



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

HEMATOLOJİ ANALİZÖRÜ VE FLOW SİTOMETRİ KULLANILARAK KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNİN İNCELENMESİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ercan ORAN

Temmuz-2019



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİ ANALİZÖRÜ VE FLOW SİTOMETRİ KULLANILARAK KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİNİN İNCELENMESİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ercan ORAN

Tez Danışmanı:

Prof.Dr. Ferruh Kemal İŞMAN

Temmuz-2019

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü'nde Yüksek Lisans öğrencisi olan Ercan ORAN'ın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "Hematoloji Analizörü ve Flow Sitometri Kullanılarak Kemik İliği Örneklerinin İncelenmesi" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

Tez Danışmanı:

Prof.Dr.Ferruh Kemal İŞMAN

İstanbul Medeniyet üniversitesi

Üyeler:

Prof.Dr.Mustafa Baki ÇEKMEN

İstanbul Medeniyet üniversitesi

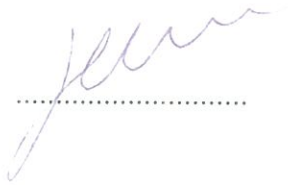
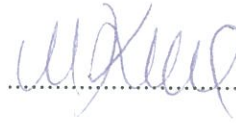
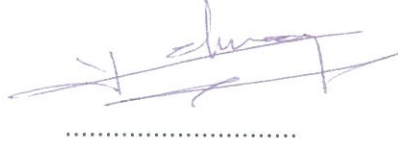
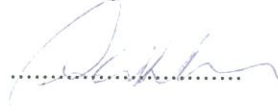
Prof.Dr.Mine KUCUR

İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Hayriye Erman

İstanbul Medeniyet üniversitesi

İMZA



ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü bünyesinde hazırladığım bu Doktora tezinin bizzat tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu tezde;

- 1- Çeşitli yazarların çalışmalarından faydalandığımda bu çalışmaların ilgili bölümlerini doğru ve net biçimde göstererek yazarlara açık biçimde atıfta bulunduğumu;
- 2- Yazdığım metinlerin tamamı ya da sadece bir kısmı, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmışsa bunu da açıkça ifade ederek gösterdiğimi;
- 3- Alıntılanan başkalarına ait tüm verileri (tablo, grafik, şekil vb. de dahil olmak üzere) atıflarla belirttiğimi;
- 4- Başka yazarların kendi kelimeleriyle alıntıladığım metinlerini kaynak göstererek atıfta bulunduğum gibi, yine başka yazarlara ait olup fakat kendi sözcüklerimle ifade ettiğim hususları da istisnasız olarak kaynak göstererek belirttiğimi,

beyan ve bu etik ilkeleri ihlal etmiş olmam halinde bütün sonuçlarına katlanacağımı kabul ederim.

Ercan Oran

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan ve önerilerini göstermekten kaçınmayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ferruh Kemal İŞMAN'a teşekkür ve saygılarımı sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ERMAN hocama ve Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji ve Genetik Laboratuvarında bu çalışmamız için hasta verilerini bize sağlayan Uz. Dr. Nurgül ÖZCAN ve ekibine ayrıca çalışmam sırasında küçük veya büyük yardımlarını esirgemeyen İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarında çalışan Asist. Dr. Afife Şerifoğlu, Asist. Dr. Nevin Gençkahraman, Asist. Dr. Rabia Korkmaz, Asist. Dr. Eray Kırış, Asist. Dr. Alperen Aksoy ve Asist. Dr. Emre Yalçinkaya arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 HÜCRESEL ANALİZ	5
2.1.1 Hücresel Analize Tarihsel Bakış.....	5
2.15 Optik Işık Ölçümleri	13
2.3.5 Akut Lösemiler	28
2.3.5. 1 Akut Miyeloid Lösemi (AML)	29
2.3.5.2 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	31
2.3.5.3 T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T ALL):	32
2.3.5.4 Multiple Miyelom (MM)	32
2.4 ANALİTİK PERFORMANS.....	33
2.4.1 Metot Validasyonu	33
2.4.2 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) H26-A2 Prosedürü	34
2.4.2.1 Kalibrasyon ve Kalite Kontrol Enstrüman Kalibrasyonu:	35
2.4.2.2 Tam Kan Cross-check.....	36
2.4.2.3 Ticari kontrol materyalleri	37
2.4.2.4 TAA - Test Automated Analyzer	37
2.4.2.5 CAA - Comparative Automated Analyzer	38
2.4.2.6 Metot validasyon parametreleri:	38
2.4.3 Doğruluk (Accuracy)	39
2.4.4 Doğrusallık (Linearity) -Analitik Ölçüm Aralığı (AMI).....	39
2.4.4.2 Tam Kan Konsantrasyonu ve Dilüsyonu	41
2.4.5. Analitik Ölçüm Limitleri	44
3. GEREÇ YÖNTEM	51
3.1. Hasta Gruplarının Özellikleri.....	51
3.2. Örnek Toplama ve Analizlenen Parametreler	51
3.3.Uygulanan Yöntemler	53
3.3.1. Akut Lenfositik Lösemi Paneli (ALL).....	53
3.3.2. Akut Myeloid Lösemi Paneli (AML)	54
Yüzey Boyama Tekniği	54
3.3.3. Multipl Miyelom Paneli (MMP).....	56

Yüzey Boyama Tekniği	56
3.3.4. Lenfoma	57
Yüzey Boyama Tekniği	57
3.4. Metot Validasyon Parametreleri	59
3.4.1. Doğrusallık (Linearite).....	60
3.4.2. LOB/LOD (WBC, Hb, Plt Parametreleri için).....	62
3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Precision).....	62
3.4.3.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik	62
3.4.4. Carry Over	62
3.5. Üreticiye Ait Performans Özellikleri	63
3.5.1. Pentra DX Nexus Tekrarlanabilirlik (Precision).....	63
3.5.2. Tekrarlanabilirlik için Değerlendirme Protokolü (Gün içi Tekrarlanabilirlik):	64
3.5.3. Analitik Ölçüm Aralığı (Linearite)	64
3.5.4. Numuneler Arasında Kontaminasyon	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. Doğrusallık (Linearite).....	66
4.2. LOB/LOD (WBC, Hb, Plt Parametreleri için).....	69
4.3. Tekrarlanabilirlik (Precision).....	70
4.4. Carry Over	73
4.5. Karşılaştırma Verileri.....	73
4.6. LIC Değeri %5'in Üstünde Olan Hastalar İçin Karşılaştırma Verileri	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	84
KAYNAKÇA.....	88
ETİK KURUL ONAY FORMU	92
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Empedans veya Coulter Prensibi(5)	11
Şekil 2. Empedans Sinyalinin Ortalama Hücre Hacminin (MCV) Ölçümüne Dönüştürülmesi(5)	12
Şekil 3. Radyofrekans Sinyali En Çok Nükleer Boyuta Duyarlıdır.....	13
Şekil 4. Tek ve Çift Parametrelili Histogramlarda Tipik Kan Hücresi Konumları.(a) Tek Parametrelili Veya Tek Değişkenli Grafikler.(b) Dağılımlı veya İki Değişkenli Grafikler(5).	15
Şekil 5. Lazer Işınının PMT Sinyallerine Çevrilmesi	21
Şekil 6. FSC ve SSC Detektörlerinde Elde Edilen Verilerle Lökositlerin Hücre Büyüklüğü Ve Granülariteleriyle Ayrılması(14).	22
Şekil 7. Tek Floresan Boya İle İşaretli Antikoron Kullanılmasıyla Hücre Yüzey Belirteçlerinin Saptanması(14).	23
Şekil 8. İki Farklı Floresan Antikor İle Elde Edilen Grafik İle Hücre Ayrımı Ve Kantitatif Yüzde Analizi (14).....	23
Şekil 9. B Hücrelerin CD45 Miktarına ve 90° Kırılan Işık (SSC) Özelliklerine Göre Ayrımı(42).	29
Şekil 10. Carryover Önerilen Örnek Verileri.....	63
Şekil 11. WBC Linearite Grafiği	66
Şekil 12. Rbc Linearite Grafiği.....	67
Şekil 13. Plt Linearite Grafiği.....	67
Şekil 14. Hb Linearite Grafiği	68
Şekil 15. HCT Linearite Grafiği	68
Şekil 16. Wbc LOB/LOD Grafiği.....	69
Şekil 17. %Nötrofil (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği.....	74
Şekil 18. %LYM (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği.....	75
Şekil 19. %Monosit (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği	76
Şekil 20. %Eozinofil (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği.....	77
Şekil 21. %IML(flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği	78
Şekil 22. %LIC (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği	79

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kan Sayım Yöntemlerinde Otomasyona Öncülük Eden Temel Taşların Kısa Tarihçesi(3).....	7
Tablo 2. Florokrom Tablosu(19).....	18
Tablo 3. ASM nin Tanıya Katkıda Bulunduğu Hematolojik Hastalıklar(42)	28
Tablo 4. Tam Kan Cross-Check Limitleri.....	37
Tablo 5. RBC, Hb, HCT, PLT Manipülasyon Tablosu	42
Tablo 6 WBC Manipülasyon Tablosu.....	42
Tablo 7. Önerilen Carryover Örnek Değerleri	49
Tablo 8. ALL Antikor Tablosu.....	54
Tablo 9. AML Antikor Tablosu	55
Tablo 10. Multiple Myelom Antikor Tablosu	56
Tablo 11. Lenfoma Antikor Tablosu	59
Tablo 12. RBC, Hb, HCT Şeması (HCS: Yüksek Sayılı Hücre Stoğu LCS: Düşük Sayılı Hücre Stoğu)	60
Tablo 13. WBC Manipülasyon Tablosu.....	61
Tablo 14. RBC, Hb, HCT, PLT Manipülasyon Tablosu	61
Tablo 15. Pentra DX Nexus Kabul Edilebilir CV Sınırları Tablosu	63
Tablo 16. Pentra DX Nexus Ortalama CV (insan).....	64
Tablo 17. Pentra DX Gün İçi Tekrarlanabilirlik Tablosu.....	64
Tablo 18. Pentra DX Nexus Analitik Ölçüm Aralığı	65
Tablo 19. WBC- LOB/LOD Tablosu	69
Tablo 20. Plt- LOB/LOD Tablosu.....	70
Tablo 21. Hb- LOB/LOD Tablosu	70
Tablo 22. WBC, Rbc Hb Plt İçin Tekrarlanabilirlik Tabloları	70
Tablo 23. Hb Gün İçi Tekrarlanabilirlik	72
Tablo 24. Wbc Gün İçi Tekrarlanabilirlik Tablosu	72
Tablo 25. Plt Gün İçi Tekrarlanabilirlik Tablosu	73
Tablo 26. Carryover Veri Tablosu	73
Tablo 27. %CD34(flow)-%ALY(cbc) Karşılaştırma Tablosu	79
Tablo 28. %CD34(flow)- %İML(cbc) Karşılaştırma Tablosu	80
Tablo 29. %CD34(flow)-%İMM(cbc) Karşılaştırma Tablosu	80
Tablo 30. %CD34(flow)-%LIC(cbc) Karşılaştırma Tablosu	80
Tablo 31. %IMG (flow-CBC) Karşılaştırma Tablosu.....	80
Tablo 32. Karşılaştırma Verileri Tablosu.....	81
Tablo 33. LIC Değeri %5'in Üstünde Olan Hastalar İçin Karşılaştırma Verileri	81
Tablo 34. %CD34(flow)-%ALY(CBC) Karşılaştırma Tablosu.....	81
Tablo 35. %IMG(flow)-%ALY(CBC) Karşılaştırma Tablosu.....	82
Tablo 36. %IMM(flow)-%ALY(CBC) Karşılaştırma Tablosu	82
Tablo 37. %LIC(flow-CBC) Karşılaştırma Tablosu	82
Tablo 38. Lösemi Altgruplarının Tam Kan Sayımı Verileri	83

