

SİTRAT MİKTARININ PROTROMBİN ZAMANI TESTİNE ETKİSİ

PROTROMBİN ZAMANI TESTİNİN ZAMANA BAĞLI STABİLİTESİ

Taner ÖZGÜRTAŞ¹, Muhittin SERDAR¹, Türker KUTLUAY¹

EFFECT OF CITRATE CONCENTRATION ON PROTHROMBIN TIME ANALYSIS TIME DEPENDENT STABILITY OF PROTHROMBIN TIME ANALYSIS

Summary: This study was developed to investigate the effect of the ratio of citrate to blood on prothrombin time analysis. In addition, the results of the studies of the samples known with various citrate contents ran at once and after 4-hours separately were examined with respect to time dependency. 45 healthy male individuals (23±4 years old) were included in the study and venous blood samples were collected according to four groups which had ratios of 0.1/1.9 - 0.2/1.8 - 0.3/1.7 - 0.4/1.6 of citrate / blood, respectively. Prothrombin time assays of all samples were run immediately and after 4-hours in duplicate.

All of the groups when compared to each other, had statistically significant differences for the immediate measurements. On the other hand, prothrombin time results of samples ran after 4-hours were found similar to those obtained immediately.

As a result, it is suggested that it is necessary to pay attention for sampling in order not to obtain falsely increased prothrombin time values. It is also concluded that preanalytical errors should be detected when results, which are not correlated with the clinical signs and symptoms, are obtained. It also became evident that prothrombin time results remained unchanged even the samples were left for four hours without analyzed.

Key Words: Prothrombin time, citrate / blood ratio, relation between PT and time

Özet: Bu çalışma, protrombin zamanı (PTZ) testinin, sitrat/kan (1/9) oranındaki değişikliklerden etkilenip etkilenmediğini incelemek üzere planlandı. Ayrıca, farklı sitrat oranlarına sahip örnekler hemen ve dört saat sonra okunarak, sonuçların zamana bağlı olarak değişip değişmediği araştırıldı. Çalışmaya 45 sağlıklı erkek birey katıldı, her bireyden alınan venöz kan örnekleri sitrat/kan olarak 1.grup 0.1/1.9 oranında, 2.grup 0.2/1.8 oranında, 3.grup 0.3/1.7 ve 4.grup 0.4/1.6 oranında hazırlandı. Tüm örneklerden, alınır alınmaz ve dört saat sonra PTZ testi ikişerli olarak çalışıldı ve dört grubun sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldı. Hemen yapılan ölçümlerde tüm grupların sonuçları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0.01$). Ayrıca, dört saate kadar beklemiş kan örneklerinde PTZ sonuçlarının, taze alınmış örneklerden farklı olmadığı saptandı($p>0.05$).

Sonuç olarak, yanlış yüksek PTZ değerlerinden kaçınmak için örnek alınma mutlaka dikkat edilmesinin gerekli olduğu ve klinikle uyumsuz sonuçlarla karşılaşıldığında öncelikle preanalitik hataların gözden geçirilmesinin uygun olacağı düşünüldü. Ayrıca dört saate kadar beklemiş örneklerde, PTZ sonuçlarının değişmediği değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: PTZ testi, sitrat/kan oranı, PTZ testi ve zaman ilişkisi

GİRİŞ

Protrombin zamanı testi, oral antikoagülan tedaviyi takip etmede rutin olarak kullanılan bir testtir. Bu test sitratlı plazma ile tromboplastin

reaktifi arasında gelişen reaksiyon sonucu pıhtı oluşumunun zamana göre tanımlanmasıdır. Birçok faktör PTZ sonuçlarını etkileyebilir; kullanılan cihaz, reaktif, örnek taşınımı, sıcaklık ve sitrat/kan oranındaki değişimler gibi. Sitrat/kan (1/9) oranı



