tam kan sayımı cihazlarıyla ölçülür. Bu testlerle trombosit sayısı düşüklüğü, yüksekliği, boyutunun artması, azalması belirlenir.

Trombosit fonksiyonlarını değerlendirmek için ristosetin, ADP, epinefrin, araşidonik asit, kollajen gibi agonistlerin eklenmesinin ardından adezyon, agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarının gerçekleşip gerçekleşmediği gözlemlenir. Agregometri, luminoagregometri, tromboelastografi, akan hücre ölçümü (flow sitometri) testleri bu amaçla yapılan testler arasındadır. Tromboelastografi ayrıca hemostazın tüm evrelerinde viskozite değişikliklerini analiz eder ve grafiksel olarak gösterir. Trombosit fonksiyon analizi (PFA – 100) testi VWH için tarama testi olarak kullanılmaktadır.

Trombosit fonksiyon testlerinin çoğu eğitimli personel gerektiren, zahmetli dolayısıyla pahalı testlerdir ayrıca trombosit sayısından etkilendiği unutulmamalıdır (52,54,55).

2.2.2. Sekonder hemostaz testleri

Bu evrede pıhtılaşma faktörleri görev aldığı için değerlendirme aşamasında faktör düzeyleri ve faktörler enzim olduğu için aktiviteleri ölçülebilir. Aktivite kavramında zaman olduğundan faktör aktivitelerini zaman üzerinden ölçmek için fibrinojenin fibrine dönüşüm süresi ölçülür. Her bir faktörün ayrı ayrı aktivitesini ölçmek yerine de klasik koagülasyon şelale modeline göre intrinsek, ekstrinsek ve ortak yol şeklinde ayrılan yollarda görev alan faktörlerin aktiviteleri toplu olarak ölçülür (56).

İn vivo meydana gelen olayların, bu yolları 'taklit eden' in vitro testlerden farklı olduğunu bilmek önemlidir. Laboratuvarlarda, plazmaya bir doku tromboplastini (TF + fosfolipid kaynağı) ve kalsiyum klorür eklenmesiyle başlatılan ekstrinsek yolak, PT testi ile ölçülür. Plazmaya temas faktörlerini aktive eden bir yabancı madde kaynağı, fosfolipid kaynağı ve kalsiyum klorür eklenmesiyle başlatılan intrinsek yolak APTT testi ile ölçülür. APTT ölçümü için kullanılan reaktiflerde bir aktivatör madde (elajik asit, silika, kaolin gibi) vardır ve tromboplastin değil doku faktörü içermeyen sadece fosfolipid kaynağı kullanılır yani parsiyel tromboplastin eklenmiş olur (33).

Laboratuvarlarda kullanılan reaktifler, içerdiği fosfolipit ve tromboplastin kaynağı ile aktivatörlerin farklılığı nedeniyle çok çeşitlidir. Hemostatik eksikliğin şiddeti ile pıhtılaşma testi sonucunun uzama derecesi arasında bir ilişki vardır ancak kullanılan reaktif çeşitliliği nedeniyle reaktiflerin farklı pıhtılaşma faktörü eksikliklerine analitik duyarlılığı ve yanıt verebilirliği oldukça geniştir. Tüm reaktifler şiddetli veya orta derecede faktör eksikliklerini güvenilir şekilde gösterir ancak hafif eksikliklerde yani faktör eksikliği/aktivite azlığı %30'un üstüne çıkmadıkça bu testlerde uzama olmaz. Testlerin birinde bariz şekilde uzama varsa o yollaktaki faktörlerden en az birinin ya miktarı ya da aktivitesi azalmış (inhibitör etkisiyle) demektir (57).

Karışım testleri uzama sebebi faktör miktarının azalmasına mı inhibitör varlığına mı bağlı ayırt etmek için kullanılır. Karışım testlerinde bir uygunsuzluk görülürse uzama hangi yolaktaysa o yolaktaki faktörlerin miktar veya aktivite ölçümleri yapılarak tanıya gidilir.

Trombin zamanı (TT) ortak yolun değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Plazmaya trombin eklenmesiyle fibrinojenin fibrine dönüş süresi ölçülür. Özellikle fibrinojenden fibrin oluşum zamanını gösterdiği için önemlidir. Reptilaz zamanı yine fibrinojen bozukluklarını ölçmede kullanılan TT ile aynı yöntemle yapılan bir testtir. Reptilaz da trombin gibi fibrinojeni fibrine çeviren, yılandan elde edilen bir zehirdir. Trombin heparinden etkilenir ancak reptilaz etkilenmez. Bu nedenle pratikte TT'de uzama yapan en önemli neden olan örneğe heparin bulaşı olup olmadığını anlamak için kullanılabilir (58).

Aktive pıhtılaşma zamanı (ACT) testi ameliyatlar sırasında veya özellikle kardiyolojik işlem uygulanmış hastalarda, sistemik heparin tedavisini izlemek için kullanılan bir testtir. APTT kardiyopulmoner baypas sırasında kullanılan yüksek heparin konsantrasyonlarında kullanılamadığı için ACT kullanılmıştır. Ancak günümüzde düşük molekül ağırlıklı heparinler kullanıldığı ve heparin izlemi yapılmasına gerek kalmadığı için bu testin kullanımı azalmıştır (50).

Doğal antikoagülan sistemde görev alan AT, protein C ve S aktivite ölçümleri de yapılmaktadır (59,60).

2.2.3. Tersiyer hemostaz testleri

Tersiyer hemostazı yani fibrinolizi değerlendirmek için son ürün olan fibrin yıkım ürünleri (FDP) ve D-dimer ölçümü yapılır. Fibrinojen yıkım ürünlerinin varlığı, fibrinojen, fibrin monomerleri veya çapraz bağlı fibrinin parçalanmasından

kaynaklanabilir. D–dimer ise çapraz bağlı fibrin pıhtısının parçalandığının bir göstergesidir. D–dimer negatifse ve fibrin yıkım ürünleri varsa pıhtılaşma sistemi aktive olmamış, direkt fibrinojen yıkımı gerçekleşmiş demektir. D–dimer ölçümü klinikler tarafından özellikle pulmoner tromboemboli tanısını dışlamak için sıklıkla istenmektedir.

Bu evrede görev alan proteinlerden plazminojen ve PAI miktarları da ölçülmektedir. Plazminojen eksikliğinde tromboza, PAI eksikliğinde ise kanamaya yatkınlık görülmektedir (46).

2.3. APTT, PT VE D–DİMER ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

Hemostaz değerlendirilmesinde kullanılan çok sayıda test için geliştirilmiş birçok ölçüm yöntemi bulunmaktadır.

2.3.1. APTT ve PT ölçüm yöntemleri

APTT ve PT ölçümü yapılırken fibrin pıhtısının oluşma zamanı ölçülür. PT sonuçları saniye, protrombinin normale göre % aktivitesi şeklinde veya Uluslararası Normalize Edilmiş Oran (INR) şeklinde verilir.

Pıhtı oluşma zamanının tespit edilebilmesi için çeşitli yöntemler vardır. En sık foto – optik yöntem, mekanik yöntem ve visko – elastik yöntem kullanılır.

Foto – optik yöntemde pıhtı oluştuğu zaman örnekteki bulanıklık, optik yoğunluk değişmekte ve optik kaynak çeşitli dalga boylarında yaptığı ölçümlerde bu değişikliği tespit etmektedir. Pıhtının oluşum süresi sonuç olarak verilir, bazı analizörlerde pıhtı oluşum eğrisi de verilebilir. Temel olarak hepsinde bir hareket dedektörü olan farklı mekanik yöntemler geliştirilmiştir. Bazı sistemlerde küvetin dibinde metal bilye mıknatısla hareket ettirilir. Fibrin pıhtısı bilyenin hareketini durdurunca ölçüm sonlanır. Başka bir teknik ise sabit duran bilyenin dönen küvetin

içinde olmasıdır. Fibrin pıhtısı oluşunca bilyeyi yerinden oynatır ve ölçüm sonlanır. Visko – elastik yöntemde hasta örneğini içeren bir küvete bir prob sokulur. Daha sonra prob küvet içinde döndürülür veya küvet sabit bir prob etrafında döndürülür. Küvetin proba göre hareketindeki değişiklikler, bu kinetiklere ilişkin ölçümler ve elde edilen fibrin pıhtısının kuvveti ile fibrin oluşumu ve fibrinolizin kinetiklerini yansıtan bir eğri olarak sonuç verilir (61).

2.3.2. D–dimer ölçüm yöntemleri

D–dimer ölçümü kalitatif veya kantitatif şekilde yapılabilir. Kalitatif ölçüm için genellikle lateks aglütinasyon yöntemi kullanılır. Bu yöntemde reaktif ve plazma kitten çıkan lamda karıştırıcı yardımıyla 3 dakika karıştırılır. Güçlü ışık altında siyah zeminde beyaz çökelme olup olmadığına bakılır. Bu yöntem daha çok hasta başı cihazlarda tercih edilmektedir. Eğer pozitif gelirse kantitatif test yapılabilir. Kantitatif sonuç için ise enzim bağımlı immün sorban yöntem (ELISA), immünfloresan, lateks destekli immüntürbidimetri veya kemilüminesans yöntemlerle ölçüm yapılır. ELISA yöntemi dışındakiler otomatik cihazlara adapte edilmiş ve günümüzde daha çok tercih edilmektedir (62).

Koagülasyon testleri birçok preanalitik faktörden etkilenmektedir. Hemostaz testlerinde preanalitik etkiyi azaltma amacıyla örnek alımı, saklaması, taşınması ve reddinin standardize edilmesi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] H21–A5 protokolünü yayınlamıştır. Bu protokolde koagülasyon testleri için %3,2 oranında trisodyum sitrat içeren tüpler kullanılması ve antikoagülan – plazma oranının 1/9 olması önerilmektedir. Hematokrit değeri %20 – 55 arasında olmayan örneklerde antikoagülan – plazma oranı bozulacağı için tüpteki antikoagülan oranında düzeltme yapılması önerilmektedir. PT ve D–dimer

testleri için alınan örneklerde oda sıcaklığında 24 saate kadar ölçüm yapılabilirken APTT için 4 saat içinde ölçümlerin yapılması önerilmektedir. Pıhtılı, yanlış antikoagülanlı tüpe alınan, tüpteki seviyenin %10 üstünde veya altında alınıp antikoagülan oranını bozan örneklerin reddedilmesi önerilmektedir. Ayrıca genel olarak ciddi hemoliz, lipemi ve ikter de bu testlerde interferansa neden olacağı için reddedilmelidir (63).