KISALTMALAR

ALY: Atipik Lenfositler

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

AMI: Analitik Ölçüm Aralığı

AML: Akut Miyeloid Lösemi

CAA: Karşılaştırmalı Otomatize Analizör

CAP: Amerikan Patologlar Birliği

CBC: Tam Kan Sayımı

CLSI: Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü

DHSS: Çift-Hidrodinamik Ardışık Sistem

FSC: Forward Scatter Channel (ileri saçılım kanalı)

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

HCS: Yüksek Hücre Stoğu

HCT: Hematokrit

HGB: Hemoglobin

HLA CD: Human Leucocyte Antigen Cluster of Differentiation

ICSH: Hematoloji Uluslararası Standardizasyon Konseyi

IMG: İmmature Granülosit

IML: İmmature Lenfosit

IMM: İmmature Monosit

KI: Kemik İliği

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

KML: Kronik Lenfositik Lösemi

LCS: Düşük Hücre Stoğu

LOB: Limit of Blank

LOD: Limit of Detection
LOQ: Limit of Quantitation
LIC: Büyük İmmature Hücreler
MCV: Ortalama Hücre Hacmi
MM: Multiple Miyelom
NCCLS: Ulusal Klinik ve Laboratuvar Standartları Komitesi
NHL: NonHodgkin Lenfoma
PMT: Photomultiplier Tup
RBC: Kırmızı Kan Hücresi
SSC: Side Scatter Channel(Yan saçılım kanalı)
TAA: Test edilen otomatize Analizör
WBC: Beyaz Kan Hücresi

ÖZET

HEMATOLOJİ ANALİZÖRÜ VE FLOW SİTOMETRİDE KEMİK İLİĞİ ÖRNEKLERİ KULLANILARAK YÖNTEM KARŞILAŞTIRILMASI

AMAÇ. Hematoloji analizörlerinde anormal işaretler (flag'ler) immature hücreleri göstermektedir. Otomatik kan hücresi sayacı(CBC) kullanılarak kemik iliği aspiratlarını analizi sınırlı yapılabilmektedir. Bu çalışmada öncelikle, Pentra DX Nexus hematoloji analizörü analitik performanslarının değerlendirilmesi amaçlandı. İkinci olarak, kemik iliği numunelerinde immatür hücrelerin sayımında flow sitometri ve Pentra DX Nexus hematoloji analizörünün karşılaştırılması amaçlandı.

YÖNTEM. Bu çalışma Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji poliklinikliğine rutin olarak başvuran 41 Akut Myeloid Lösemi, 42 Akut Lenfoblastik Lösemi, 48 Multipl Miyelom, 44 Lenfoma olmak üzere toplam 175 hasta numuneleri esas alınarak yapıldı. Bu ölçümlerden önce Pentra DX Nexus hematoloji analizörün analitik performansı CLSİ H26-A2 prosedürene uygun olarak yapıldı. Hastalardan alınan kemik iliği numunelerinde Büyük immatür hücreler(LİC), Atipik lenfositler(ALY), İmmatür lenfosit(IML), İmmatür granülosit(IMG), İmmatür monosit(IMM) yüzdeleri iki cihazda da ölçüldü ve çıkan sonuçlar karşılaştırıldı.

BULGULAR. Tekrarlanabilirlik, doğrusallık, LOB/LOD değerleri ve carry over üreticinin özellikleri ile uyumluydu. Nötrofil, Monosit Lenfosit Eozinofil, IML ve LIC yüzde değerleri flow sitometri ve CBC arasındaki korelasyon katsayıları sırasıyla 0,938, 0,616, 0,677, 0,576, 515 ve 0,567 idi. CBC değerlendirilen ALY ile flow sitometri değerlendirilen CD34+ hücre, IMM ve IMG korelasyon katsayıları sırasıyla 0,209, 0,141, 0,254 iken LIC değeri 5 üstünde olan hastalarda aynı korelasyon katsayıları sırasıyla 0,620 0,398, 0,674 'e yükseldi.

SONUÇ. Pentra DX Nexus hematoloji analizörü kullanılarak kemik iliği aspiratlarını analizinde IML ve LIC değerleri kemik iliği blast konsantrasyonu hakkında ön bilgi

verebilir. Blast konsantrasyonu yüksek hastalarda düşük hastalara göre CBC daha fazla bilgi vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Otomatik kan hücresi sayacı, Flow sitometri, Flag, immature hücreler

ABSTRACT

COMPARISON OF METHODS USING BONE MARROW SAMPLES IN HEMATOLOGY ANALYZER AND FLOW CYTOMETRY

OBJECTIVE. Abnormal signs (flags) on hematology analyzers show immature cells. Analysis of bone marrow aspirates can be limited using an automated blood cell counter (CBC). The aim of this study was to evaluate the analytical performance of Pentra DX Nexus hematology analyzer. Secondly, it was aimed to compare flow cytometry and Pentra DX Nexus hematology analyzer for counting immature cells in bone marrow samples.

METHODS. This study was based on 41 Acute Myeloid Leukemia, 42 Acute Lymphoblastic Leukemia, 48 Multiple Myeloma, 44 Lymphoma were collected to the samples of 175 patients who applied to Hematology Polyclinic of Abdurrahman Yurtaslan Ankara Oncology Training and Research Hospital routinely. Prior to these measurements, the analytical performance of the Pentra DX Nexus hematology analyzer was performed according to the CLSI H26-A2 procedure. Percentage of large immature cells (LIC), atypical lymphocytes (ALY), immature lymphocyte (IML), immature granulocyte (IMG), and immature monocyte (IMM) were measured in the bone marrow samples taken from the patients and the results were compared.

RESULTS. Repeatability, linearity, LOB / LOD values and carry over were consistent with the manufacturer's specifications. Neutrophil, Monocyte Lymphocyte Eosinophil, IML and LIC percentage values were correlated between flow cytometry and CBC 0.938, 0.616, 0.677, 0.576, 515 and 0.567, respectively. CBC evaluated ALY and flow cytometry evaluated CD34 + cell, IMM and IMG correlation

coefficients 0.209, 0.141, 0.254 respectively while the same correlation coefficients increased to 0.620 0.398, 0.674 in patients with LIC values above 5, respectively.

CONCLUSION. In the analysis of bone marrow aspirates using the Pentra DX Nexus hematology analyzer, IML and LIC values may provide preliminary information about bone marrow blast concentration. CBC gives more information in patients with high blast concentration than in patients with low blast concentration

Keywords: Automated blood cell counter, Flow cytometry, Flag, immature cells

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kemik iliği aspiratlarının incelenmesi, çeşitli hematolojik hastalıkların teşhisi, kanserin kemik iliğine metastazı ve kemoterapinin kemik iliği etkilerinin izlenmesi için vazgeçilmezdir. Kemik iliği aspirat analizi klasik olarak mikroskopik olarak gerçekleştirilmektedir. Bu manuel yöntem, az sayıdaki hücrenin sayılması nedeniyle imkânsızdır ve emek yoğun ve zaman alıcıdır. Son yıllarda gelişen teknolojiye bağlı olarak kemik iliği elemanlarının immünomorfolojik özelliklerinin akım sitometri ile değerlendirilmesi oldukça önem kazanmıştır. Akım sitometri ile çok parametrelili analizler yapılabilmekte, hücrelerden oldukça fazla veri elde edilebilmekte ve parametreler arasındaki ilişki ölçülebilmektedir. Hücre analizinden elde edilen bu veriler klinik tanıda ciddi katkılar sağlayabilmektedir. Ayrıca Otomatik hematoloji analizörleri ile kemik iliği analizinin daha hızlı ve daha objektif muayene yapılması mümkün gibi gözükse de çeşitli teknik problemlerden dolayı yeterli doğruluk elde edilememiştir. Başlıca sorunlar arasında çekirdekli kırmızı kan hücrelerinin sayımının başarısız olması, olgunlaşmamış çeşitli hücrelerin doğru bir şekilde difüzyonunun zor olması ve kemik iliğindeki lipid interferasyonu sayılabilir. Bununla birlikte, teknolojiye kayda değer ilerlemeler, beyaz kan hücresi diferansiyeline ek olarak, otomatik kan hücresi sayaçlarının immatür granülositleri ve çekirdekli kırmızı kan hücreleri ayırt etmelerini ve saymalarını sağladı. Bir akış sitometri tekniği ve impedans ve absorbans kombinasyonunu kullanan Pentra DX Nexus da immatur granülosit ayırımını gerçekleştirebilmektedir.

PENTRA DX NEXUS otomatik hücre sayacı, ABX Diagnostics (Montpellier, Fransa) tarafından üretilen, saatlik 120 örnek çalışabilen bir hematoloji analizörü olup, üreticinin spesifikasyonlarına göre 5 bölümlü WBC diferansiyel sayısı da dâhil olmak üzere CBC sayımı; aynı zamanda Büyük immature hücreler(LIC'ler), Atipik lenfositler(ALY'lerin), İmmature lenfosit(IML), İmmature granülosit(IMG), İmmature monositlerin(IMM), numaralandırılmasını sağlar.

Ölçümler empedans, sitokimya ilkelerine dayanıyor ve hücre hacminin ve ışık emiciliğinin analiz edilmesinden önce numunelerin bir sitokimyasal reaktifle (chlorazol black, ABX Diagnostics) boyanmasıyla bağlantılı olarak çift-hidrokinamik ardışık sistem (veya DHSS) olarak adlandırılan teknoloji kullanılarak ışık absorpsiyonunun ölçülmesine dayanır.

PENTRA DX NEXUS otomatik hücre sayacı, klinik tanı hematoloji laboratuvarında performansı için ayrıntılı olarak, 5-bölümlü WBC diferansiyelinin hesaplanmasında ve işaretlenecek ilgili nicel ve / veya morfolojik anormalliklerin tanımlanmasında değerlendirilirken piyasaya sunulmasından şimdiye kadar herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir. Sadece PENTRA 120 (ABX Diagnostics) üzerinde çok az çalışma rapor edilmiştir.

Ulusal Klinik ve Laboratuvar Standartları Komitesi'ne (NCCLS) göre, yeni bir hematoloji analizörü tarafından sayılan toplam differansiyel WBC'lerin ve WBC ile ilişkili işaretlerin değerlendirilmesi konvansiyonel mikroskopik analizlere dayanmalıdır. Konvansiyonel mikroskopi, kompleks hematolojik numunelerin aydınlatılmasında ve habis ve reaktif hücrelerin dolaşımın doğrulanmasında son derece yararlı olmasına rağmen, WBC sayımlarına uygulanan kontrollerde bazı dezavantaj ve kısıtlamalara sahiptir:

- 1-Sayım için az sayıda hücre mevcuttur.
- 2- Farklı hücre türlerini numaralandırmak için tecrübe gereklidir.
- 3-Bu çok zaman gerektirir. Buna ek olarak, normalde kanda dolaşan, dendritik hücreler gibi bazı hücreler, morfolojik inceleme ile spesifik olarak tanımlanamaz ve farklı WBC popülasyonları, slayt boyunca farklı bir dağılım gösterebilir ve diferansiyel sayımlarda değişikliğe neden olabilir.