sitrat lehine değiştiğinde, PTZ sonuçlarında yanlış yüksek değerlere neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(1,2). Ancak yoğun kan alım merkezlerinde ve örnek hazırlamanın manuel yapıldığı yerlerde sitrat/kan oranı ayrı bir önem kazanmaktadır. Hatta bazı durumlarda örnek hazırlamadaki hatalar yanlış ve klinikle uyumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Bu maksatla biz, hatalı sitrat/kan oranlarının sonuçları ne kadar etkilediğini araştırmak ve yine bu örneklerde zamana bağlı bir değişiklik olup olmadığı incelemek için bu çalışmayı planladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. Önceden hazırlanmış 0.1-0.2-0.3-0.4 cc sitrat (%3.8) bulunan kırmızı kapaklı düz kan tüplerine (Vacutainer system, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 45 sağlıklı erkek bireyden alınan venöz kan örneklerinden sırasıyla 1.9-1.8-1.7-1.6 cc aktarıldı ve toplam hacim 2 cc' ye tamamlanıp karıştırıldı. Alınan örnekler oda sıcaklığında 4500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası örneklerden PTZ testi hemen çalışıldı ve bu ilk çalışma 0. saat olarak kabul edildi. Örneklerin plazması, ayrılmadan aynı tüplerde oda sıcaklığında bekletildi ve 4 saat sonra PTZ testi tekrar edildi tüm testler ikiyeşerli olarak çalışıldı.

PTZ testi, mekanik ölçüm yöntemi ile CS-190 (Amelung, AMAX, ALMAN) marka koagülasyon analizörü kullanılarak ölçüldü. Tromboplastin reaktifi olarak (ThromboMAX with calcium, Sigma

Diagnostics, T9902, ST LOUIS, USA) kullanıldı.

Bu çalışmanın istatistikleri SPSS 7.5 versiyonuyla yapıldı. Bağımlı gruplar için t-testi ve varyans analizi uygulandı. Anlamlılık p değeri < 0,05 olarak belirlendi.

BULGULAR

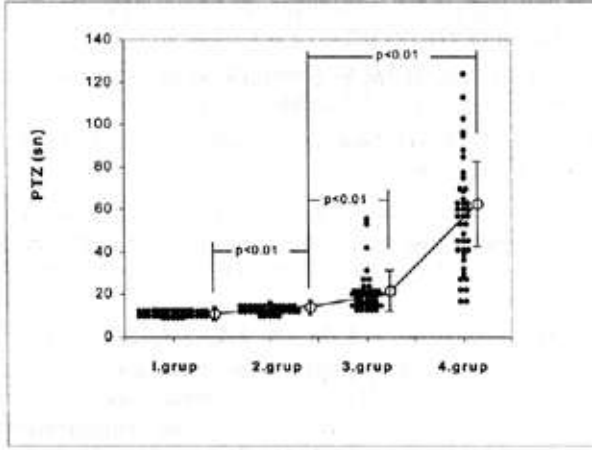
Grupların 0. saatteki PTZ sonuçları: 1. (0.1/1.9) grup için 11.3 ± 1.1 (ortalama \pm standart sapma) saniye, 2. (0.2/1.8) grup için 12.8 ± 1.2 saniye, 3. (0.3/1.7) grup için 20.9 ± 9.1 saniye, 4. (0.4/1.6) grup için 57.1 ± 26.8 saniye olarak bulundu. Dört saat sonra ölçülen PTZ sonuçları ise: 1. grup için 11.1 ± 1.1 saniye, 2. grup için 12.7 ± 1.4 saniye, 3. grup için 20.1 ± 7.3 saniye ve 4. grup için 49.5 ± 21.7 saniye olarak bulundu (Tablo-I).

Grupların 0. saatteki değerleri karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,01$) ve sitrat oranı arttıkça PTZ süresi de uzamaktaydı (Şekil-1). 0. saat ile 4. saatteki PTZ değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0,05$), sadece PTZ sürelerinde nispi bir kısalma vardı ve bu kısalma 0.1 ila 0.8 saniye arasındaydı. 4. grubun, 0. ve 4. saatteki PTZ süreleri arasında belirgin bir kısalma vardı ancak 4. grubun her iki değeri de klinikle tamamen uyumsuzdu.