2.4. YÖNTEM DEĞERLENDİRİLMESİ

Çoğunlukla ticari firmalar tarafından daha nadiren de klinik laboratuvarlar tarafından birçok ölçüm yöntemi geliştirilmekte ve kullanıma sunulmaktadır. Yeni geliştirilen testler ve yöntemler performansları değerlendirilmeden rutin laboratuvarlarda kullanılamazlar. Bu nedenle rutinde kullanılmadan önce performanslarının değerlendirilip onaylanması gerekmektedir (64).

Ticari firmaların ve laboratuvarların kullanıma sunduğu bu ürünlerin farklılıklarının standardize edilmesi için kullanılan temel yöntemler kalibrasyon ile standardizasyon, yöntem karşılaştırma ile standardizasyon ve referans sistem ile standardizasyondur (65).

CLSI dünya çapında standardizasyonu sağlamak için yapılması gerekenleri içeren çeşitli protokoller yayınlamıştır. Bu protokollerde geçerli kılma (validasyon) ve doğrulama (verifikasyon) uygulamaları önerilmektedir (66).

Validasyon; yeni geliştirilen yöntemin, testin veya cihazın amaçlanan kullanımı için kabul edilebilir, uygun ve güvenilir olduğunu yapılan birçok deneyle göstermektir (67). Verifikasyon, önceki deneylerde validasyon uygulaması yapılmış ürünlerin üreticilerinin yani ticari firmaların veya klinik laboratuvarın, sağladığı verilerin doğruluğunu gösterme çalışmasıdır (68).

Cihazların çoğunu ticari firmalar üretmekte olup validasyonunu yapmaktadırlar. Bu validasyon verileri kullanıcılara sağlanmaktadır. Laboratuvarlar kullanıcı durumunda oldukları bu cihazları ve yöntemleri validasyona gerek duymadan sadece verileri doğrulamak için verifikasyon çalışması yaparak kullanıma başlayabilirler. Yöntem değerlendirme çalışmalarında kesinlik (presizyon), doğruluk (trueness), analitik duyarlılık (sensitivite) ve özgüllük (spesifite), rapor edilebilir aralık, referans aralık, girişim yapan maddeler (interferans), örnek stabilitesi, taşınma (carry – over) gibi parametreler kullanılır. Validasyon çalışmalarında geniş bir değerlendirme yapılması gerekirken verifikasyon çalışmalarında bu parametrelerin hepsi kullanılmayabilir, hangi parametrelerle değerlendirme yapılacağı yöntemin veya cihazın türüne göre değişmektedir. (69).

2.4.1. Kesinlik

Kesinlik, belli koşullar altında aynı veya benzer maddelerin tekrarlanan ölçümlerinden elde edilen değerlerin yakınlığı olarak tanımlanmıştır. Kantitatif olarak genellikle standart sapma (SD), varyans veya varyasyon katsayısı (CV) ölçümleriyle ifade edilir. Koşulların değişmesine göre kesinlik 3 bileşene ayrılmıştır. Bunlar tekrarlanabilirlik (çalışma içi), tekrar üretilebilirlik ve ara kesinliktir. Ara kesinlik, toplam kesinlik olarak da adlandırılmıştır. Ara kesinlik kendi içinde çalışma arası, gün içi, günler arası ve laboratuvar içi (cihazlar arası) şeklinde ayrılmıştır. CLSI EP05–A3 protokolü kesinlik değerlendirilmesi için örneğin en az 20 gün boyunca, günde iki çalışma yapılarak her çalışmada iki kere ölçülmesini önermiştir (69).

2.4.2. Doğruluk

Doğruluk, geniş bir ölçüm sonuçları serisinden elde edilen ortalama değer ile gerçek değer arasındaki fark olarak tanımlanır. Ortalama değer ile gerçek değer

arasındaki fark bias olarak ifade edilir. Örneğin en az iki ölçüm sonucu ortalaması ve referans yöntemle ölçüm sonucunun farkının alınmasıyla hesaplanabilir. Birçok analit için referans materyal ve ölçüm yöntemi tanımlanmamıştır. Referans materyali olmayan analitler için insan plazma havuzundan, iç kalite kontrol örneklerinden veya dış kalite örnekleri ölçümüyle de hesaplanabilir. Referans yöntem yokluğunda ise yaygın olarak kullanılan, doğruluğu kanıtlanmış bir yöntemle karşılaştırılarak hesaplama yapılır (66,70).

2.4.3. Referans aralık doğrulama

Özellikleri iyi tanımlanmış referans bireylerden oluşan bir grupta (örnek olarak 18 ve 65 yaşları arasındaki görünüşte sağlıklı erkek ve kadınlar gibi) sonuçların ortalaması alınıp ortalamanın 2 SD üstü ve altı tanımlanır. Bu değerlere o grup için referans değerler denir. Referans aralık, alt referans sınırından üst referans sınırına kadar olan değerlerin aralığı olarak tanımlanır. Bazı durumlarda yalnızca bir referans sınırı önemlidir. Genellikle üst referans sınırı tanımlanır ve 0'dan üst referans sınırına kadar olan aralığa referans aralık denilebilir. Referans aralık çalışmaları görece fazla kişi sayısı içerir bu nedenle yapılmaları zordur. Birçok laboratuvar üretici firmaların verdiği referans aralıklarını kullanmaktadır. Ancak her popülasyonun referans aralığı farklı olacağı için bu verilerin doğrulanması gerekmektedir. Referans aralığının doğrulanması, az sayıda referans birey kullanarak, üretici firmanın bildirdiği, başka bir laboratuvar da kullanılan veya başka bir çalışmadan alınan bir referans aralığının laboratuvar da kullanılabilmesini sağlamaktadır. CLSI EP28–A3 protokolü, referans aralık doğrulama çalışmasının en az 20 kişiyle yapılmasını önermiştir (71).

2.4.4. Metot karşılaştırma

Ölçüm yöntemlerinin karşılaştırılması, yöntemlerin biasını tahmin etmek için hem üreticiler hem de klinik laboratuvarlar tarafından kullanılan en yaygın tekniklerden biridir. Çoğu analit için referans yöntem olmadığından üreticiler genelde mevcut en iyi cihazlarla, laboratuvarlar ise kullandıkları cihaz ve aday cihaz arasında karşılaştırma yapmaktadır. Bu çalışma için CLSI EP09–A3 protokolü klinik laboratuvarlarda en az kırk örneğin her iki cihazda da ölçülmesini önermektedir (70).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna dair Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 07.03.2019 tarih ve 2018/212 karar numaralı onay alınmıştır.

Çalışma, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı ve Düzce Atatürk Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında prospektif olarak yürütülmüştür.

3.1. KESİNLİK DEĞERLENDİRMESİ

CLSI EP05–A3 protokolü önerilerine göre yapılan kesinlik değerlendirilmesinde yirmi gün süreyle günde iki çalışma ve her çalışmada iki ölçüm yapılmıştır. Her test için iki seviye kalite kontrol malzemesi kullanılmıştır. Toplamda bir test için bir cihazda 160 ölçüm yapılmıştır. Bu ölçümlerden çalışma içi (repeatability), çalışma arası (between-run), gün içi (within-day), günler arası (between-day) ve toplam kesinlik (within-laboratory) değerleri hesaplanmıştır ve %CV şeklinde ifade edilmiştir. (69).

CLSI H47–A2 protokolü APTT ve PT için %CV değerinin < % 5 olmasını önermiştir (72).

3.2. DOĞRULUK DEĞERLENDİRMESİ

Her iki cihazda da doğruluk değerlendirmesi için Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Eksternal Kalite Kontrol (KBUDEK) 2020 Koagülasyon Aylık programı 1. Dönem Şubat, Mart ve Nisan ayları örnekleri kullanılmıştır. Her ayın % bias değerleri hesaplanmış ve ortalaması alınmıştır. % bias değeri için $[(\text{ölçülen değer} - \text{ortalama değer}) / \text{ortalama değer}] \times 100$ formülü kullanılmıştır (73,74).

CLSI EP15–A3 protokolüne uygun şekilde doğruluk değerlendirilmesi yapılmıştır (66).

Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA), APTT ve PT testleri için % bias değerinin < %15 olmasını önermektedir (75).

3.3. REFERANS ARALIK DOĞRULAMA ÇALIŞMASI

Referans aralığın doğrulanması için görünürde sağlıklı (normal tam kan sayımı, normal kan biyokimyası, normal tam idrar tahlili) 10 kadın 10 erkek toplam 20 kişiden alınan, uç değerler içermeyen örnekler kullanılmıştır. Çalışma CLSI EP28–A3c önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (71).

CS–2500 cihazı için referans aralıkları APTT ve PT–INR için sırasıyla 21,8 – 32 sn ve 0,8 – 1,3 olarak, D–dimer için karar sınırı ise 0,55 mg/L FEU olarak bildirilmiştir. CP–3000 cihazı için referans aralıkları APTT ve PT–INR için sırasıyla 24,3 – 34,3 sn ve 0,93 – 1,1 olarak, D–dimer için karar sınırı ise 0,5 µg/mL FEU olarak bildirilmiştir.

3.4. CİHAZ KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMASI

Çalışmada Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi polikliniklerine 2020 Mayıs – Haziran aylarında başvuran, 18 yaş üstü toplam 220 hastanın örnekleri kullanılmıştır. Hastalara çalışma hakkında bilgi verilip onamları alınmıştır.

Hastalardan sabah 08.00 – 10.00 arasında 0,109 mol/L (%3,2) trisodyum sitrat içeren 2,7 mL BD Vacutainer Plus Blood Collection Tubes (BD, Belliver Industrial Estate, Plymouth, PL6 7BP, UK) markalı tüplere ve eş zamanlı tam kan ölçümü için de 3 mL BD Vacutainer Blood Collection K₃EDTA (BD, Belliver Industrial Estate, Plymouth, PL6 7BP, UK) tüplere örnek alınmıştır. Örnekler laboratuvara geldikten

sonra K3EDTA'lı tüplerden Abbott Cell–Dyn 3700 cihazı (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, ABD) kullanılarak tam kan sayımı yapılmıştır. Sitratlı tüpler ise 1500 g de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası plazmalar vakit kaybetmeden sekonder tüplere ayrılmıştır. Örnekler önce CS–2500 cihazında daha sonra CP–3000 cihazında çalışılmıştır. Kan alımından ölçümlere kadar olan süre 4 saati geçmemiştir.