Akış sitometrisi, nispeten kısa bir sürede bir numunedeki farklı hücre popülasyonlarından yüksek sayıdaki hücrenin hassas çoklu parametrelerinin numaralandırılmasına olanak tanıyan yenilikçi, hızlı, duyarlı ve daha az operatöre bağımlı bir teknolojidir. Son yıllarda, WBC'lerin ışık saçılımı ve fenotipik özelliklerinin kombine akış sitometrik analizinin, normal ve patolojik örneklerde WBC'leri ve ana alt gruplarını doğru bir şekilde sıralamak için güvenilir bir yaklaşım gösterebileceği öne sürülmüştür.

Bu çalışmanın amacı, WBC'lerin ve ilgili kantitatif ve / veya morfolojik işaretlemeler için beş bölümlü diferansiyel analizde PENTRA DX NEXUS kan hücresi analizörünün performansını değerlendirmektir. Bu cihaz tarafından sağlanan sonuçlar, multiparametre flow sitometrik immünototipleme hücre analizörü kullanarak elde edilenlerle karşılaştırılacaktır.

Bu çalışmada, toplam 200 kemik iliği (KI) numunesi analiz edilecek. Bunların 50 tanesi RBC'lerde, WBC'lerde ve trombositler üzerinde nicel ve nitel morfolojik ve sayısal belirteçleri olmadığı için normal KI örnekleri idi. diğer 150 örnek, rutin bir RBC'lerde, WBC'lerde ve trombosit analizi üzerinde nicel ve / veya nitel morfolojik ve / veya sayısal belirteçleri dayalı olarak anormal olarak sınıflandırılacak.

Kemik iliği örnekleri, iliyak omurundan aspirasyonla antikoagülan olarak tripotassium EDTA içeren VACUTAINER tüplerine doğrudan alınacak. Tüm vakalarda, KI örnekleri, elde edildikten sonra 2 saat içinde analiz edilip; numune derhal analiz edilmediğinde, oda sıcaklığında stabil tutulacak. Numunelerin analizi, PENTRA DX Nexus analizöründe ve referans yöntem olarak çok parametrelili akım sitometrik immünototipleme (n=200; 50 normal ve 150 anormal örnek).

PENTRA DX Nexus ile WBC analizinde tüm KI numuneleri PENTRA DX NEXUS analizöründe "diferansiyel ve otomatik" modda çift olarak analiz edilecek. Yinelenen ölçümlerden türetilen ortalama değer hesaplanıp ve değerlendirmede kullanılacaktır. Aşağıdaki WBC ile ilgili parametrelerle ilgili bilgiler özellikle kaydedilecek; mutlak WBC sayısı ve mutlak ve göreceli nötrofil, lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofil sayıları. Varsa, anormal WBC popülasyonları (örneğin Büyük immatür hücreler, Atipik lenfositler, İmmatür lenfosit, İmmatür granülosit, İmmatür monosit) hakkında bilgi de kaydedilecektir.

WBC Diferansiyel Sayımlarının Çok Parametre Akışı Sitometrik İmmünototipik Analizinde 200 KI örneği çok parametrelili akım sitometresi ile analiz edilip ve bu numunelerin boyanması için Genişletilmiş Hematoloji Paneli kullanılacak. Kısaca, 100 uL önceden karıştırılmış kan, 12 x 75 mm'lik bir polisitrin tüpünde kalibre edilmiş bir pipet kullanılarak ters pipetleme ile yerleştirilecek, buna genişletilmiş Hematoloji Panelinin flüoresan boyalı monoklonal antikor karışımı eklenecek. Bu karışım karanlık ortamda 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilip ve bu

inkübasyon periyodu tamamlandıktan sonra distile suda 1/10 oranında seyreltilmiş BDB FACS Lysing Solüsyonunu çekirdeksiz RBC hücreleri parçalaması için 2ml eklenecek ve 10 dk daha karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilecektir. Tüm örnekler genişletilmiş Hematoloji Paneli protokolüne göre BD FACSDiva yazılımı veri analizi için kullanılacaktır.

WBC'lerin her bir alt grubunun tanımlanması için aşağıdaki fenotipik özellikler kullanılacaktır:

nötrofiller, forward scatter (FSC)int/side scatter (SSC)high/HLADR–/CD33lo/CD14–/lo/CD45+

monositler, FSCint/SSCint/ HLADR+/ CD33hi/CD14hi/CD45int to hi

Lenfositler, FSClo/SSClo/ HLA-DR– to +/CD33–/CD14–/CD45hi

eozonofiller, FSCint/ SSCvery high/HLA-DR–/CD33+/CD14–/CD45+

basophils, FSClo/SSClo/HLA-DR–/CD33+/CD14–/CD45+; ve dendritic hücreler, FSCint/SSClo to int/HLA-DRhi/CD33– veya +/CD14– veya +/CD45int to hi.

Ayrıca Patolojik örneklerde Blast hücreleri SSClo / CD45lo olarak tanımlanmaktadır ve nötrofillere benzer fenotipik özellikleri gösteren immatür granülositler ise daha yüksek FSC ve/veya CD33 ifadesi göstermektedir. ALY ler ise anormal yüksek FSC ve/veya HLA-DR ifadesi ile lenfositlere benzer olaylar olarak tespit edilmektedir(1).

Bu tez çalışmasında,

1. Öncelikle, Pentra DX Nexus hematoloji analizörü analitik performansının değerlendirilmesi,
2. İkinci olarak, kemik iliği numunelerinde immatür hücrelerin sayımında kullanılan flowsitometri ve Pentra DX Nexus hematoloji analizörün karşılaştırılması amaçlandı. Hasta bireylerden alınacak kemik iliği numunelerinde Büyük immatür hücreler, Atipik lenfositler, İmmatür lenfosit, İmmatür granülosit, İmmatür monosit yüzdeleri iki cihazda da ölçülecek ve sonuçlar karşılaştırılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 HÜCRESEL ANALİZ

İnsanoğlu var olduğu günden bu yana, bir takım şeyler hep merak konusu olmuştur onun için, insan vücudunun tanıma uğraşları hem de hastalıkların oluşumunu çözmede, bedenimizde dolaşan sıvının önemli bir rolü olduğu düşünülmüş ve dönemin bilim insanları tarafından kanın ne olduğu, nasıl oluştuğu ve vücudun gizemli yapısı bunlardan biridir. Farklı kültürlerde çeşitli gözlem yöntemleri, içgüdüsel yaklaşımlar ve o günün koşullarına uygun bazı girişimlerle, hastalıkların nedenleri anlaşılmaya çalışılmıştır. Kan, damarların içinde dolaşan, vücuttaki tüm hücrelere besin ve oksijen taşıyan, hücrelerde oluşan atık ve zehirli maddeleri alıp ilgili organlara taşıyan; ayrıca, bağışıklık, savunma, pıhtılaşma gibi birçok hayati fonksiyonu olan hayati bir sıvıdır. İnsanların kanla olan ilgisine baktığımız zaman bu ilginin tarihin başlarına kadar gittiğini biliyoruz.

2.1.1 Hücresel Analize Tarihsel Bakış

Antik çağda bile, yaşamın temeli olarak kabul edilen kan, insanın hayatta kalması için canlılık sağlayan gizemli özelliklere sahip olan tek bedensel sıvı olarak kabul ediliyordu. Kanın bu gizemi görünüşüne ve sayısına göre karakterize edilebildiği zaman, açığa çıkmış oldu. İlk olarak, kanın hücrelerinin görselleştirilmesini mümkün kılan ve kanın şekillendirilmiş elemanlarının fiziksel özelliklerinin ölçülmesine yönelik tekniklerin yanı sıra, bu bilginin elde edilmesinin elektronik yollarını mümkün kılan, mikroskopi alanındaki gelişmelerdir.

Biyomedikal bilimlerde görüntüleme tarihi, on yedinci yüzyılda mikroskobun icadıyla başladı(2). Mikroskopi alanına baktığımız zaman, Optik mikroskopun gelişimi, insan ve bitki hücrelerini ve ayrıca bakterileri görselleştirmeyi mümkün kılmıştır. En az 300 yıl önce Van Leeuwenhoek tarafından geliştirilen en basit mikroskop ile kanın kırmızı globüllerden oluştuğu gözlemlenmiş ve kan hücrelerinin büyüklüğü belirlenebilmiştir. Optik mikroskobunda ilerleyen gelişmeler, çarpıklıkları düzeltmek için birkaç mercek içeren objektif lensler de dâhil olmak üzere bileşik mikroskop ve geliştirilmiş optikler oluşturmak için bir mercek eklenmesi gibi sonraki iki asır boyunca devam etmiştir. 1870'lerin sonlarında Paul Ehrlich tarafından

boyaların uygulanması ile ilk kez farklı beyaz hücre tipleri arasındaki farklılaşmalar belirlenmiştir.

O zamana kadar, kan hücrelerinin sayısının birçok hastalıkta değiştiğine inanılıyordu ve bu nedenle bir kan sayımı yaparak hücre sayısının daha doğru bir şekilde ölçmenin önemli olduğu anlaşıldı. Kanın hacmi kalibre edilmiş bir preparat haznesi üzerine yerleştirildiği ve hücrelerin tek tek sayıldığı, bilinen hacim ve geometriden hesaplanan, toplam sayının kullanıldığı zahmetli yorucu manuel ölçümler yapıldı. Her ne kadar günümüzde basitliği nedeniyle hala pratikte kullanılıyor olsa da, hücrelerin el ile hesaplanması büyük hatalara eğilimli olması ve hem zaman alıcı zahmetli bir iştir. Kan hücrelerini saymak için otomatik yöntemler bir gereklilik haline gelmiştir ve mühendisler bu problemin çözümlerini bulmak için hematologlarla birlikte çalışmak zorunda kalmıştır. Sonraki yıllarda, ışık, empedans ölçümleri veya her ikisi kullanılarak akış tabanlı sitometreler geliştirilmiştir.

Bu cihazlar, eritrositler, lökositler ve trombositler ve çeşitli lökosit alt tiplerini ayırt edebilen kan öğelerini sıralamak ve tanımlamak için çok sayıda parametreler sağlamıştır. Buna ek olarak, kırmızı hücrelerin kendi büyüklükleri, şekilleri ve hemoglobinizasyon dereceleri ile ilgili niteliksel farklılıkların, belirli anemi tipleri ile ilişkili olduğu, Maxwell Wintrobe ile ortalama korpüsküler hacim, ortalama korpüsküler hemoglobin anlamına gelen bir dizi kırmızı hücre indeksi ve ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu araçları ile hemoglobin konsantrasyonu ve hematokrit ile eşzamanlı ve bağımsız olarak ölçüm kabiliyeti sağlanmış oldu. Bu gelişme, anemilerin mikrositik, normositer veya makrositik ve hipokromik, normositer ve hatta hemoglobinizasyon derecesine göre hiperkromik morfolojik sınıflandırılmasına izin vermiştir. Daha sonra kırmızı kan hücresi dağılımı genişliği olarak ifade edilen kırmızı hücre popülasyonlarının boyut dağılımının nicelleştirilmesi mümkün hale geldi ve böylece her bir morfolojik alt tipte homojen ve heterojen kategorilere daha fazla bir ayrımı mümkün kıldı(3).