Tablo I: Grupların sitrat miktarına göre 0. ve 4. saatteki PTZ sonuçlarının karşılaştırması

Saatler	n	1. grup (0.1/1.9)*	2. grup (0.2/1.8)	3. grup (0.3/1.7)	4. grup (0.4/1.6)	p
0. saat	45	$11.3 \pm 1.1^{**}$	12.8 ± 1.2	20.9 ± 9.1	57.1 ± 26.8	< 0.01
4. saat	45	11.1 ± 1.1	12.7 ± 1.4	20.1 ± 7.3	49.5 ± 21.7	< 0.01
p		0.176	0.538	0.562	0.519	

* sitrat/kan oranı, ** (ortalama \pm standart sapma) saniye



Şekil 1: Sitrat miktarının değişimine bağlı 0. saat PTZ değerlerinin karşılaştırılması

TARTIŞMA

Laboratuvar testlerinin doğru ve güvenilir olabilmesi için test sonuçlarını etkileyen faktörlerin bilinmesi ve mümkünse kontrol altına alınması gerekmektedir. Hatalı sonuçların ilk basamağında örnek alımı, örneğin transportu ve saklanmasına ilişkin preanalitik hatalar yer almaktadır. Biz de bu çalışmada, örneklerin sitrat/kan oranlarını değiştirerek PTZ sonuçlarının preanalitik hatalardan ne ölçüde etkilendiğini sağlıklı bireylerden alınan örnekler üzerinde araştırdık.

Türkiye' de ve bir çok ülkede oral antikoagülan olarak en çok warfarin kullanılmaktadır. Bu ilacın en önemli dezavantajı terapötik sınırlarının oldukça dar olmasıdır. Gerek iskemiden gerekse inme ve kanama ataklarından kaçınmak için ilaç dozu devamlı monitörize edilmelidir. Yaşlılarda yapılan bir çalışmada yüksek warfarin dozunun, intrakranial kanamanın başlıca risk faktörlerinden biri olduğu gösterilmiştir(3). Bu nedenle, antikoagülan dozunun PTZ testiyle devamlı kontrol altında tutulması gerekir.

Çalışmamızda, sitrat miktarını değiştirerek PTZ sürelerindeki değişimleri gözlemledik. Örneklerin sitrat/kan oranlarını değiştirirken 2 cc' lik total örnek hacmine bağlı kaldık. Bunu yaparken, istem dışı

meydana gelebilecek preanalitik hataların PTZ sonuçlarını nasıl etkilediğini görmek istedik. Çalışma sonuçları gösterdi ki, 0.1 cc ile 0.2 cc sitratlı örnekler arasında istatistiksel anlamlı bir fark ($p<0.01$) olmasına rağmen klinik olarak PTZ sonuçları kabul edilebilir aralıkta

% 15' lik değişim limitleri içinde yer alıyordu(4). Ancak sitrat miktarı 0.3 cc' ye çıktığında klinikle laboratuvar arasında anlaşmazlıklara neden olabilecek ölçüde, kabul edilebilirlik sınırlarının üzerinde (%15), PTZ sürelerinin uzadığı görüldü($p<0.01$). Sitrat 0.4 cc' ye çıktığında, fark yine anlamlı ($p<0.01$) ve PTZ değerlerinin tamamen klinikle uyumsuz olduğu değerlendirildi. Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesinin (NCCLS) önerilerine uygun olarak 0.2\1.8 (1\9 oranında) hazırlanan örneklerin ortalama PTZ değeri sağlıklı bireylerde 12.8 ± 1.2 saniye iken, sitrat miktarı sadece 0.1 cc artığında ortalama PTZ değeri 20.9 ± 9.1 saniyeye çıkmaktadır. Reneke ve ark.'ları tarafından yapılan benzer bir çalışmada, koagülasyon tüplerinin %70-80 kapasiteyle doldurulduğunda bile hasta sonuçlarının değişmediği ancak sağlıklı sonuçlar için %90 kapasitesi ile doldurulmasının uygun olacağı belirtilmiştir(5). Sonuçlarımız, Ingram ve Hills ile Duncan ve ark.'larının sonuçları ile uyumludur(6,7). Her iki çalışmada da, sitrat miktarının artışı ile PTZ sonuçlarının uzadığı gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlarımız, Danielson ve ark.'larının sitrat konsantrasyonlarının PTZ sonuçlarını etkilediğine ait çalışma ile de uyumludur(8). Böyle yanlış yüksek sonuçlar klinik olarak doktorun beklemediği bir sonuç olup, hasta hakkında yanlış yorum yapmasına veya ameliyat konsültasyonlarında kararsız kalmasına neden olmaktadır. Bu durumda en azından PTZ testinin tekrarı gerekmektedir. Bu sonuçlar bize, sağlıklı bireylerde bile preanalitik hataların PTZ testi üzerinde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Tabii ki sonuçlar antikoagülan kullananlarda daha da dramatik olarak yükselebilir.