Örnekler görsel olarak değerlendirilerek hemolizli, lipemik, ikterik ve pıhtılı örnekler interferansa neden olacağı için çalışmaya dahil edilmemiştir. Kateterden alınma ihtimali olduğu ve heparin bulaşına neden olacağı için yatan hasta örnekleri dahil edilmemiştir. Tüpte işaretli seviyeden %10 az veya fazla alınan örnekler sitrat – plazma oranını bozacağı için çalışma dışı bırakılmıştır. Eş zamanlı tam kan numunelerinde hematokrit değeri %20 – 55 olan örnekler çalışmaya kabul edilmiş, diğerleri sitrat – plazma oranını bozacağı için dahil edilmemiştir.

Örnek alımı, taşınması, saklanması ve dışlama kriterleri CLSI H2–A5 protokolüne uygun olarak yapılmıştır (63).

Cihaz karşılaştırma çalışması CLSI EP09–A3 protokolüne uygun olarak yapılmıştır (70).

3.5. KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER

CS–2500 cihazında yapılan ölçümlerde APTT için Dade Actin FS Activated PTT Reagent (lot no: 538566), PT için Thromborel S (lot no: 565670) ve D–dimer için Innovance D–dimer (lot no: 49796) kitleri kullanılmıştır. Dade, Thromborel ve Innovance Siemens Healthcare Diagnostics (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg/Germany) firmasının ticari markalarıdır.

Dade Actin FS Activated PTT kitinde soya kaynaklı fosfolipitler, aktivatör olarak elajik asit kullanılmıştır. Thromborel S PT kitinde liyofilize insan plasental

tromboplastini kullanılmıştır. Innovance D–dimer kitinde fare kaynaklı anti – D–dimer immünglobuliniyle kaplanmış polistren partiküller ve insan serum albümini kullanılmıştır (76–78).

CS–2500 cihazında yapılan kesinlik çalışmalarında APTT ve PT 1. seviye için Control Plasma N (lot no: 507772B), D–dimer 1. seviye için Innovance D–dimer Control 1 (lot no: 562250) kullanılmıştır. APTT 2. seviye için Ci–Trol 2 (lot no: 548291A), PT 2. seviye için Control Plasma P (lot no: 556716A), D–dimer 2. seviye için Innovance D–dimer Control 2 (lot no: 562150) kullanılmıştır. CS–2500 cihazında kullanılan tüm kontroller Siemens Healthcare Diagnostics firmasının ticari markalarıdır.

CP–3000 cihazında yapılan ölçümlerde APTT için Coagpia APTT–FS Reagent (lot no: 621590), PT için Coagpia PT–N Reagent (lot no: 814RGQ) ve D–dimer için Nanopia D–dimer Reagent (lot no:808RAQ) kitleri kullanılmıştır. Coagpia ve Nanopia Sekisui Medical Co. Ltd. (Sekisui Medical Co. Ltd., Tokyo, Japan) şirketine ait ticari markalarıdır.

Coagpia APTT–FS kitinde soya kaynaklı fosfolipitler, aktivatör olarak silikat kullanılmıştır. Coagpia PT–N kitinde tavşan beyni kaynaklı tromboplastin kullanılmıştır. Nanopia D–dimer kitinde fare kaynaklı anti – insan D–dimer immünglobuliniyle kaplanmış lateks partiküller ve sığır serum albümini kullanılmıştır.

CP–3000 cihazında yapılan kesinlik çalışmalarında APTT ve PT 1. ve 2. seviye için CoagP–N 1 (lot no: 807RFQ), D–dimer 1. ve 2. seviye için Nanopia D–dimer Control Set (lot no: 809RBR) kullanılmıştır. CP–3000 cihazında kullanılan tüm kontroller Sekisui Medical Co., Ltd. firmasının ticari markalarıdır.

3.5.1. Sysmex CS–2500 cihazı teknik özellikleri

Kromojenik, immünölçüm ve agregasyon yöntemleri ile çalışan tam otomatik koagülasyon cihazıdır. Beş farklı dalga boyunda (340, 405, 575, 660 ve 800 nm) ölçüm yapabilmektedir. Pıhtı – dalga formu (clot – wave form) analizi özelliği ve otomatik dilüsyon prosedürü vardır. CS–2500 cihazı pıhtı oluşumunu foto–optik yöntemle, D–dimeri immüntüridimetrik yöntemle tespit etmektedir. 50 örnek kapasitesi ve yaklaşık 180 test/saat eş zamanlı PT / APTT ve 95 test/saat eşzamanlı PT / APTT / AT / D–dimer (normal modda) test kapasitesi vardır. Kapalı tüpten örnekleme ve acil numune girişi yapılabilmektedir. Ana ünitesinin yaklaşık boyutları 775 (genişlik) × 895 (derinlik) × 685 (yükseklik) mm’dir (79).

3.5.2. Abbott CP–3000 cihazı teknik özellikleri

Pıhtılaşma deneyleri için ışık saçan fotometri yöntemi ile; kromojenik ve immüntüridimetrik deneyler için absorbans fotometri yöntemi ile çalışan otomatik koagülasyon cihazıdır. LED (660 nm) ve halojen lamba (405/570/730 nm) olmak üzere 4 farklı dalga boyunda ölçüm yapabilmektedir. CP–3000 cihazı pıhtı oluşumunu foto–optik yöntemle, D–dimeri immüntüridimetrik yöntemle tespit etmektedir. 50 örnek kapasitesi ve 400 test/saat (PT), 200 test/saat (kromojenik ve immüntüridimetrik testler dahil) test kapasitesi vardır. Aynı anda 20 numune ölçümü yapabilmektedir. Ayrıca acil numune girişi yapılabilmektedir. Kapalı tüpten çalışma ünitesi vardır. Dahili barkod okuyucusu vardır. Kapalı tüp örnekleme ünitesi olmadan yaklaşık boyutları 590 (genişlik) x 740 (derinlik) x 1190 (yükseklik) mm’dir ve yaklaşık ağırlığı 185kg’dır. (80).

3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro – Wilk testi ile incelenmiştir. İki ortalama arasındaki farkın anlamlılığının değerlendirilmesinde normal dağılıma uyan parametreler için Paired Sample t test ve normal dağılıma uymayan parametreler için Wilcoxon sıralı diziler testi kullanılmıştır. Uç değerlerin dışlanması Tukey testi kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen verilerin analizi ve grafik çizimleri Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, USA), MedCalc Statistical Software versiyon 19.0.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019), IBM SPSS Statistics for Windows, Versiyon 21.0 (IBM Corporation, NY, USA, 2012) kullanılarak yapılmıştır.

Kesinlik değerlendirilmesinde elde edilen veriler ortalama ($\bar{x}$), SD ve % CV şeklinde verilmiştir. Doğruluk değerlendirilmesinde elde edilen % bias mutlak değerlerinin ortalaması alınmıştır. Cihaz karşılaştırma çalışmasında Passing – Bablok regresyon analizi ve Bland – Altman fark grafikleri kullanılmış, Spearman'ın Korelasyon testi ile korelasyon katsayısı (r) hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının >0,90 olması iyi uyum, >0,95 olması çok iyi uyum olarak kabul edilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler $\bar{x} \pm SD$ şeklinde uymayan veriler ortanca (minimum – maksimum) şeklinde ifade edilmiştir.

$p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KESİNLİK DEĞERLENDİRMESİ SONUÇLARI

Her test için 2 seviye kalite kontrolden hesaplanan kesinlik verileri APTT, PT ve D–dimer testleri için sırasıyla Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4. 1. APTT kesinlik değerlendirme sonuçları

APTT (sn)		CS–2500		CP–3000	
Kesinlik		1. Seviye	2. Seviye	1. Seviye	2. Seviye
Çalışma içi (Tekrarlanabilirlik)	$\bar{x}$	24,5	48,2	26,5	56,7
	SD	0,27	0,53	0,45	1,19
	% CV	1,1	1,1	1,7	2,1
Çalışma arası	$\bar{x}$	24,0	50,0	30,0	60,0
	SD	0,24	0,15	0,06	0,48
	% CV	1,0	0,3	0,2	0,8
Gün içi	$\bar{x}$	25,7	50,0	27,1	58,2
	SD	0,36	0,55	0,46	1,28
	% CV	1,4	1,1	1,7	2,2
Günler arası	$\bar{x}$	25,4	48,8	26,7	58,3
	SD	0,71	2,0	0,64	2,39
	% CV	2,8	4,1	2,4	4,1
Toplam (Laboratuvar içi)	$\bar{x}$	24,7	49,3	27,2	57,7
	SD	0,79	2,07	0,79	2,71
	% CV	3,2	4,2	2,9	4,7

Tablo 4. 2. PT kesinlik değerdendirmesi sonuçları

PT (sn – INR)		CS–2500				CP–3000			
Kesinlik		1. Seviye		2. Seviye		1. Seviye		2. Seviye	
		sn	INR	sn	INR	sn	INR	sn	INR
Çalışma içi (Tekrarlanabilirlik)	$\bar{x}$	12,0	1,0	20,0	1,67	12,4	1,0	21,5	1,75
	SD	0,12	0,012	0,34	0,03	0,099	0,10	0,474	0,042
	% CV	1,0	1,2	1,7	1,8	0,8	1,0	2,2	2,4
Çalışma arası	$\bar{x}$	12,1	1,0	20,0	1,71	12,4	1,0	21,8	1,76
	SD	0,17	0,016	0,56	0,036	0,161	0,10	0,523	0,044
	% CV	1,4	1,6	2,8	2,1	1,3	1,0	2,4	2,5
Gün içi	$\bar{x}$	12,4	1,05	19,7	1,74	12,6	1,0	22,1	1,79
	SD	0,21	0,020	0,65	0,047	0,189	0,014	0,706	0,061
	% CV	1,7	1,9	3,3	2,7	1,5	1,4	3,2	3,4
Günler arası	$\bar{x}$	11,9	1,04	20,0	1,70	12,7	1,0	21,8	1,74
	SD	0,32	0,027	0,68	0,063	0,165	0,015	0,589	0,054
	% CV	2,7	2,6	3,4	3,7	1,3	1,5	2,7	3,1
Toplam (Laboratuvar içi)	$\bar{x}$	11,9	1,0	20,0	1,72	12,6	1,0	21,9	1,76
	SD	0,38	0,033	0,94	0,079	0,251	0,02	0,919	0,081
	% CV	3,2	3,3	4,7	4,6	2,0	2,0	4,2	4,6