Kan hücrelerinin sayımı, kan testi için ilk kantitatif yöntemlerden biriydi ve bir süredir klinik çalışmalarda en çok kullanılan test olmuştur. İlk ölçümler, bir slayt üzerinde dikkatli preparat hazırlayarak ve bir optik mikroskop yardımıyla, görselleştirme ve manuel sayıma dayanmaktaydı.

Daha sonraki teknikler, hücreleri teker teker numaralandırmak için empedans ölçümleri ya da ışık saçılma/floresans teknikleri ile birleşerek akış yöntemlerini içeren çalışmalardı. Mikroskopi tabanlı teknikler alanında çığır açan gelişmeler sonucunda görüntüleme ve görüntü işleme araçları olan otomatik hücre sayma araçları için yeni bir diriliş olmuştur.

Tablo 1. Kan Sayım Yöntemlerinde Otomasyona Öncülük Eden Temel Taşların Kısa Tarihçesi(3)

Keşif Yılı	Metot
Vierordt, 1852	Mikroskop
Oliver, 1896	Işık saçılım ve emiliminin göz ile ölçümü
Marcandier ve arkadaşları, 1928	Işık saçılım ve emiliminin foto dedektörlerle ölçümü
Coulter, 1953	Empedans ölçümü
Fulwyler, 1965	Empedans ölçümü ve elektrostatik hücre sınıflandırması
Dittrich & Göehde, 1968	Floresan tabanlı akış sitometrisi
George & Groner, 1973	Akış sitometrisinde ışık saçılması

Otomatik kan sayaçlarının prototipleri ilk olarak On dokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru geliştirildi ve yirminci yüzyıl boyunca hızlı ilerlemeler kaydedildi. Bu aletler, ya kan hücreleri tarafından dağıtılan ve emilen ışık ya da küçük, elektrik yüklü bir açıklıktan akan kan hücreleri tarafından indüklenen elektrik akımındaki değişiklikleri kullanarak ölçümler yaptı(3).

İnsanlığın varlığından bu yana, insanoğlu sürekli bilinmeyeni keşfetme arzusu ile teknolojik çalışmalarda hiç durmadan araştırma yapmıştır. Tarihten günümüze kadar yapılan bu çalışmalar günümüze ışık tutmuş ve bilim insanlarına sorunları çözmelerinde büyük katkıları olmuştur. Böylece, insanlığa faydalı olabilmek için birçok problem ve sorunlar araştırılmakta ve bunların çözümleri bulunmaya çalışılmaktadır. Buna paralel olarak gelişen bilim ve teknoloji sayesinde bilim insanlarını en kısa sürede, en doğru sonuca ulaşmalarını sağlamaya başlamıştır.

2.1.2 Otomatik Hücre Analizi İlkeleri

Vücudun içindeki tüm dokulardan bir örnek almak istersek en az cerrahi müdahale gerektireni dolaşımdaki kandan örnek almak diyebiliriz. Bu nedenle, kan sayımı basit bir damar yolu ile elde edilen bir biyopsi gibidir. Tam kan sayımı (CBC) bu nedenle en yaygın kullanılan klinik laboratuvar testlerinden biridir. Bir hastanın sağlık durumunun çeşitli modalitelerinin hızlı ve uygun maliyetli bir şekilde değerlendirilmesinin yanı sıra hastalığın olası varlığı için önemli ipuçları sağlar. Bir CBC, kanın hücresel bileşenleri hakkında bilgi sağlar: RBC(Red Blood Cell)'ler, WBC(White Blood Cell)'ler ve trombositler. CBC verileri sadece 3 temel hücre tipinin sayıları hakkında bilgi içermez, RBC'lerin hemoglobinizasyonu, boyutu, şekli ve derecesi ile morfolojik olarak tanımlanabilir, aynı zamanda WBC tipleri hakkında bilgi sağlar; buna da WBC diferansiyel denir(4).

CBC, klinisyenlere, bir hastanın sağlık durumu ve olası tipteki altta yatan hastalık ile ilgili önemli bilgiler sağlar; Bu veriler, klinik ve diğer laboratuvar verileriyle birlikte, bir hasta için ayırıcı tanının oluşturulmasında ve ayrıca bir hastalığın ilerlemesinin ve tedaviye yanıt vermesinin izlenmesi için genellikle kritik bilgiler sağlar. En temel düzeyde CBC, düşük RBC düzeyleri (anemi), yüksek RBC düzeyleri (eritrositoz), düşük WBC düzeyleri (lökopeni),yüksek WBC düzeyleri (lökositoz), düşük Trombosit düzeyleri (trombositopeni) ve yüksek Trombosit düzeyleri (trombositoz) hakkında bilgi verir.

Buna ek olarak, farklı lökosit tiplerinin düşük ve yüksek mutlak sayıları hakkındaki veriler, enfeksiyöz, enflamatuvar, neoplastik veya diğer altta yatan hastalığın muhtemel tipi ve nedenine ilişkin zengin bilgiler sağlar. Bu nedenle, kan hücresi sayısı, birçok hastalık için hastalığın önemli bir ilk göstergesi olabilir ve bu nedenle klinik teşhis, hasta sağlığında değişiklik için tarama yapılması hastalığın seyri ve tedavinin izlenmesi için önemli bir başlangıç noktasıdır. Örneğin, lökosit bağlı hastalıklarda, bildirilen lökosit sayısı ve lökosit diferansiyeli hematolojik maligniteler (lösemiler) için ve enfeksiyonların değerlendirilmesinde yardımcı olabilir. Temel olarak tek bir laboratuvar testinden gelen bu bilgi zenginliği göz önünde bulundurulduğunda, ölçüm, kayıt, raporlama ve iş hacminin hızlılığı ile ilgili teknik yetenekler elde edildikten sonra CBC'nin otomasyonuna geçişi kaçınılmazdır. Ayrıca, bu saydam aşamaların otomatik kan sayımının çeşitli bileşenlerinde devam

eden iyileştirmeler, bir CBC'den elde edilen bilgilerin kalitesi ve niceliğinde ilerici ilerlemelere yol açmıştır. Modern kan sayım cihazları, kanın hücresel bileşenlerinin sayısının, boyutlarının ve özelliklerinin niceliksel ölçümleri ile geleneksel mikroskopi yoluyla elde edilen niteliksel bilgileri yakın bir şekilde simüle edebilir ve dolaşımdaki dokunun durumu hakkında bir bileşik çok parametrelili değerlendirme sağlar.

Son yarım yüzyılda hematoloji alanında yapılan ilerlemeleri tam olarak değerlendirmek için, önce tam kan sayımının (CBC) otomatik analizörün devreye girmeden önce nasıl yapıldığına bakmamızda faydalı olacağını düşünüyorum. 1960'ların başlarına kadar, hematolojik değerlendirmeler (kan sayımı) el ile yapıldı. Metodlar, testlerin yapan teknoloji uzmanından hatırı sayılır bir beceri seviyesine ihtiyaç duyuyordu ve bunlar santrifüjleme, spektrofotometri, Thoma sayım lamı ve boyalı periferik boyama preparatları gibi yoğun iş gücü gerektiren testlerdendi. Bu hantal yöntemler kullanılarak klasik kırmızı hücre indeksleri, beyaz hücre sayımları / farklılıkları ve trombosit sayıları, spesifik morfolojik yorumlarla birlikte spesifik tanıları düşündürdü. 1953'teki ilk tanıtımından bu yana, otomatik elektronik hücre sayacı, hücre sayımının ve diferansiyellerinin gerçekleştirilme şeklini değiştirdi. CBC'deki tüm testlerin gerçekleştirilmesi için harcanan çaba önemli ölçüde azaldı, şimdi sadece birkaç saniyede ve bazı yüksek otomasyonlu laboratuvarlarda, bir teknoloji uzmanı tarafından kan tüpüne dokunulmadan gerçekleştiriliyor. Birçok anormal beyaz hücrenin varlığı şimdi bir dizi yazılım odaklı cihaz belirteçleri ile tespit edilip gösterilebilir ve kırmızı hücre / retikülosit indeksleri genellikle aneminin nedenini teşhis etmek için yeterlidir. 1970'li yılların başlarında laboratuvarlarda ilk lökosit farklılıklarını gösteren cihaz Technicon Instruments Corp., Ltd. tarafından tanıtıldı. Cihaz, peroksidaz sitokimyasını çeşitli lökosit türleri arasında farklılaştırma aracı olarak kullandı. 1980'ler ve 1990'ların başlarında, birçok cihaz üreticisinin geliştirdiği ilerlemeler, otomatikleştirilmiş beş parçalı diferansiyelleri çoğu analizörün rutin bir özelliği haline getirdi(5).

Günümüzde hematoloji laboratuvarına sunulan cihazların kapsamı ve çeşitliliği şaşırtıcıdır. Elektronik, akışkanlar, bilgisayarlaşma, minyatür ve lazer teknolojisindeki ilerlemeler, üreticilere CBC yapma görevine yaklaşmak için çok çeşitli metotlar sağlamıştır. Bununla birlikte, bir veya daha fazla üretici tarafından

kullanılan bir dizi temel ölçüm ilkeleri ve teknikleri vardır; bunlar, bu analizörlerin işletilmesinden sorumlu olan teknoloji uzmanları ve sonuçları klinik ayırıcı tanıda yorumlayan hekimler/bilim adamları tarafından açıkça anlaşılması gerekir. Bu analizörlerin tümü temel olarak aynı son noktaya ulaşmak için temel tespit prensiplerinin bazı kombinasyonlarını kullanır: Otomatik tam kan sayımı veya CBC hali hazırda ilişkilendirilebilecek analizör(ler) den bağımsız olarak, ortak temel sayma prensipleri aşağıdakileri içerir:

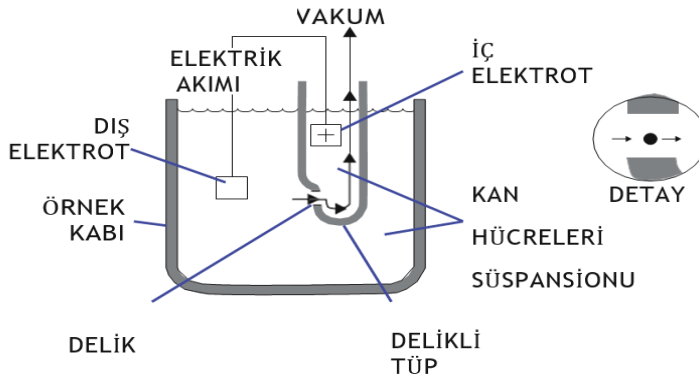
- i) Elektrik empedansı veya Coulter prensibi
- ii) Tipik olarak bir lazer ışık kaynağı ile optik ışık saçılımı
- iii) Tipik olarak retikülositleri, trombositleri, çekirdekli kırmızı hücreleri ve farklı lökosit sayımı için kullanılan floresan(5).

Daha önceki cihazlarda yer alan teknolojilerin birçoğu bugün hala kullanılıyor. Bu klasik yöntemlere göre, yeni üretilen cihazlara da floresan prensibi eklenmiştir ve hematolenfoid malignite modern analizinde multiparameter akış sitometride tam olarak kullanılmaktadır. Temel olarak, çoğu cihaz kan hücrelerini ölçmek için iki veya daha fazla yöntem kullanır.