Çalışmamızın ikinci bölümünde, aynı örneklerin, dört saat sonra ki sonuçlarının ilk alınan sonuçlardan farklı olup olmadığını gözlemledik. Burada ki amacımız, laboratuvarların günlük yoğunlukları içinde alınan örneklerin, nispeten geç çalışılmasının, sonuçları ne ölçüde etkilediğini öğrenmek ve zaman zaman bulduğumuz anormal sonuçların bu gecikmeden kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmaktır. 4 gruba ait örnekler santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrılmaksızın oda ısısında dört saat bekletildi ve tekrar ölçülerek sonuçları yorumlandı. Bazı örneklerde PTZ sürelerinde, çok ufak kısalmalar olsa da bu kısalmalar göz ardı edilebilecek düzeydeydi. Bu sonuçlar gösterdi ki, örneklerin oda ısısında 4 saat beklemesi PTZ sonuçlarını anlamlı ölçüde etkilememektedir ($p>0,05$). Literatürde de PTZ sonuçlarının beklemeye bağlı değişiklikleri ile ilgili çalışmalarda, kimi yazarlar 6 saate kadar kimileri 8 saate kadar hatta Rao ve ark.' ları ise 24 saate kadar oda ısısında örnekleri bekletmenin PTZ sonuçlarını etkilemediğini göstermişlerdir(9,10,11). Bu ve benzer çalışmaların sonuçlarına göre, NCCLS' nin koagülasyon testleri için önerdiği(12), en geç iki saat içinde testlerin sonuçlandırılması şartının tekrar gözden geçirilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, PTZ testinin örnek hazırlamadaki hatalardan etkilendiği ve sağlıklı sonuçlar için preanalitik hataların azaltılmasının önemli olduğu belirlendi. Ayrıca, PTZ örneklerinin gerek laboratuvarında gerekse transportunda geçen sürenin ve meydana gelebilecek gecikmelerin dört saate kadar kabul edilebileceği ve bu sürenin sonuçları etkilemeyeceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Peterson P, Gottfried EL. (1982) The effects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). *Thromb Haemost.* 47:101-103.
- Pai SH, Michalaros K. (1990) Effect of sample volume on coagulation tests. *Lab Med.* 21:371-373.
- Hirsh J. (1991) Oral anticoagulant drugs. *N Engl J Med.* 324: 1865-1875.
- Burtis CA, Ashwood ER. (1999) Tietz textbook clinical chemistry. Quality management (Derleyen: Westgard JO, Klee GG.), s.412, 3 ed. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Reneke J, Ezzell J, Leslie S, Valerie L, Gottfried EL. (1998) Prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol/L (3.2%) citrate anticoagulant. *Am J Clin Pathol.* 109(6): 754-757.
- Ingram GIC, Hills M. (1976) The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost.* 36:230-239.
- Duncan EM, Casey CR, Duncan BM, Lloyd JV. (1994) Effect of concentration of trisodium citrate anticoagulant on calculation of the international normalised ratio and the international sensitivity index of thromboplastin. *Thromb Haemost.* 72:84-88
- Danielson FM, Davis K, Jones G, Benson J. (1997) Effect of citrate concentration in specimen collection tubes on the international normalised ratio. *Arch Pathol Lab Med.* 121:956-959.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays. (1991) 2nd ed. Approved Guideline. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS document H21-A2.
- Koepke JA, Rodgers JL, Ollivier MJ. (1975) Pre-instrumental variables in coagulation testing. *Am J Clin Pathol.* 64: 591-596.
- Neofotistos D, Oropeza M, TS'AO CH. (1998) Stability of plasma for add-on PT and APTT tests. *Am J Clin Pathol.* 109(6): 758-763.
- Rao LV, Okorodudu AO, Petersen JR, Elghetany MT. (2000) Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. *Clin Chim Acta* 300: 13-21.