Tablo 4. 3. D–dimer kesinlik değ erlendirmesi sonuçları

D–dimer		CS–2500 (mg/L FEU)		CP–3000 (�g/mL FEU)	
Kesinlik		1. Seviye	2. Seviye	1. Seviye	2. Seviye
Çalışma içi (Tekrarlanabilirlik)	$\bar{x}$	0,288	2,43	0,400	3,51
	SD	0,015	0,097	0,012	0,151
	% CV	5,2	4,0	3	4,3
Çalışma arası	$\bar{x}$	0,292	2,50	0,411	3,57
	SD	0,007	0,030	0,023	0,107
	% CV	2,4	1,2	5,6	3
Gün içi	$\bar{x}$	0,293	2,41	0,406	3,47
	SD	0,017	0,101	0,026	0,184
	% CV	5,8	4,2	6,4	5,3
Günler arası	$\bar{x}$	0,28	2,41	0,412	3,48
	SD	0,007	0,135	0,014	0,146
	% CV	2,5	5,6	3,4	4,2
Toplam (Laboratuvar içi)	$\bar{x}$	0,286	2,40	0,403	3,51
	SD	0,018	0,168	0,029	0,235
	% CV	6,3	7,0	7,2	6,7

4.2. DOĞRULUK DE ERLEND RMES  SONUÇLARI

Dış kalite kontrol örneklerinden hesaplanan 3 aylık ortalama % bias sonuçları

Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 4. Doğruluk değerlendirme sonuçları

Doğruluk		APTT	PT–INR	D–dimer
CS–2500	% bias	5,3	1,9	0,1
CP–3000	% bias	14,5	13,7	30

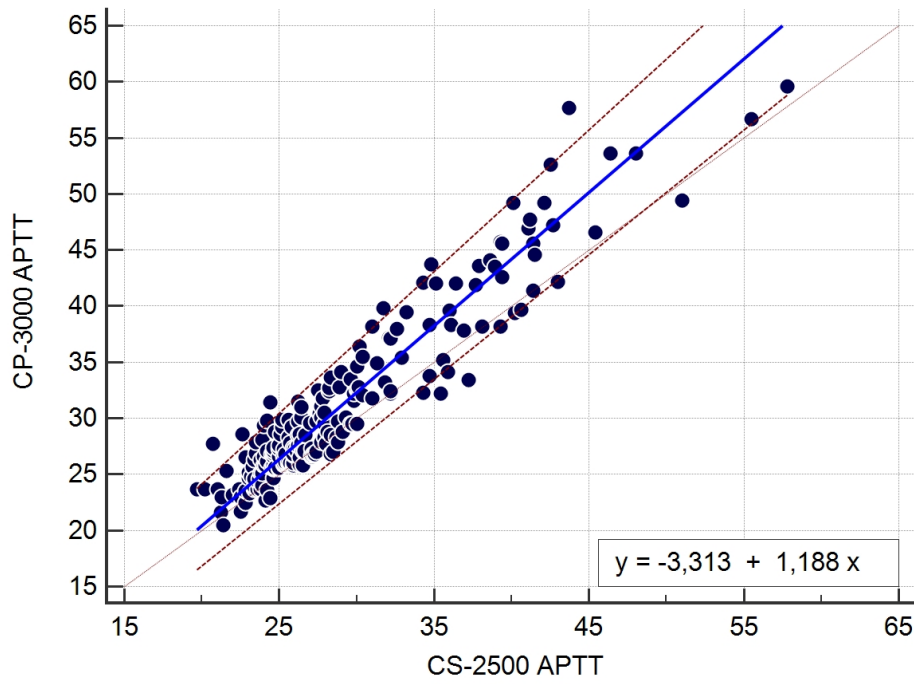
4.3. REFERANS ARALIK DOĞRULAMA ÇALIŞMASI SONUÇLARI

Referans aralık doğrulama çalışmasında CS–2500 cihazında APTT, PT–INR ve D–dimer ölçümleri yapılmış, uç değerler dışlandıktan sonra görünürde sağlıklı 20 referans birey seçilmiştir. Seçilen 20 referans bireyin yaşları 18 – 79 aralığındadır. Kadınların yaş ortalamaları 43,7, erkeklerin yaş ortalamaları 41,5 bulunmuştur. CS–2500 cihazında APTT sonuçları $25,5 \pm 1,76$ sn, PT–INR sonuçları 0,91 (0,82 – 1,26) aralığında, D–dimer sonuçları $0,35 \pm 0,04$ mg/L FEU olarak bulunmuştur. CP–3000 cihazındaki sonuçlar APTT için $26,2 \pm 1,79$ sn, PT–INR için 0,94 (0,79 – 1,36), D–dimer için ise $0,38 \pm 0,05$ µg/mL FEU olarak bulunmuştur. Ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$).

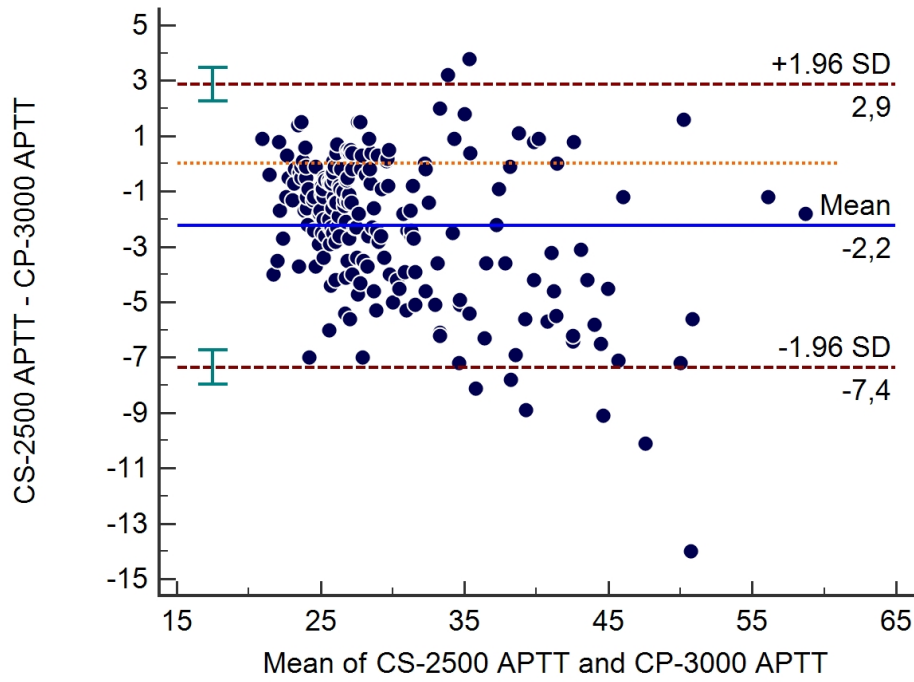
4.4. CİHAZ KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMASI SONUÇLARI

Karşılaştırma çalışmasında 204 hastanın APTT'si ölçülmüştür. Hastaların ortanca (minimum – maksimum) değerleri CS–2500 cihazında 26,6 sn (19,7 – 57,8), CP–3000 cihazında ise 28,5 sn (20,5 – 59,6) idi ve aralarında anlamlı fark bulunmaktaydı ($p < 0,01$). Passing – Bablok regresyon analizine göre regresyon denklemi $y = -3,313 + 1,188 x$ şeklinde ve $r = 0,904$ bulunmuştur. Cusum testine göre doğrusallıktan anlamlı bir sapma yoktur ($P = 0,21$). Bland – Altman analizine göre iki

cihaz arasında bias $-2,2$ bulunmuştur. Passing – Bablok regresyon grafiği ve Bland – Altman grafikleri sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.