Empedans teknikleri, elektron sensörleri tarafından izlenen küçük deliklerden kan hücrelerinin geçişinin yol açtığı iletkenliğin anlık azalmasını kaydeder. Buna genel olarak Coulter prensibi denir(6). Tungsten halojen ve helyum-neon kırmızı lazer ışık kaynakları da beyaz hücreleri ve kırmızı hücreleri analiz etmek için kullanılır. Peroksidaz histokimyası ve tiazol turuncu flüoresan beyaz hücre popülasyonlarını kendi içinde gruplara bölme yöntemleri sağlar(7,8). Radyofrekans, beyaz hücrelerin iç fiziksel ve kimyasal bileşimini belirlemek için yüksek frekanslı akımın iletkenliğini kullanır. Lazer ışığını kullanan ve birçok cihazın bir özelliği olan akış teknolojisi, düşük açılı (tipik olarak 120° 'den daha az) ışık dağılımı ve hücre boyutunun yüksek açıyla (160-200°) ileri saçılımın ölçülmesiyle sitoplazmik içeriklerin ve nükleer karmaşıklığın ölçülmesi için kullanılır. Bu lazer teknolojisi, kendi kendini yenileyen kök hücreleri, lenfosit alt kümelerini, retikülositleri, trombositleri ve çekirdekli kırmızı hücreleri nicelleştirmek için floresan boyalarla veya etiketli antikörlerle daha da güçlendirilebilir(5).

2.1.3 Empedans Prensibi

Hücreleri saymak ve boyutlandırmak için Coulter Prensibi olarak da bilinen empedans ilkesi, bir elektrolit çözeltisinde süspansiyon haline getirilen iletken olmayan kan hücreleri tarafından üretilen elektriksel direncin ölçülebilir değişikliklerine dayanmaktadır(9). Hematoloji ölçüm prensipleri ve metotları ile ilgili hiçbir tartışma, Wallace Coulter tarafından 1948 volumetrik Empedans ilkesinin keşfi ile yaptığı dönüm noktası katkısını gözden geçirilmeden tamamlanamaz. Onun keşfi, zaman alıcı manuel kan hücresi sayımlarının yerini alacak ilk hematoloji cihazının kullanılmasına yol açtı. Birçok güncel analizör hala bu prensibi bir şekilde veya başka bir biçimde kullanır. İzotonik bir sıvıda seyreltilmiş kan hücreleri kabın içine daldırılmış ikinci bölüme bir delikten vakumla çekilmektedir. Hücreler delikten geçişleri sırasında yalıtkan olduklarından iki tarafta bulunan elektrotlar arasında voltaj değişiklikleri meydana gelir. Osiloskopla ölçülen voltaj değişiklikleri, hücrelerin büyüklüğü ve sayıları hakkında bilgi verir. Bu bilgiler trombosit ve lökosit histogramlarında gösterilir. İmpedansla lökosit sayımı, eritrositlerin iyonik olmayan deterjanla parçalandığı ayrı bir kanalda yapılır. Lökosit sayımının yapıldığı süspansiyonda fotometreyle HGB de ölçülür. Sayım sonucunda elde edilen verilerden histogram grafikleri oluşturulur(5,10).



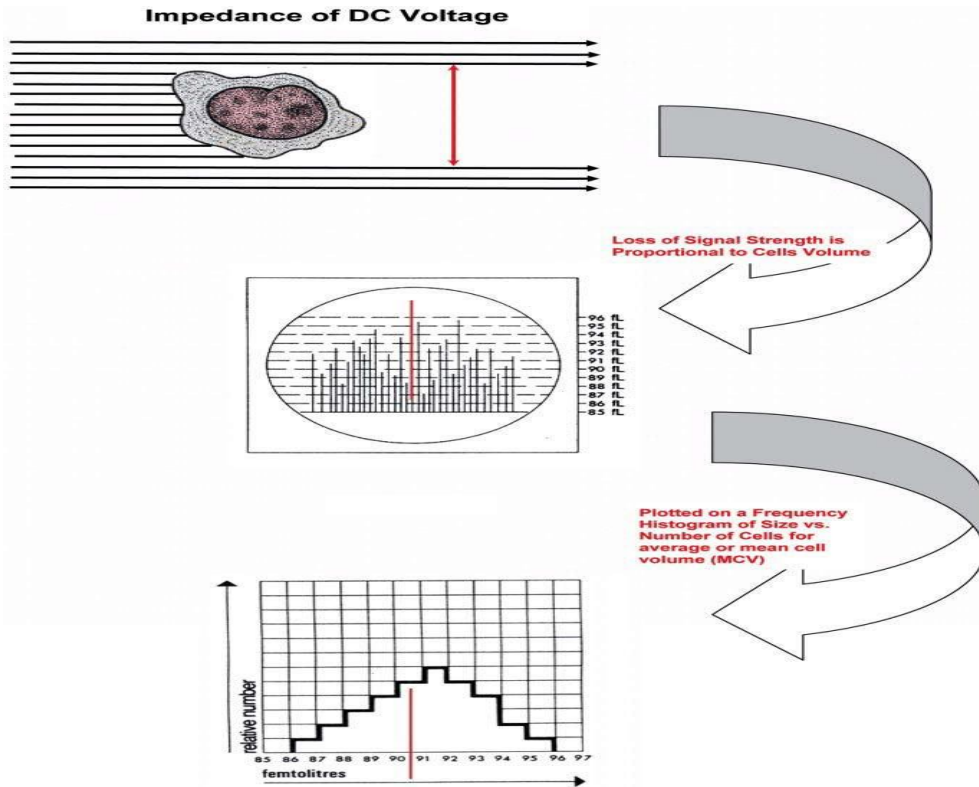
Şekil 1. Empedans veya Coulter Prensibi(5)

Elektrotlar arasındaki küçük bir açıklık (diyafram), askıya alınmış hücrelerin geçtiği algılama bölgesidir (bkz. Şekil 1). Algılama bölgesinde her hücre kendi elektrolit hacmini değiştirir. Her bir hücre tarafından yer değiştirilen hacim bir voltaj atımı olarak ölçülür; Her bir pulsun yüksekliği, hücrenin hacmiyle doğru orantılıdır.

Bu değişiklikler, histogram üzerinde çizildikten sonra mevcut hücrelerin sayısının yanı sıra hacimlerinin ölçüsü mümkün hale gelir. (bkz. Şekil 2)(5,10).

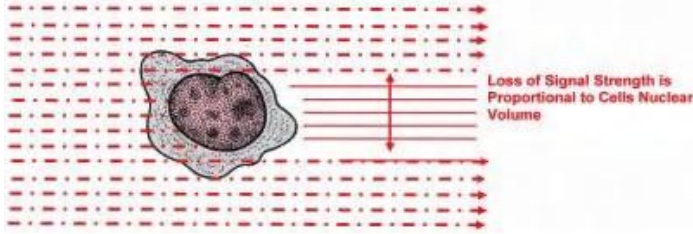
2.1.4 Radyofrekansı

Empedans prensibi bir hücrenin toplam hacmini ölçmek için düşük voltajlı DC akımı kullanırken, radyofrekans yöntemi ise bir hücrenin çekirdeğini ölçmek için yüksek voltajlı elektromanyetik akım (AC) kullanır. Radyofrekans aralığındaki alternatif akım, hücrenin zarının bipolar lipid tabakasını kısa devre ederek enerjinin hücrenin içine girmesine izin verir. Bu, kimyasal ve fiziksel kompanzasyon ve nükleer hacim de dahil olmak üzere hücresel boyut ve iç yapıya orantılı bilgi toplanmasını sağlar. (bkz. Şekil 3)(5,8).



Şekil 2. Empedans Sinyalinin Ortalama Hücre Hacminin (MCV) Ölçümüne Dönüştürülmesi(5)

AC Voltage



Şekil 3. Radyofrekans Sinyali En Çok Nükleer Boyuta Duyarlıdır.

2.15 Optik Işık Ölçümleri

Optik Absorbans: Absorbans yöntemi en sık lökositleri çeşitli hücre tipleri arasından ayırt etmek için kullanan bir sitokimyasal reaksiyona dayanmaktadır. Hücreler peroksidaz enzimi için substratın eklenmesinden sonra analiz edilir. Bir tungsten ışık kaynağından beyaz ışığın emilmesi, peroksidaz reaksiyonunun yoğunluğu ile orantılı olan bir ölçektir: nötrofiller, monositler ve eozinofiller, peroksidaz pozitifdir, bu yüzden mevcut olan peroksidaz boyası ile orantılı olarak ışığı absorbe ederken, lenfositler ve bazofiller peroksidaz negatiftir. Buna ek olarak büyük oranda boyanmamış hücre popülasyonundan aktifleşmiş lenfositler, plazma hücreleri, silli hücreler, prekürsör B lenfositleri (hematogonlar) veya peroksidaz negatif blastları içerebilen heterojen bir popülasyon tanımlanabilir. Tipik olarak, yüksek açılı ışık saçılımı (nükleer konfigürasyon ve sitoplazmik maddeler), büyük lökosit ve kırmızı hücre popülasyonlarını tanımlamak için düşük açılı ışık saçılımına (hücre boyutu) karşı çizilir.

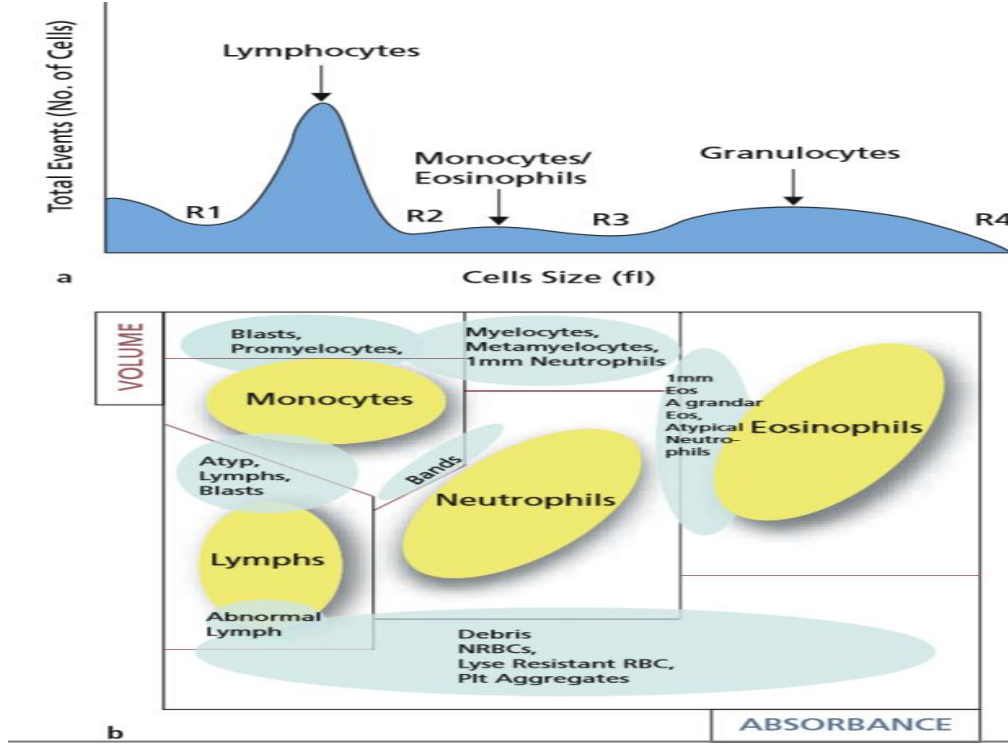
Optik ışık dağılımı: Beyaz kan hücrelerini, kırmızı kan hücrelerini ve trombositleri tanımlamak ve saymak için bir yöntem olarak kullanılabilir. Optik saçılma yöntemleri, hem bir kan hücresi sayacı hem de birçok parametrelili akış sitometresinde kullanılan aynı temel prensiplerini kullanır. Hücre sayımı ve floresans ölçümleri, test hücrelerini içeren hidrodinamik olarak odaklanmış bir akış, bir lazer ışığı ile kesişen bir akış hücresinden geçirildiğinde yapılır. Her bir hücre, hücrenin algılama bölgesinden geçerken, lazer ışığı eşzamanlı olarak kesilir ve saçılır, daha

sonra herhangi bir endojen veya reaktif-bağımlı floresan moleküllerini uyarır. Lazer ışını tarafından sadece küçük bir derece (açı) saçılan ışık, ileri saçılım(forward scatter) olarak adlandırılır, hücre boyutunu gösterir. Lazer ışınının ortogonal yönünde olan, yan saçılım(side scatter) olarak adlandırılan saçılan ışık, nükleer lobulasyon ve sitoplazmik granüller olmak üzere en çok yüzey ve içyapılar tarafından etkilenir. Hücresel otofloresans da bilgilendirici olabilir; Eozinofiller tipik olarak nötrofillerden 5 ila 10 kat daha yüksek otofloresans sergiler. Veri analizi rutinleri en iyi şekilde modelleme kabiliyetleri kullanılarak yapılır, subjektif kılavuzlama veya bölge ayarı, cihaz sistemlerinin hücre sayma algoritmalarında gereksiz bir belirsizlik kaynağı sağlar(11,12).

Floresan: Floresan boyalar, analizöre girmeden önce hücrelere eklendiğinde, belirli hücre membranını ve hücre içi yapıları boyayan maddelerdir. Bu hücreler algılama bölgesinden geçtikçe, flürokromun özelliklerine göre değişen farklı dalga boylarında floresan ışık yayarlar. Fotodetektörler, farklı dalga boyu aralıklarındaki bu ışığı (mavi, yeşil, turuncu ve kırmızı dâhil) toplar ve ölçerler ve belirli optik filtreler kullanılarak farklı dalga boylarına dağıtır. Hücreler daha sonra, genellikle liste modu dosyası olarak adlandırılan, hücre bazında yapılan tüm ölçümleri içeren veri dosyasının yazılım analizi tarafından yana saçılım ve flüoresansın yoğunluk özelliklerine göre kategorize edilir. Bu parametreler hücre popülasyonlarının sayısı, türü, moleküler ekspresyonu ve aktivasyon ve olgunluk seviyeleri hakkında ek bilgi sağlar(5,10).

Veri Sunumu (formatları): Üretilen cihazların çoğu, grafiklerle veya belirteçsiz olarak iki tip veri grafik ekranı oluştururlar ve buda dâhili laboratuvarın incelemesi ve klinisyenlere raporlama için bir dizi sayısal veriler sunar. Grafik görüntüleri: kırmızı hücre, beyaz hücre ve trombositlerin göreceli sayısının hücre boyutuna göre çizildiği histogramlar ve beyaz hücre alt popülasyonlarının görüntülediği dağılım grafikleri olmak üzere iki temel forma sahiptir.

Histogramlar: Histogramlar, göreceli hücre frekansına karşı boyutu gösterir. Eritrosit, lökosit ve trombosit frekansı hakkında bilgi sağlarlar. Ayrıca alt popülasyonların varlığını da gösterebilirler ve histogramlar bir hastanın hücresinin göreceli sayısını ve büyüklüğünü normal bir popülasyonunkiyle karşılaştırmak için bir olanak sağlar.



Şekil 4. Tek ve Çift Parametrelili Histogramlarda Tipik Kan Hücresi Konumları.(a) Tek Parametrelili Veya Tek Değişkenli Grafikler.(b) Dağılımlı veya İki Değişkenli Grafikler(5).

Hemoglobinometri: Kan hücresi sayacıları tarafından bildirilen diğer önemli parametre, hemoglobin seviyelerinin ölçülmesidir; Bu, aneminin belirlenmesi için en bilgilendirici ölçümdür. Hemoglobinometri dört temel metodolojiden biri kullanılarak gerçekleştirilebilir: gazometrik, gravimetrik, kimyasal veya siyanemoglobin. Hematoloji Uluslararası Standardizasyon Konseyi (ICSH) tarafından sağlanan hemoglobin ölçümlerinde değişkenliği azaltan dramatik bir etki gösteren hemiglobinsiyanid standardı vardır. Materyal, hemiglobinsiyanide dönüştürülerek halihazırda stabilize edilmiş seyreltilmiş hemoglobinin viallerinde sunulmaktadır. Materyal, bir spektrofotometrenin kalibrasyonunda kullanılmak üzere uygun referans preparatı olmasına rağmen, doğrudan bir hematoloji analizörü üzerinde kullanılmasına izin vermez. Bunun nedeni, malzemenin önceden ayarlanmış ve stabil bir kromojene önceden dönüştürülmüş olmasıdır. Bu nedenle, standart, en iyi şekilde, otomatik analizör sonuçlarının karşılaştırılabileceği ve ikincil kalibratörlere hangi stabilize kanın yapılabileceği ile ilgili birincil referans olarak kullanılır.

2.2 FLOW SİTOMETRİ İLKELERİ VE VERİ ANALİZİ

Tarihsel olarak, ilk geliştirilen akış sitometrisi, sadece hücrelerin boyutunu tespit eden bir singleparametre cihazıydı. Şu anda, son derece sofistike araçlar, aynı anda 14 parametrenin tespit edilebilmesi ile gelişmiştir(13). Sitometri, hücrelerin veya biyolojik yapıların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ölçülmesidir. “Flow Sitometri” ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Günümüzde “flow” sitometri ya da akış sitometri terimleri kullanılmakta ve hematoloji, immünoloji ve klinik uygulamalarda laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Flow sitometri tekniği ışık mikroskopi ile kıyaslanınca çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede inceleme fırsatı vermesiyle avantaj sağlamaktadır. Flow sitometrik teknik ile 1 saniyede 500 hücre sayabilir ve ortalama 10 000 hücreyi 20 saniyede analiz edilebilir(14).

Flow sitometri (Akım Sitometri); bilgisayar teknolojisi, elektronik, florokrom kimyası, monoklonal antikor, optik ve laser teknolojisinin birleştirilerek; hücrelerin veya biyolojik partiküllerin birçok fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini, tek hücre seviyesinde araştırma imkânı sağlayan bir cihazdır. Akım sitometri tarihi 60 yıl öncesine dayanır. İlk olarak kan hücrelerinin sayımı Moldaven tarafından geliştirilen bir fotoelektrik alıcı ile başlar. Daha sonra 1949’da Coulter tarafından bir hücre sayıcı geliştirilmiş ve volüm analizörü bulunmuştur. 1965’de Katmenschky tarafından çoklu parametrelili analizler yapılmaya başlanmıştır. Akım sitometri cihazları 1970’lerde araştırma amacıyla kullanılırken, 1980’lerden sonra klinikte kullanılmaya başlanmıştır. 2003 yılında yüksek hızlı hücre ayırıcıları dijital teknolojiler kullanılarak geliştirilmiştir. Günümüzde monoklonal antikor teknolojisinin de gelişmesi ile birden fazla parametreleri hücre yüzeyinde analiz edebilen sofistike akım sitometri cihazları geliştirilmiş ve klinik kullanımın hizmetine sunulmuştur.

2.2.1. Flow Sitometri Cihazının Bileşenleri

Flow sitometre cihazı başlıca akış (sıvı) sistemi (fluidik sistem), ışık kaynağı (lazer), filtreler ve sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programları ve ayırma mekanizması (cell sorting) bileşenlerinden oluşmaktadır(14,15,16). Flow sitometri, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve

bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılması esasına dayanan bir teknik cihazdır. Bu cihaz ile hücrenin yüzey ve iç proteinleri, organelleri ve diğer bileşenleri analiz ve ayrımı, lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve floresans emisyonu esasına göre gerçekleştirilmektedir(17).

2.2.1.1 Akıcı Sıvı Sistemi (Fluidik Sistem):

Akım sitometrenin en önemli bölümüdür ve hazırlanan örneklerin analiz edilmesi için hücrelerin emilerek akışını sağlayan sistemdir. Akım hızını örnek basıncı ile sheath sıvı basıncı arasındaki fark belirler. Örnek basıncı her zaman sheath sıvı basıncından yüksektir. Örnek basıncı artırıldığında, örnek akımı da akımın genişliği de artar. Örnek akımının artırılmasına bağlı olarak, birim zamanda analiz edilen hücre sayısı ve buna paralel olarak örneğin geçtiği sıvı akımının genişliği de artar. Flow sitometri cihazlarında Işık kaynağı olarak ksenon ve ksenon civa lambalar kullanılabilirse de sıklıkla farklı tip lazerlere ek olarak argon ve helyum da lazer kaynağı olarak kullanılır.

2.2.1.2.Lazer:

Lazer monokromatik ışık kaynaklarıdır. Akım sitometri cihazlarında en sık kullanılan lazer ışık kaynağı argon ion lazerlerdir. Argon ion lazerinen önemli avantajı 488 nm dalga boyunda ışın yayması ve bu ışının birçok florokrom tarafından absorbe edilebilmesidir. Günümüzde tek lazerli akım sitometre yerlerini, iki veya daha fazla lazeri aynı anda kullanan akım sitometri cihazlarına bırakmışlardır.

Lazer ışını ‘sample core’ adı verilen örnek sıvı akımının merkezine odaklanır ve sabit kalır, lazer ışını ile sample core arasında ışını odaklayan bir lens daha bulunmaktadır(18).

Lazer Işık Kaynakları	Dalga Boyu
• Argon ion	488nm
• Krypton ion	568nm
• Kırmızı / Helium Neon	633nm
• Yeşil / Helium Neon	543nm
• Violet diode	408nm
• Kırmızı diode	635nm

2.2.1.3 Florokrom:

Belirli dalga boyundaki lazer ışını absorbe ederek daha büyük dalga boyunda ışın saçan maddelere florokrom, enerjinin bu değişimine ise floresans denilmektedir. Aynı dalga boyundaki lazer ışığını absorbe eden farklı florokromlar, birbirinden farklı dalga boylarında ışın saçarlar. Absorbe edilen lazer ışığının dalga boylarına ‘absorbsiyon spektrumu’ florokromlar tarafından saçılan ışınların dalga boylarına ise ‘emisyon spektrumu’ denir(19).