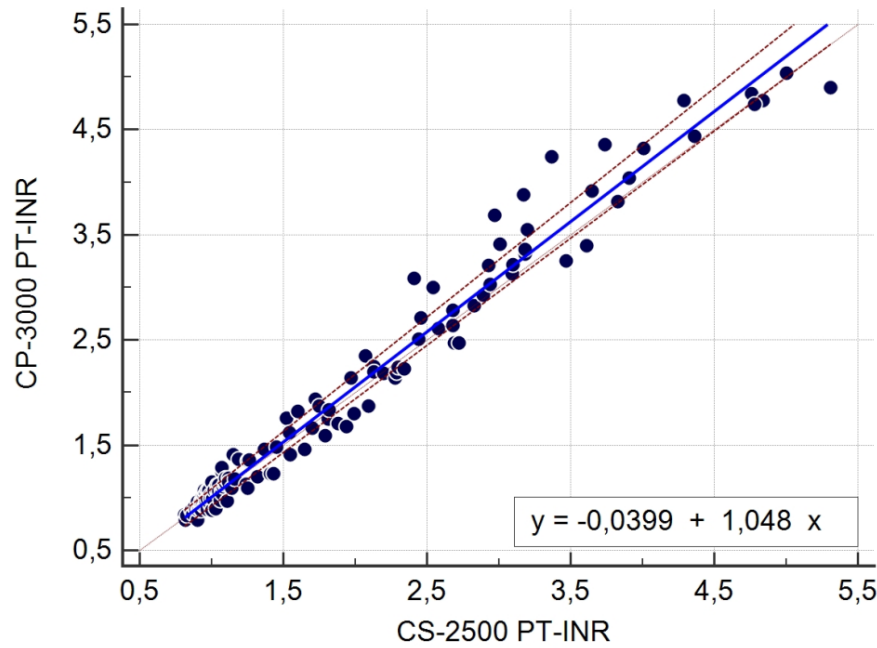


Şekil 4. 1. APTT testi Passing – Bablok regresyon analizi

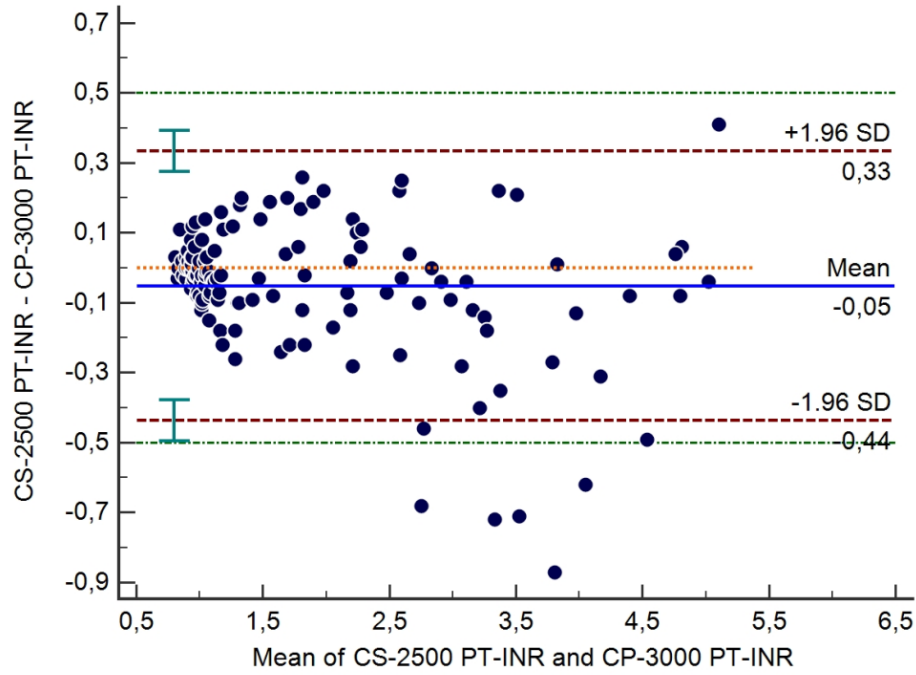


Şekil 4. 2. APTT testi Bland – Altman grafiği

CS-2500 cihazında PT-INR ölçümleri yapılan 130 hastanın INR'leri 84 hastada <2, 41 örnekte 2 – 4,5 arasında, 5 örnekte ise >4,5 olarak dağılmaktaydı. Sonuçların ortanca (minimum – maksimum) değerleri CS-2500 cihazında 1,35 (0,81 – 5,31), CP-3000 cihazında ise 1,37 (0,79 – 5,04) şeklindeydi ve aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunmaktaydı ($p=0,011$). Passing – Bablok regresyon analizine göre regresyon denklemi $y = -0,0399 + 1,048 x$ şeklindedir ve $r = 0,978$ bulunmuştur. Cusum testine göre iki cihaz arasındaki ilişkide doğrusallıktan anlamlı bir sapma görülmemiştir ($P=0,41$). Bland – Altman analizine göre iki cihaz arasında bias $-0,05$ şeklindedir. Passing – Bablok regresyon grafiği ve Bland – Altman grafikleri sırasıyla Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir.



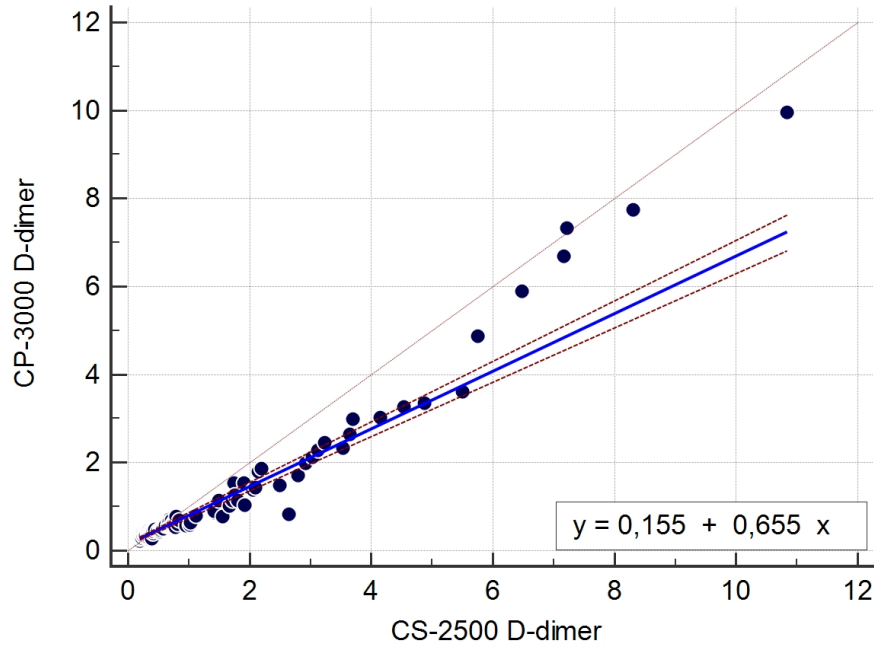
Şekil 4. 3. PT-INR testi Passing – Bablok regresyon analizi



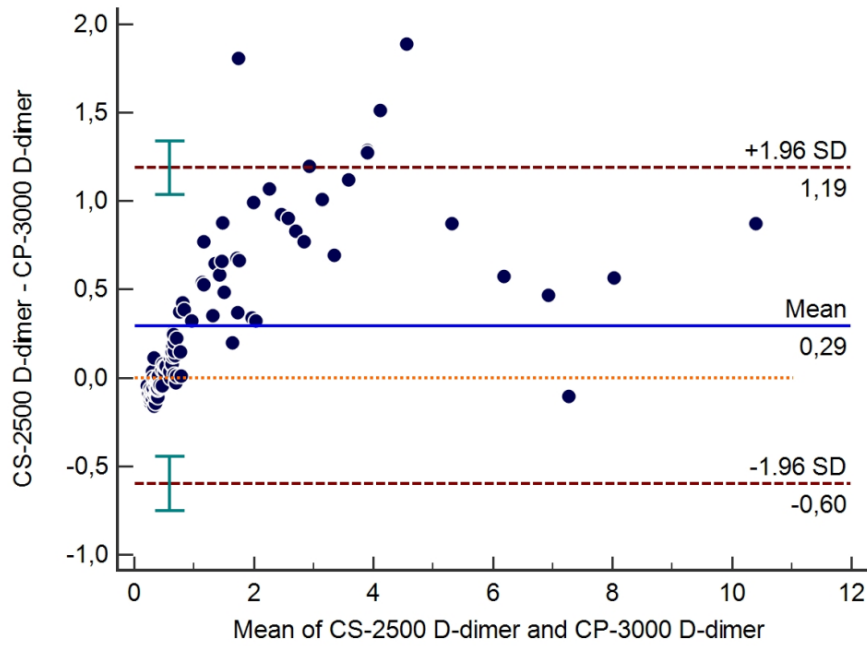
Şekil 4. 4. PT–INR testi Bland – Altman grafiği

CLSI önerisi olan 0,5 fark yatay kesikli yeşil çizgi ile gösterilmiştir.

D–dimer ölçümleri yapılan 103 hasta karşılaştırma çalışmasına dahil edilmiştir. Sonuçların ortanca (minimum – maksimum) değerleri CS–2500 cihazında 0,7 mg/L FEU (0,19 – 10,83), CP–3000 cihazında 0,58 µg/mL FEU (0,2320 – 9,9560) şeklindeydi ve aralarında anlamlı fark bulunmaktaydı ($p<0,01$). Passing – Bablok regresyon analizine göre regresyon denklemi $y = 0,155 + 0,655 x$ şeklinde ve $r = 0,974$ bulunmuştur. Cusum testine göre doğrusallıktan sapma mevcuttur ($P=0,04$). Bland – Altman analizine göre iki cihaz arasında bias 0,29’dur. D–dimer testi için ayrıca yöntemler arasında % farklar da hesaplanmış ve bias %9,9 bulunmuştur. Passing – Bablok regresyon grafiği ve Bland – Altman grafikleri sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. D–dimer testi Passing – Bablok regresyon analizi



Şekil 4. 6. D–dimer testi Bland – Altman grafiği

Passing – Bablok grafiğinde D–dimer 2,5’in üzerine çıktığı zaman doğrusallığın bozulduğu görülmektedir. 2,5 değerinden yüksek sonuçlar ayrı olarak değerlendirilip iki grup oluşturulduğunda hem <2,5 grubunda hem de >2,5 grubunda doğrusallıktan

sapma görülmemiştir ($P=0,76$ ve $P=0,36$). Düşük değerlerden oluşan 82 hastalık grupta $r = 0,951$ ve regresyon denklemi $y = 0,1826 + 0,5684 x$ şeklindedir. Yüksek değerlerden oluşan 21 hastalık yeni grupta ise $r = 0,997$ $y = -1,2851 + 1,0767 x$ şeklinde bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

Koagülasyon ölçümü 1970'lerden bugüne ciddi şekilde gelişme göstermiştir ve pıhtı oluşumunu tespit edebilen cihazlar geliştirilmiştir (81). Testlerin otomatik cihazlar tarafından yapılması standardizasyonu artırsa da daha iyi bir doğruluk ve kesinlik sağlandığı anlamına gelmemektedir. Bu nedenle kalite değerlendirme çalışmaları laboratuvarlar için önemini sürdürmektedir ve dünya genelinde birçok analitik performans değerlendirme çalışması yapılmaktadır (82). Bu çalışmada da standardizasyon ve doğrulama amacıyla ülkemizde yeni kullanıma giren CP-3000 cihazının analitik performansı değerlendirilmiş, foto-optik yöntemle pıhtı oluşum süresini ölçen ve immüno-turbidimetrik yöntemle D-dimer miktarını tespit eden CS-2500 cihazı ile karşılaştırma çalışması yapılmıştır.

Günümüzde kullanılan birinci basamak veya rutin pıhtılaşma analizleri geleneksel olarak APTT, PT-INR, fibrinojen, trombosit sayısı ve trombosit fonksiyon testleridir. APTT, PT-INR, fibrinojen ve D-dimer, pıhtılaşma kaskadının kalitatif veya kantitatif eksikliklerini taramak için en sık talep edilen testlerdir (33). 2012 yılında Kuzey Amerika'da yapılan, Kuzey Amerika Özel Pıhtılaşma Laboratuvarı Derneği (NASCOLA) üyesi 81 laboratuvarın 31'inin katıldığı bir çalışmaya göre bu laboratuvarların %97'sinde kanama bozukluklarını araştırmak, tanı koymak ve izlem yapmak için hemostaz testleri çalışılmaktadır. Çalışmaya katılan laboratuvarların tümünde rutin testlerden olan APTT ve PT-INR testi çalışılmakta, D-dimer ise % 84'ünde çalışılmaktadır (83). APTT, PT-INR, D-dimer ve fibrinojen test sonuçlarının birlikte kullanımı, pıhtılaşma sisteminin genel işleyişiyle ilgili kapsamlı bir ön bilgi verir. Bu şekilde kanama bozukluklarının taranmasına ve klinisyenin ön tanıılarını doğrulamak için yönlendirilmesine olanak tanımaktadır (84).

APTT ölçümlerinde üretici firmanın bildirdiği %CV verileri CS-2500 cihazı için %4'tür. CP-3000 cihazında firmanın bildirdiği %CV değerleri çalışma içi kesinlikte normal ve yüksek seviye için sırasıyla %0,38 ve %1, toplam kesinlikte normal ve yüksek seviye için sırasıyla %1,1 ve %1,6'dır. Yapılan kesinlik çalışmasında, CS-2500 cihazında APTT testi için 2. seviyede günler arası (%4,1) ve toplam kesinlik (%4,2) hariç tüm değerler %4 beklentisini karşılamaktadır. CP-3000 cihazında ise firma verilerinden yüksek %CV değerleri bulunmuştur.

CS-2500 cihazında PT-INR testi için çalışma içi kesinliğin %0,7 – 1,2 arasında testler arası kesinliğin ise %1,5 – 2,2 arasında değiştiği bildirilmiştir. CP-3000 için insan plazması ile yapılan çalışmalardan elde edilen firma verileri çalışma içi kesinlikte normal ve yüksek seviye için sırasıyla %0,5 ve %1,2, toplam kesinlikte ise normal ve yüksek seviye için sırasıyla %0,9 ve %1,5'tir. Bu çalışmada, PT-INR için CS-2500 cihazında 1. seviyede çalışma içi kesinlikte %1,2 beklentisi karşılanmış ancak bunun dışındaki değerler firma verilerinden yüksek bulunmuştur. CP-3000 cihazında da %CV değerleri firma beklentilerinden yüksektir.

D-dimer ölçümü için CS-2500 cihazında firma tekrarlanabilirlik %CV beklentisini düşük seviye kontrol çalışmaları için %4,1, yüksek seviye kontrolde %1,4, normal plazma havuzundan yapılan çalışmalar için %7,8, yüksek seviyede plazma havuzu çalışmaları için ise %1,5 olarak bildirilmiştir. Laboratuvar içi %CV beklentileri ise düşük seviye kontrol çalışmaları için %4,3, yüksek seviye kontrolde %2,2, normal plazma havuzundan yapılan çalışmalar için %7,9, yüksek seviyede plazma havuzu çalışmaları için ise %2,6'dır. CP-3000 cihazında üretici firma plazma havuzundan yapılan testlerde %CV değerlerini çalışma içi kesinlikte düşük seviyede %11,1, yüksek seviyede %1,3 olarak, toplam kesinlikte düşük seviyede %11,4, yüksek seviyede ise

%2,0 olarak bulduklarını bildirmiştir. Bu çalışmada D–dimer için elde edilen %CV değerleri her iki cihazda da firma beklentilerinden yüksek bulunmuştur.

CLSI H47–A2 protokolü (72) APTT ve PT testlerinde %CV değerinin %5’i geçmemesini önermiştir. Laboratuvarlarda ölçülen %CV değerleri firma beklentilerinden yüksek bulunmasına rağmen her iki cihazda da APTT ve PT testlerinde önerilen sınır olan %5’in altındadır.

D–dimer testi için resmi kaynaklarda kabul edilebilir %CV önerisi yoktur. 2014 yılında İtalya’da, D–dimer için karar sınırına yakın bölgede %CV’si ≤ 10 olan kitlerin tercih edilmesi önerilmiştir (85). CLSI H59 protokolünde de birçok laboratuvarın D–dimer için %CV değerlerini $\leq 7,5$ olarak bildirdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada da D–dimer testi için her iki cihazda elde edilen %CV değerleri $<7,5$ ’tir.

CLSI H59 protokolünde (86) D–dimer testi eğer venöz tromboemboliyi dışlama amacıyla kullanılacaksa yüksek bir negatif tahmin değeri (NPV) ve yüksek hassasiyeti olan bir kit kullanılması önerilmiştir. Buna göre $NPV \geq \%98$ (tek taraflı %95 güven aralığı: $\geq \%95$) ve hassasiyet $\geq \%97$ (tek taraflı %95 güven aralığı: $\geq \%90$) olmalıdır. CS–2500 cihazında üretici firmanın bildirdiği NPV ve güven aralığı sırasıyla %99,5 ve %98,7’dir. Hassasiyet ve güven aralığı ise sırasıyla %99,4 ve %98,0’dir. Bu değerler önerilen kriterleri karşılamaktadır. CP–3000 cihazında kullanılan kitin tanıtım kağıdında ise NPV ve hassasiyet verileri yer almamaktadır.

Doğruluk çalışmasında CP–3000 cihazının sonuçları CS–2500 cihazına göre yüksek çıkmıştır. Bunun en önemli nedeninin cihazın şu an karşılaştırılabileceği bir grup olmaması olduğu düşünülmüştür. Çoğu dış kalite kontrol programı hedef değeri programa katılan laboratuvarların ölçüm sonuçlarına göre belirlemektedir. Çünkü birçok test için referans materyal ve referans yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle eğer bir cihaz gerçekten çok tutarlı ve doğru bir ölçüm yapıyor olsa bile bu şekilde belirlenen

hedef değerin dışında kalabilir. Ülkemizde CS-2500 yaygın kullanılan bir cihazdır. Katılımcı laboratuvarların kullandığı cihazlar içinde önemli bir paya sahip olduğu için grup ortalamasına CP-3000 cihazından daha yakın sonuç vermesi kaçınılmazdır. CP-3000 cihazının ortalaması CS-2500 cihaz ortalamasından bu nedenlerle yüksek olsa bile her iki cihazın da % bias sonuçları APTT ve PT testleri için CLIA'nın önerdiği %15 sınırının altındadır (75).

CP-3000 cihazında D-dimer % bias sonuçlarının yüksek olmasının nedenlerinden bir diğerinin ise yöntem kaynaklı olduğu düşünülmüştür. İmmünoölçümler antijene yani analite özgün antikor ile antijenin reaksiyonuna dayalı analizlerdir. Analitlerin düşük konsantrasyonda olması ve antijen – antikor etkileşiminin karmaşıklığı nedeniyle immünyöntemler girişimlere (interferansa) duyarlıdır. Bu yöntemlerde kullanılan antikorların sadece ölçülmek istenen analite bağlandığı varsayılsa da pratikte başka maddelere de bağlanabilmekte veya da başka maddelerin etkisiyle ölçülmek istenen analite bağlanamamakta ve bu da ölçümün doğruluğunu etkilemektedir. İmmünoölçümlerde kullanılan kitlerde analitin farklı bölgelerine karşı farklı antikorlar kullanıldığı için tespit ettikleri analit miktarı önemli ölçüde değişmektedir. Bu nedenlerle immünyöntemlerde testler arası varyasyon fazladır ve bu da standardizasyonu zorlaştırmaktadır. Farklı D-dimer kitlerinin hem klinik çalışmalarda hem de dış kalite değerlendirme programı sonuçlarında farklı sonuçlar verdiği daha önce yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (87–89). 2013 yılında yayınlanan, 3800 laboratuvarı kapsayan bir araştırmada, Amerikan Patologlar Koleji'nin (CAP) Pıhtılaşma Kaynak Komitesi, yöntemler arası %CV'nin % 42 kadar yüksek olduğunu bulmuştur (89). Raporlama birimine göre sırasıyla (FEU olmayan ve FEU olan) 736 ve 752 laboratuvarı kapsayan başka bir çalışmada, bir dış kalite programının Nisan 2017, Temmuz 2017, Eylül 2017 ve Ocak 2018 dönem sonuçları göz önüne

alındığında aykırı değerler dışlandıktan sonra yöntemler arası % CV değerleri % 33,4, % 38,2, % 41,8, % 30,9 (FEU olmayan) ve % 18, % 19,3, % 17,7, % 19 (FEU olan) olarak bildirilmiştir (88). CP-3000 cihazının dış kalite sonuçlarının da bu çalışmayla benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Sysmex serisi ile yapılan birçok çalışmada kesinlik ve doğruluk değerlendirmeleri sonucu APTT ve PT testlerinde yaklaşık olarak benzer % bias ve % CV değerleri bulunmuştur (5,90-92). 2020 yılında CS-2500 cihazı ile yapılan bir çalışmada APTT için %CV değerlerinin %0,30 – 2,95 arasında, PT-INR için % 0,74 – 4,1 arasında değiştiği bulunmuştur (90). Bu çalışmada da %CV değerleri APTT testi için %0,3 – 4,2, PT-INR testi için %1 – 4,7 arasında değişmektedir.

Literatürde yapılan tarama sonucu (PubMed, Scopus, Cochrane ve Google Scholar veri tabanları) CP-3000 cihazıyla yapılmış APTT, PT ve D-dimer testlerini karşılaştıran, kesinlik, doğruluk verileri içeren bir yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle CP-3000 cihazı verilerini karşılaştırılacak bir %CV, bias değeri yoktur. Bu çalışmanın cihazı kullanmaya başlayacak laboratuvarlar için kaynak olabileceği düşünülmüştür.

CS-2500 cihazında yapılan referans aralık doğrulama çalışmasında APTT ve PT-INR için 20 referans bireyin tamamının sonucu üretici firmanın sağladığı sırasıyla 21,8 – 32 sn, ve 0,8 – 1,3 aralığında çıkmıştır. D-dimer testi için de tüm bireylerin sonuçları <0,55 mg/L FEU çıkmıştır. CP-3000 cihazında sonuçlar APTT için 2 hasta dışında (22,7 ve 23,9 sn) üretici firmanın sağladığı 24,3 – 34,3 aralığındadır. PT-INR testi için 2 birey (0,79 ve 1,36) dışında üretici firmanın sağladığı 0,93 – 1,10 aralıkları içindedir. D-dimer testi için tüm referans bireylerin sonucu <0,50 µg/mL bulunmuştur. CP-3000 cihazında PT-INR testi için 2 bireyin üretici firmanın belirttiği referans aralıkları dışında kalmasının bu cihazda alt ve üst limitlerinin CS-2500 cihazına göre daha dar olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Yine APTT testi için de 2 birey

CS-2500 cihazına göre normal aralıktayken CP-3000 cihazında referans aralık alt limiti daha yüksek olduğu için düşük aralıkta kalmıştır. CLSI EP28-A3c protokolü, referans aralık doğrulama çalışmasında en az 20 referans bireyin ölçümünün yapılmasını ölçülen değerlerden uç değerler varsa atılmasını ve yerine yeni bireyler alınmasını önermiştir. Uç değerlerden arındırılmış 20 bireyin sonucunun %90'ının üretici firmanın sağladığı aralık içerisinde olmasının kabul edilebilir olduğunu, %10 bireyin sonucunun firma tarafından belirtilen aralığın dışında çıkabileceğini belirtmiştir (71). Bu çalışmada 20 birey kullanıldığı için en fazla 2 sonucun üretici firmanın belirttiği aralığın dışında kalması kabul edilebilirdir. Buna göre CS-2500 ve CP-3000 cihazları için üretici firmalar tarafından sağlanan referans aralıkları doğrulanmıştır.