Tablo 2. Florokrom Tablosu(19)

Florokrom	Eksitasyon (nm)	Emisyon(nm)
Alexa Fluor 488	495	520
Alexa Fluor 647	650	668
Alexa Fluor 700	696	719
AMCA (Ammo Methylcoumarin Acetic Acid)	354	448
APC (Allophycocyanin)	650	660
APC-Alexa Flour 700	650	719
APC-Alexa Flour 750	650	780
CY*5 (Cyanin 5)	580	670
CY5.5 (Cyanin 5.5)	630	694
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole)	370	455
ECD (Phycoerythrin-Texas Red)	480	620
FITC (Fluorescein Isothiocyanate)	495	520
FLMA (Fluorescein 5-Maleimide)	495	520
PC5 (Phycoerythrin Cyanin 5)	480	670
PC5.5 (Phycoerythrin Cyanin 5.5)	480	694
PC7 (Phycoerythrin Cyanin 7)	480	767
Pacific Blue	405	455
PE (Phycoerythrin)	480	575
PE/CY5 (Phycoerythrin Cyanin 5)	480	670
PE/CY5.5 (Phycoerythrin Cyanin 5.5)	480	694
PE/CY7 (Phycoerythrin Cyanin 7)	480	767
PI (Propidium Iodide)	540	620
RDI (Phycoerythrin)	480	575
Rho 110 (Rhodamine 110)	496	525
SPRD (Spectral Red)	480	670
TRITCH (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate)	555	580
TXRD (Texas Red X)	575	620
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	550	660

2.2.1.4 Flow Sitometri Cihazında Bulunan Detektör ve Filtreler

Hücrelerden gelen ışık saçılımı ve floresans emisyonu filtre ve detektörlere dijital sinyallere dönüşür. Flow sitometride her bir detektör ve filtre farklı veriler sağlarlar.

2.2.1.5 Forward Scatter Chanel (FSC) Detektör (İleri Saçılım Kanalı) :

Akım Sitometri cihazından hücreler geçerken lazer ışığının çarması ile oluşan görüntüden hücrenin boyu ve çap büyüklüğü hakkında bize bilgi veren kanaldır. Geniş çaplı hücrelerde yüksek FSC değeri varken, küçük çaplı hücrelerde daha az FSC değeri oluşur.

2.2.1.6 Side Scatter Chanel (SSC) Detektör (Yana Saçılım Kanalı) :

Yan dağılım/saçılım (SSC), ışık yolu 90 derecelik bir açı ile hücreyi aydınlatan ve sonra yansıyan lazer ışığı ile hücrenin içyapısı ve granüler içerikleri hakkında bilgi elde ettiğimiz kanaldır. Bu özellik ile hücreleri gruplama ve tanımlamada kolaylık sağlanır(20).

2.2.1.7. Floresan Filtreler ve Detektörler:

Antikorlara bağlayarak antijeni göstermek için kullanılan floresan özellikli maddelere florokrom veya flüorofor maddeler (floresan antikor) denir. Işık saçılması veya flüoresans emisyonu (eğer parçacık bir flüorokrom ile etiketlenmişse), renkli saçılımlar yaptıkları için parçacıkların özellikleri hakkında bilgi almamız kolay olur. Argon iyon lazeri genel olarak akış sitometrisinde kullanılır, çünkü yaydığı 488-nm ışık birden fazla florokromu uyarır. Bir flüoresan bileşiğinin uyarılabildiği aralık, absorpsiyon spektrumu olarak adlandırılır. Absorpsiyon geçişlerinde floresan geçişlerinde yayılandan daha fazla enerji tüketildiği için, yayılan dalga boyları emilenlerden daha uzun olacaktır. Belirli bir bileşik için yayılan dalga boyu aralığı, emisyon spektrumudur.

Flow sitometride florokrom boya yani florokrom maddelerin kullanılmasının amacı; direkt olarak hedefimizin tespiti ile biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin kolayca saptanmasıdır. Değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokromla

işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküler hakkında bilgi verir(21,22).

Tarihte ilk "flow" sitometri cihazı Wallace H. Coulter tarafından High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer başlığıyla 1956 yılında yayınlanmıştır(14,23). Len Herzerberg ve ark. , 1974'de Standford Üniversitesinde Fluorescence Activated Cell Sorter = hücre ayrışması ismiyle "flow" sitometride önemli bir yenilik getirmişlerdir(24,25). Elektrostatik FACS hücre ayrışması "flow" sitometrik analizde ölçülen özelliklerine göre hücrelerin ayrılması işlemine floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması (fluorescence activated cell sorting, FACS) denir. Bu akış esnasında sıvılara elektrik yüklenip çıkışta elektromanyetik alan yaratılarak hücrelerin birbirinden ayrılması sağlanır. FACS'ta yapılan şey şu; eklediğimiz floresan boyanın tespit edildiği her hücre çıkışa geldiğinde yüklenir ve manyetik alan sayesinde diğer hücrelerden ayıklanarak farklı bir biriktirme tübüne alır. Bunu birçok alanda kullanabiliriz. Bu özellik her "flow" sitometri modelinde bulunmamakta daha çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu cihazlar, kan gibi karışık bir hücre topluluğunun içeren süspansiyonlarda istediğimiz özelliğe sahip hücre alt gruplarının farklı tüplere ayrılabilmesini sağlar. Aynı anda 4 farklı hücre popülasyonu ayrıştırılabilir(26,27).

2.2.1.8 Optik Filtreler:

Optik filtreler; belirli dalga boyunun altındaki veya üstündeki ışınların geçmesine izin veren ya da engelleyen filtrelerdir. En sık kullanılan optik filtreler; 'dichroic ve band pass' filtrelerdir.

Dikroic filtre (Dichroic mirror, beam splitters): Kısa dalga boyundaki ışınları uygun detektörlere yönlendiren, daha uzun dalga boyundaki ışınların geçmesine izin veren filtrelerdir.

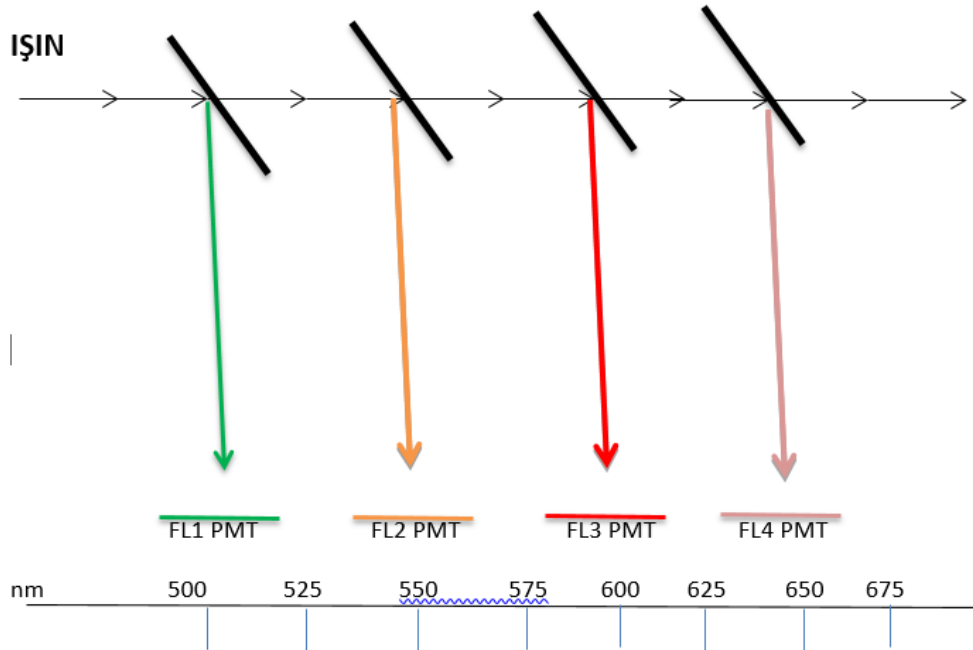
Band pass filtre: Spesifik dalga boyundaki ışınların geçmesine izin veren filtrelerdir; 'long pass filtre (LP), short pass filtre (SP) ve band pass (BP) filtre' olmak üzere 3 tiptir(28).

Örneğin LP 500 filtre; 500nm dalga boyundan daha büyük ışınların geçmesine izin verirken, SP 500 filtre; 500nm dalga boyundan daha küçük ışınların geçmesine izin verir. BP filtreler ilk iki filtreden farklı olarak belirli aralıklardaki dalga boyundaki

ışınların geçmesine izin verir. Örneğin BP 530/30; bu filtre 515nm ile 545nm dalga boyları arasındaki ışınların geçmesine izin vermektedir.

2.2.1.9 Fotomultiplier (Photomultiplier, PMT) Detektörler:

Lazer ışının hücreye çarpmasıyla birlikte düşük açılı ($0,5-10^0$) uzun eksen boyunca saçılan ışınlar (FS hücre büyüklüğünü gösterir), 90^0 açılı ile saçılan ışınlar (SS hücre granülaritesini gösterir) ve hücre yüzeyinde monoklonal antikora bağlı florokromların saçtığı ışınlar ortaya çıkmakta ve bu ışınlar PMT dedektörlerince (FS, SS, FL1, FL2, FL3, FL4) saptanmaktadır(29). Bu elektriksel sinyaller dijital sinyallere çevrilerek bilgisayara aktarılmaktadır.



Şekil 5. Lazer Işınının PMT Sinyallerine Çevrilmesi

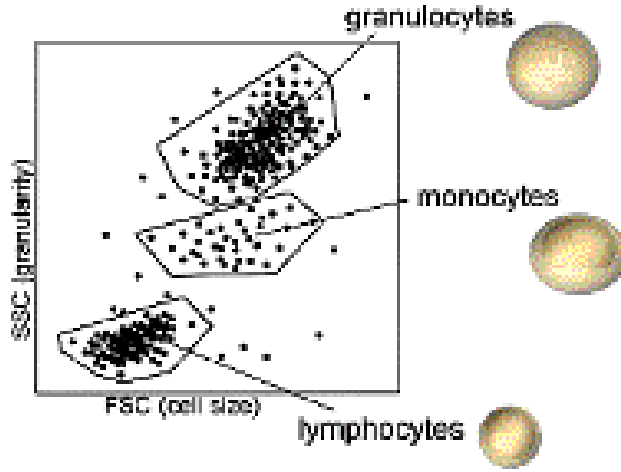
2.2.2.0. Flow Sitometrik Analizde Kullanılan Örnekler

Flow sitometrik analiz hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelere monoklonal antikor eklenmesi, cihazın kalibrasyonu, kontrol ve örneklerin cihazda çalışılması, veri analizi ve veri yorumu ve raporu aşamalarından oluşur. Flow Sitometri analizi için hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, asit sıvısı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir(21,30,31). Tam kan örneğinden ön işlemler ile manuel ya da otomatik

cihazlar ile çalışılması arzu edilen hücre süspansiyonu (eritrosit, lökosit ve trombosit) hazırlanabilmektedir.

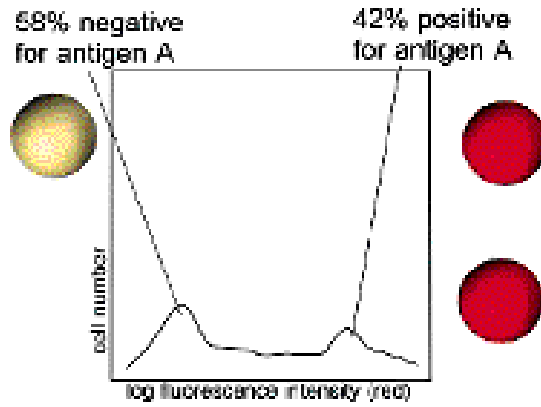
2.2.2 Flow Sitometride Analiz Yöntemleri

Flow sitometre cihazında analiz ettiğimiz veriler; hücrenin büyüklüğü, hücrenin içyapısı (granülaritesi) ve hücrede incelemek istenen antijene ait işaretlenen monoklonal antikorların floresans ölçümleridir. Genelde flow sitometri yöntemi ile laboratuvarlarda lökositler üzerinde incelemeler yapılmaktadır. Lökosit ayırımı ise hücrenin büyüklüğü ve hücrenin granül yapısına göre yapılmaktadır.