Cihaz karşılaştırma çalışmasında APTT testi için CS-2500 ve CP-3000 cihazları arasında yapılan r değeri $> 0,9$ 'dur. Bu değer iki cihaz arasında iyi doğrusal uyum olduğunu göstermektedir. Regresyon analizinde elde edilen eğim (1,188) değeri ölçümlerin uygunluğunu göstermektedir. Kesim değerinin (-3,313) yüksek olması sistematik hata olabileceğini düşündürmektedir. Yakın zamanda CS-2500 ve Stago STA Compact arasında yapılan metot karşılaştırma çalışmasında APTT testi için $y = 5,498 + 0,86 x$ şeklinde regresyon denklemi elde edilmiştir (90). Bu çalışmada bulunan kesim ve eğim değerleri de daha önce yapılan çalışmalarla benzerdir.

Bland – Altman grafiğinde normal aralıkta fark kabul edilebilirdir. Yüksek değerlerde ise iki cihazda ölçülen değerlerin farklılığı görülmektedir. 2015 yılında Sysmex CS-5100 ve Stago STA-R cihazları arasında yapılan bir çalışmada cihazlar arasında 12,8 bias bulunmuştur ve yapılan Bland – Altman grafiğine bakıldığında yüksek değerlerdeki sapmalar görülmektedir (5).

PT-INR testi için cihazlar arasında $r = 0,978$ ve regresyon analizinde eğim ve kesim değerleri sırasıyla 1,048 ve -0,0399 bulunmuştur. Kesim değerinin sıfıra yakın

olması, eğim değerinin bire yakın olması ve r değerinin $>0,95$ olması sabit veya oransal bir hata olmadığını ve cihazlar arasında çok iyi lineer uyum olduğunu göstermektedir. Thromborel S kitiyle yapılan bir karşılaştırmada üretici firma verisine göre 0,979'luk bir r değeri elde edilmiştir (77). 2015 yılında Sysmex CS-5100 cihazının değerlendirildiği bir çalışmada mekanik yöntemle pıhtı oluşumunu tespit eden STA-R cihazı ile metot karşılaştırma çalışması yapılmış. 193 hastanın INR'leri değerlendirilmiş ve cihazlar arasında $y = -0,0702 + 1,0528 x$ şeklinde regresyon denklemi elde edilmiştir (93). Literatürde Sysmex cihazlarıyla yapılan çalışmalarda da benzer regresyon denklemleri elde edilmiştir.

CLSI-H57A protokolü, terapötik aralıktaki numunelerin (INR 2,0 – 4,0) en az %85'inin ölçüm sonuçları arasındaki farkın $< \pm 0,5$ INR birimi olmasını kabul edilebilirlik kriteri olarak önermiştir (73). Bland – Altman grafiğine bakıldığında ölçümü yapılan numunelerden 5 tanesinde cihazlar arası farkın 0,5'i geçtiği görülmektedir. İki cihazın PT-INR ölçümleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmasına rağmen INR 2,0 – 4,0 aralığında test edilen 38 örneğin %85'inin fark $< \pm 0,5$ şartını sağladığı gösterilmiştir.

APTT ve PT kitleri çok çeşitli tromboplastin kaynakları içerebilmektedir. Dade Actin FS Activated PTT kitinde soya kaynaklı fosfolipitler, aktivatör olarak elajik asit, Coagpia APTT-FS kitinde ise soya kaynaklı fosfolipitler, aktivatör olarak silikat kullanılmıştır. Coagpia PT-N kitinde tavşan beyni kaynaklı tromboplastin kullanılırken Thromborel S kitinde insan plasental tromboplastini kullanılmaktadır. Cihazlarda kullanılan kitlerde tromboplastin kaynaklarının ve aktivatörlerin çeşitliliği sonuçlar arasında farklılıklara neden olabildiği düşünülmüştür. Ancak yapılan bir çalışmada tavşan tromboplastini ile rekombinant tromboplastin karşılaştırılmış ve arada istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (94).

D-dimer için iki cihaz arasında $r = 0,974$ regresyon denklemi ise $y = 0,1555 + 0,6555 x$ şeklinde bulunmuştur. CS-2500 cihazında üretici firma yaptığı karşılaştırma çalışmalarında $y = 1,036 x + 0,023$ ve $y = 1,312 x + 0,172$ şeklinde regresyon denklemleri elde etmiş, sırasıyla $r = 0,978$ ve $r = 0,961$ şeklinde korelasyon katsayıları bulmuştur (78). Passing – Bablok grafiğine bakıldığında doğrusallığın 2,5 değerinden sonra bozulduğu görülmektedir. Gruplar ayrıldığında ise üst grubun denkleminde eğim değeri 1'e yaklaşmaktadır (1,0767). Bland – Altman grafiğine bakıldığında yöntemler arasında 0,29'luk bir bias görülmektedir. 2013 ve 2018 yıllarında yapılan çalışmalarda yöntemler arası % farkların çok olduğu gözlenmiştir (88,89). Bu çalışmada da yöntemler arasındaki % fark hesaplanmış ve %9 bulunmuştur. Bu değer daha önce yapılan çalışmalardan düşüktür. CS-2500 yaygın kullanılan bir cihazdır ve CP-3000 cihazının CS-2500 cihazıyla kıyaslandığında kabul edilebilir bir analitik performans gösterdiği söylenebilir.

Koagülasyon cihazlarında APTT, PT, D-dimer testlerinin yanı sıra fibrinojen düzeyleri, faktör düzeyleri, inhibitör düzeyleri gibi birçok test çalışılmaktadır. Bu çalışmada ise performans değerlendirmesi yapılırken imkanlar dahilinde APTT, PT ve D-dimer testleriyle çalışma yapılmıştır. Ayrıca yöntem değerlendirme çalışmalarında birçok parametre değerlendirilebilmektedir. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından biri de bu çalışmada sadece kesinlik, doğruluk, referans aralık doğrulama ve metot karşılaştırma çalışması yapılmasıdır. Bunlara ek olarak rapor edilebilir aralık doğrulama, hemoliz, lipemi, ikter gibi girişim yapan maddelerin araştırılması, örnek stabilitesi çalışması ve taşıma hatası çalışması yapılabilir. Bu çalışmalar yapılırsa cihazlar rutin kullanımda iken ne gibi sorunlarla karşılaşılacağı ve bu sorunların nasıl çözüleceği daha iyi anlaşılmış olur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Cihazların kabul edilebilir analitik performans gösterdikleri doğrulanmalıdır. Laboratuvar uzmanlarının kullandıkları cihazın analitik performansı hakkında bilgi sahibi olması gereklidir. Bu nedenle Sağlık Bakanlığı iç ve dış kalite değerlendirmelerini biyokimya laboratuvarları için zorunlu tutmaktadır. Standart ve valide metotlar (CE veya FDA onaylı gibi) kullanılıyorsa laboratuvarın yeterliliğine yönelik verifikasyon çalışması yapılmasını önermektedir. CLSI birçok protokolle verifikasyon çalışmalarında yapılması gerekenleri ve kabul kriterlerini laboratuvarlara bildirmiştir.

Analitik performansı değerlendirmek için yapılan kesinlik, doğruluk ve referans aralık doğrulama çalışmaları sonucu iki cihazın da yeterli analitik performans gösterdiği görülmüştür. Cihaz karşılaştırma çalışmasında henüz ülkemizde rutin kullanımda olmayan CP-3000 cihazının, yaygın şekilde kullanılan CS-2500 cihazıyla uyumlu ölçüm yaptığı gösterilmiştir. Elde edilen bu verilerle CP-3000 cihazının biyokimya laboratuvarlarında rutin hemostaz testleri olan APTT, PT ve D-dimer ölçümlerinde kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. CP-3000 cihazı ile daha çok çalışma yapılarak cihaz hakkında yeni veriler elde edilmesi önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Billman GE. Homeostasis: The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology. *Front Physiol* [Internet]. 2020 Mar 10 [cited 2020 May 20];11:200. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.00200/full>
2. Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2017. p. 3–27. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7196-1_1
3. Kitchen S, Geisen U, Kappelmayer J, Quehenberger P, Drieß J, Lowe A, et al. Evaluating the analytical performance of five new coagulation assays for the measurement of prothrombin time and activated thromboplastin time. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(6):645–54.
4. Kitchen S, Geisen U, Kappelmayer J, Quehenberger P, Lowe A, Jones R, et al. Evaluating the analytical performance of four new coagulation assays for the measurement of fibrinogen, D-dimer and thrombin time. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(6):637–44.
5. Geens T, Vertessen F, Malfait R, Deiteren K, Maes MB. Validation of the Sysmex CS5100 coagulation analyzer and comparison to the Stago STA-R analyzer for routine coagulation parameters. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(3):372–81.
6. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Sağlıkta Kalite ve Akreditasyon Daire Başkanlığı. Sağlıkta Kalite Standartları Hastane (Versiyon-5; Revizyon-01) [Internet]. Ankara; 2016. Available from: <https://dosyamerkez.saglik.gov.tr/Eklenti/3460,skshastanesetiv5r1pdf.pdf?0>
7. Lippi G, Favaloro EJ, Franchini M, Guidi GC. Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35(1):9–22.
8. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327–58.
9. Atamer T. Hemostaz mekanizması. *Temel hemostaz Tromboz kursu*. 2007;2:1–6.
10. Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'Osservatore*. 1881;17:785–7.
11. Quinn M. Platelet Physiology. In: *Platelet Function* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 3–20. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-917-2_1
12. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to

- localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2004;103(6):2096–104.
13. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. Vol. 2, Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. 2010. 1–75 p.
 14. Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(11):1759–66.
 15. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: Historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):241–6.
 16. Russell A. Higgins, Steve Kitchen and DC. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics / [edited by] Nader Rifai ; senior editors, Andrea R. Horvath, Carl T. Wittwer. In: 6th ed. Elsevier; 2018. p. 1732 e1-e56.
 17. Walsh PN. Platelet coagulation-protein interactions. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2004.
 18. Da Prada M, Pletscher A, Tranzer JP. Lipid composition of membranes of amine-storage organelles. *Biochem J*. 1972;
 19. Funatsu T, Higuchi H, Ishiwata S. Elastic filaments in skeletal muscle revealed by selective removal of thin filaments with plasma gelsolin. *J Cell Biol*. 1990;
 20. Stark F, Golla R, Nachmias VT. Formation and contraction of a microfilamentous shell in saponin-permeabilized platelets. *J Cell Biol*. 1991;
 21. Panteleev MA, Dashkevich NM, Ataullakhanov FI. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: Roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* [Internet]. 2015;136(4):699–711. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.07.025>
 22. MacKman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia and Analgesia*. 2009.
 23. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006.
 24. Hoffman MM, Monroe DM. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep*. 2005 Sep;4(5):391–6.
 25. Petrovan RJ, Ruf W. Residue Met156 Contributes to the Labile Enzyme Conformation of Coagulation Factor VIIa. *J Biol Chem*. 2001;
 26. Jesty J. The inhibition of activated bovine coagulation factors X and VII by antithrombin III. *Arch Biochem Biophys*. 1978;
 27. Broze GJ, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue

- factor complex also inhibits factor Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood*. 1988;
28. Riddel JP, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2007;24(3):123–31.
 29. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*, 2e Updated Edition E-Book. Elsevier health sciences; 2012.
 30. M. Harmening D. *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis* 5th Edition. F.A. Davis Company. Philadelphia; 2009.
 31. Hoffman M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. 2003 Aug;16(1/2):17–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28>
 32. Hemker HC. The initiation phase - A review of old (clotting-) times. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007.
 33. Lippi G, Franchini M, Guidi GC. Diagnostic approach to inherited bleeding disorders. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2007.
 34. Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, et al. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature*. 1989;
 35. Ndonwi M, Broze G. Protein S enhances the tissue factor pathway inhibitor inhibition of factor Xa but not its inhibition of factor VIIa–tissue factor. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2008 Jun;6(6):1044–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2008.02980.x>
 36. Hansen JB, Huseby NE, Sandset PM, Svensson B, Lyngmo V, Nordøy A. Tissue-factor pathway inhibitor and lipoproteins: Evidence for association with and regulation by ldl in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1994;
 37. Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: Genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine*. 2005.
 38. Hoppe C, Matsunaga A. Pediatric thrombosis. *Pediatric Clinics of North America*. 2002.
 39. Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Rosing J, Hackeng TM. Hereditary and acquired protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2010 Feb;8(2):294–300. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2009.03712.x>
 40. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;
 41. Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb*

Haemost. 2001 Jun;85(6):958–65.

42. Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Mcvey JH. Normal Haemostasis. In: Hoffbrand, V. A., Catovsky, D., & Tuddenham E, editor. Postgraduate Haematology [Internet]. 5th ed. 2005. p. 783–807. (Wiley Online Books). Available from: <https://doi.org/10.1002/9780470987056.ch47>
43. Loscalzo JSAI. Thrombosis and hemorrhage. In: Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2003.
44. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;
45. Ariëns RAS, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood.* 2002.
46. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology.* 2005.
47. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev* [Internet]. 2015 Jan;29(1):17–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X14000721>
48. Booth N BF. Plasminogen-plasmin system. In: Coleman RW MV, Clowes AW, George JN GS, editors. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2006. p. 335–65.
49. McMichael M. New Models of Hemostasis. *Top Companion Anim Med* [Internet]. 2012;27(2):40–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2012.07.005>
50. Hartmann M, Sucker C, Boehm O, Koch A, Loer S, Zacharowski K. Effects of Cardiac Surgery on Hemostasis. *Transfus Med Rev.* 2006;20(3):230–41.
51. Bonar R, Favaloro EJ, Adcock DM. Special issue: Quality in laboratory diagnostics: from theory to practice Quality in coagulation and haemostasis testing. *Biochem Medica* [Internet]. 2010;184–99. Available from: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/20/2/10.11613/BM.2010.023/fullArticle>
52. Harrison P, Lordkipanidzé M. Testing platelet function. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 2013.
53. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* 2011;
54. Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hamostaseologie.* 2009.
55. Whiting D, Dinardo JA. TEG and ROTEM: Technology and clinical

- applications. *Am J Hematol*. 2014;
56. Görmüş U. Hematolojik Analizler. In: Görmüş U, editor. *Laboratuvar Dünyası*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti.; 2015. p. 145–65.
 57. Barna L, Triplett DA. Use of the activated partial thromboplastin time for the diagnosis of congenital coagulation disorders: Problems and possible solutions. *Ric Clin Lab*. 1989;
 58. Demir AM. Geleneksel Pıhtılaşma Testleri ve Klinik Uygulamalardaki Yeri. In: Emekli N, Yiğitbaşı T, editors. *Klinik Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti.; 2015. p. 323–31.
 59. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson P, Blajchman MA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med*. 1992;
 60. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, Spannagl M, Krause M, Miesbach W, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2011;
 61. Cornell University College of Veterinary Medicine. Methods of clot detection | eClinpath [Internet]. 2015 [cited 2020 Jun 18]. Available from: <http://www.eclinpath.com/hemostasis/tests/screening-coagulation-assays/clot-detection-method/>
 62. Riley RS, Gilbert AR, Dalton JB, Pai S, McPherson RA. Widely Used Types and Clinical Applications of D-Dimer Assay. *Lab Med* [Internet]. 2016 May;47(2):90–102. Available from: <https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1093/labmed/lmw001>
 63. CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline—Fifth Edition. CLSI Doc H21-A5. 5th ed. 2008;28(5).
 64. Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd ed. Informa Healthcare; 2007.
 65. Aslan D, Yilmaztürk GC, Akalin N, Büyükbeşe MA, Sermez Y, Fenkçi S. Klinik Laboratuvar test Sonuçlarının Uluslararası ve Ulusal Harmonizasyonu, Standardizasyonu ve HbA1c Örneği. *Turkish J Biochem*. 2011;36(July):374–83.
 66. CLSI. User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition. CLSI Doc EP15-A3. 2014;34(12).
 67. Allinson JL. Clinical biomarker validation. *Bioanalysis*. 2018.
 68. Nichols JH. Verification of method performance for clinical laboratories. *Adv Clin Chem*. 2009;47:121–37.
 69. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures ; Approved Guideline — Third Edition. CLSI Doc EP05-A3. 3rd ed. 2014;34(13).

70. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. CLSI Doc EP09-A3. 3rd ed. 2013;33(11):98.
71. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. In: CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
72. CLSI. One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Doc H47-A2. 2nd ed. 2008;28(20).
73. CLSI. Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers; Approved Guideline. CLSI Doc H57-A. 2008;28(4).
74. Madenci Ö, Orçun A, Yıldız Z, Sirmali R, Tunçbilek N, Yücel N, et al. Evaluation of new beckman coulter 25(OH) vitamin D assay and potential improvement of clinical interpretation. *Biochem Medica*. 2017;
75. CMS, CDC H. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) Proficiency Testing Regulations Related to Analytes and Acceptable Performance. *Fed Regist* [Internet]. 2019;84(23):1536–67. Available from: <https://www.federalregister.gov/documents/2019/02/04/2018-28363/clinical-laboratory-improvement-amendments-of-1988-clia-proficiency-testing-regulations-related-to>
76. Dade Actin FS Activated PTT Reagent [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=544577>
77. Thromborel S [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=542042>
78. INNOVANCE D-Dimer [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://doclib.siemens-healthineers.com/rest/v1/view?document-id=556541>
79. Sysmex CS-2500 System: Mid-volume automated coagulation analyzer - Siemens Healthineers Türkiye [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 19]. Available from: <https://www.siemens-healthineers.com/tr/hemostasis/systems/sysmex-cs-2500-system>
80. CP3000 automated coagulation system [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 18]. Available from: <https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/category/coagulation/coagulation-cat>
81. Huber AR, Méndez A, Brunner-Agten S. Automation in haemostasis. *Hamostaseologie*. 2013.
82. Jennings I, Kitchen D, Woods T, Kitchen S, Walker I. Emerging Technologies and Quality Assurance: The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme Perspective. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2007 Apr;33(3):243–9. Available from: <http://www.thieme->

connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-971810

83. Hayward CPM, Moffat KA, Plumhoff E, Van Cott EM. Approaches to investigating common bleeding disorders: An evaluation of North American coagulation laboratory practices. *Am J Hematol*. 2012;
84. Givens TB, Braun PJ. Classification of factor deficiencies from coagulation assays using neural networks. *Int J Med Inform*. 1997;
85. Lippi G, Cervellin G, Casagrande I, Morelli B, Testa S, Tripodi A. D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. Consensus document of AcEMC, CISMEL, SIBioC, and SIMeL. *Clin Chem Lab Med*. 2014;
86. CLSI. Quantitative D-dimer for the Exclusion of Venous Thromboembolic Disease; Approved Guideline. CLSI Doc H59-A. 2011;31(6).
87. De Maat MPM, Meijer P, Nieuwenhuizen W, Haverkate F, Kluft C. Performance of semiquantitative and quantitative D-dimer assays in the ECAT external quality assessment program. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2000.
88. Favresse J, Lippi G, Roy P-M, Chatelain B, Jacqmin H, ten Cate H, et al. D-dimer: Preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2018 Nov 17;55(8):548–77. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408363.2018.1529734>
89. Olson JD, Cunningham MT, Higgins RA, Eby CS, Brandt JT. D-dimer: Simple test, tough problems. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;
90. Yis OM, Bugdayci G, Pehlivan MB, Yildiz RN, Alisik M. Analytical performance evaluation of Sysmex CS-2500 and Stago STA Compact. *Blood Coagul Fibrinolysis* [Internet]. 2020 May 7; Publish Ahead of Print. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/MBC.0000000000000920>
91. Meijer P, Kynde K, Van Den Besselaar AMHP, Van Blerk M, Woods TAL. International normalized ratio (INR) testing in Europe: Between-laboratory comparability of test results obtained by Quick and Owren reagents: A collaborative study from the European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(10):1698–702.
92. Fischer F, Appert-Flory A, Jambou D, Toulon P. Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex® CA-7000. *Thromb Res* [Internet]. 2006 Jan;117(6):721–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384805002628>
93. Martin-Toutain I, Jobic L, Mancic T, Brissard A, Ankri A. Evaluation of the automated coagulation analyser Sysmex® CS-5100 (Siemens). *Ann Biol Clin (Paris)* [Internet]. 2015 Jul;73(4):413–9. Available from: <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/abc.2015.1054>

94. Barcellona D, Biondi G, Vannini ML, Marongiu F. Comparison between Recombinant and Rabbit Thromboplastin in the Management of Patients on Oral Anticoagulant Therapy. *Thromb Haemost* [Internet]. 1996 Jul 26;75(03):488–90. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1650302>