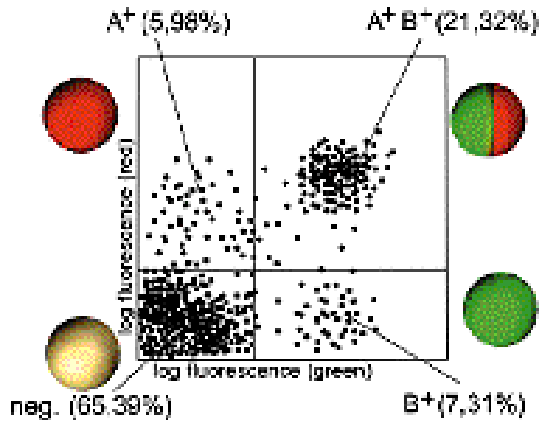
Şekil 6. FSC ve SSC Detektörlerinde Elde Edilen Verilerle Lökositlerin Hücre Büyüklüğü Ve Granülariteleriyle Ayrılması(14).

Tek floresan boya ile işaretli antikorun kullanılmasıyla hücre yüzey belirteçlerinin saptanması. Ör: Tüm lökositler içinde CD3+T lenfosit hücre sayı ve oranının saptanması. A antijenine karşı floresan işaretli hücreler ve bu antijeni içermeyen işaretlenmemiş hücrelerin sayı dağılımı “flow” sitometrik analiz sonrası aşağıdaki şekildeki gibi görünür:



Şekil 7. Tek Floresan Boya İle İşaretli Antikoru Kullanılmasıyla Hücre Yüzey Belirteçlerinin Saptanması(14).

Birden fazla yüzey antijenlerini aynı anda analizi sağlayan floresan işaretli antikolarla hücre popülasyonunun analizi ör: Birden fazla CD belirteçlerinin analizi sayesinde hücre alt gruplarının analizi, T supresör hücre, B hücre, NK hücre, T helper hücrelerin sayılarının ve oranlarının saptanması gibi analizler yapılmaktadır.



Şekil 8. İki Farklı Floresan Antikor İle Elde Edilen Grafik İle Hücre Ayrımı Ve Kantitatif Yüzde Analizi (14).

Florokromlar esasen belirli bir dalga boyunda ışık enerjisini (örneğin bir lazerden) alan ve daha uzun bir dalga boyunda yeniden yayan boyalardır. Bu iki işleme uyarma ve emisyon denir. Emisyon süreci, genellikle nanosaniye sıralarında son derece hızlı bir şekilde izlenir ve floresan olarak bilinir. Hücre içi antijenler için de florokrom boyalar kullanılmaktadır. Florokromların hücre içine nüfuz etmesi güç olduğundan hücre içi antijenlerin yüzeyel antijenlere göre tespiti güçtür. Bundan dolayı florokrom boyalardan önce hücre zarı geçirgenliği çeşitli ön işlemlerden

sonra artırılır. Çok renkli florokromlar ile farklı hücre gruplarının tespiti ve ölçümü, immunofenotiplendirme, intraselüler organellerin tespiti, hücre yüzey antijenlerinin saptanması, hücre ayrıştırması, nükleik asit miktarını saptanması, enzim aktivitesinin ölçümü, apoptozis incelemeleri yapılabilmektedir(14,32,33).

2.2.3 Flow Sitometri Verilerinin Değerlendirilmesi

Sayısal değerler olarak elde ettiğimiz verilerin bilgisayar sistemlerine kaydedilerek grafiksel olarak görüntülenmesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi işlemine veri analizi denir. Elde edilen veriler farklı grafikler kullanılarak gösterilebilir. Bu grafik çeşitleri nokta alan grafikleri, kontur alan grafikleri, histogram, 3 boyutlu grafik, bölgeler, kapılar ve istatistik olarak sınıflandırılabilir(14).

Nokta alan grafiği: Nokta grafiği, her noktanın bir hücreyi / parçacığı temsil ettiği iki parametreyi görüntülemek için kullanılır. Nokta alan (dot-blot) ve histogram en çok kullanılan grafiklerdir. Nokta alan grafiğinde her bir nokta tek bir hücreyi göstermektedir(35).

Kontur diyagramı: Dansite haritasına benzer. Benzer sayıdaki hücreleri gösteren noktaların çizgisel olarak birleştirilmesiyle oluşur.

Tek parametrelili histogram: y-ekseni; hücre sayısını, x-ekseni: analizi yapılan tek parametrenin floresans şiddetini gösterir. Histogramların istatistiksel verileri otomatik olarak cihaz yazılımlarıyla hesaplanır.

Bölgeler: Histogram ve nokta alanlar içinde, popülasyon alt gruplarının istatistiğini yapmak için yaratılırlar.

Kapı alma (Gating): Akım sitometride veri analizinin en temel prensiplerinden biri ölü hücreler ve debris gibi istenmeyen partiküllerden elde edilen sonuçların elimine edilerek selektif olarak araştırılan hücrelerin incelenmesidir. Bu amaçla, incelenmek istenen hücreler grafik bir çerçeve ile belirlenir, buna kapılama veya kapı alma (gating) işlemi denilmektedir(36,37). Kapı alma ile bölgeler oluşturulur. Bir veya daha çok bölge içerebilir. Oluşturulan bölgeler histogram ve nokta alan grafiğinde araştırılan alt hücre grubunun izole edilerek analizine olanak sağlar. Renklendirme özelliği amacıyla kullanılır. Ayrıca bazı yazılım programlarında var olan, kapı alınan

hücreleri renklendirme özelliği ile seçilen hücre grubu daha iyi bir şekilde ayırt edilebilir(14,38).

2.2.4 Flow Sitometri Kullanım Alanları

Yıllar boyunca, akış sitometrisi teknolojisi, çoklu uygulamaları ile hücre tıbbı, immünoloji ve hemopoietik ontojenik anlayışımızı önemli ölçüde etkilemiş ve klinik tıbbın tanısallık zorluklarına uygulanmasına olanak sağlamıştır. Akış sitometri kullanım alanlarına baktığımızda klinik ve araştırma laboratuvarları, hemotoloji, enfeksiyon hastalıkları, onkoloji, immünoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, patoloji, parazitoloji, radyasyon onkolojisi, malaria, deniz biyolojisi ve bitki biyolojisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır(32). İmmünofenotiplendirme analizinde, tüm hücrelerin yüzeyinde ve hücre içinde hücreye ve maturasyonuna spesifik antijenler mevcuttur. Flow sitometri ile hücrelerin eksprese ettikleri antijenlere karşı monoklonal antikorlar kullanılarak kan yada kemik iliği gibi karışık popülasyonda belli bir hücrenin belirlenmesi ve ayrılması yapılabilir. İmmünofenotiplenmenin tıpta kullanım alanları: Lenfoma ve lösemi immünotiplenmesi (KLL, ALL, AML, KML), hematolojik hastalıkların belirlenmesi (ITP, nötrofil fonksiyon defektleri), immün yetmezliklerin teşhisi, kemoterapi etkinliğinin izlenmesi, otoimmün hastalıkların tanısı, transplantasyon öncesi ve sonrası hasta durumunun gözlemlenmesi ve allerjik hastalıklarda kullanılmaktadır(39,40). Günümüzde en sık lösemi, lenfoma ve myeloma hastalarında kullanılır. Lösemi immünofenotiplenmesinde en sık kullanılan örnekler kan ve kemik iliğidir. Sağlıklı bir insanla lösemili bir insanın kan örnekleri arasında dramatik farklılıklar mevcuttur. Sağlıklı insanlarda kan profili kesindir ve bilinir ancak lösemili hastalarda profil çok değişkendir. Bu alanda kök hücre çalışmalarında özellikle flow sitometrik analizlerle tedaviler yönlendirilebilmektedir(14,41).

2.3 HEMATOLOJİK TANIDA FLOW SİTOMETRİ

2.3.1 Flow Sitometri Kullanım Alanları

Akım Sitometrisinin güncel hematolojik uygulamalardaki kullanımı giderek artmaktadır. Bu artışın nedenleri arasında, kısa sürede sonuç alınabilmesi, kullanımının kolay öğrenilebilmesi, anormal hücrelerin tanınmasına olan katkısı sayılabilir. Akım sitometrenin hematoloji ve immünolojide kullanımı ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle hematolojik malignansilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasına yaptığı katkı akım sitometriyi hematoloji biliminin vazgeçilmezi yapmıştır. Son on yılda monoklonal antikor teknolojisinde ve akım sitometri cihazlarındaki gelişmelerle multiparametrik analizler yapmak mümkün olmuştur. Buna paralel olarak hematolojik malignansilerle ilgili yapılan çok merkezli çalışmalar sayesinde lösemilerin hemen hemen tamamının fenotipik özellikleri standardize edilmiştir. Doğru monoklonal antikorların kullanılması ve kombinasyonun yapılması, buna ek olarak doğru kapılama stratejileri ile lösemik hücreleri normal hücrelerden ayırmak ve tanımlamak mümkündür. Lösemi immünfenotipleme yapılırken sadece anormal hücreler veya blastlar analiz edilmemeli, aynı zamanda diğer normal hücre grupları da internal kontrol olarak analiz edilmelidir.

Akım sitometri hematolojide en çok tanı, lösemi/lenfoma/miyelom gibi hastalıkların sınıflanması ve tedavinin takibi amaçlarıyla kullanılmaktadır. Akım Sitometresi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immünfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir(42).

2.3.2 İmmünfenotipleme

İmmünfenotipleme, hücrelerin yüzeyinde, çekirdeğinde veya sitoplazmasında bulunan markır veya antijen türlerine göre hücreleri tanımlamak için

kullanılan bir testtir. Bu teknik, hücrelerdeki markırları veya antijenleri belirleyen antikörleri kullanarak hücre soylarını, dolayısıyla “immüno” önekini tanımlamaya yardımcı olur. Bazı antijenler sadece bir hücre tipinde bulunurken, diğerleri farklı tiplerde bulunur. Bu işlem normal hücreleri ve kanser hücrelerini karşılaştırarak farklı lenfoma ve lösemi tiplerini teşhis etmek için yaygın olarak kullanılır. Akut lösemilerin, özellikle de akut miyeloid lösemilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında yaygın bir teknik haline gelmiştir. Hücre yüzey antijenlerinin tanımlanmasında “Cluster of Differentiation, CD” terminolojisi kullanılır.

2.3.3 Akım Sitometri ile İmmünofenotipleme Yapmanın Avantajları:

- Büyüklük (FSC) ve Granüler (SSC) yapılarına göre hücreler sınıflandırılabilir.
- Ölü hücreler çalışma dışı tutulabilir.
- Zayıf eksprese edilen yüzey antijenleri tesbit edilebilir.
- Çok renkli (2,3,4,...) analizler ile hücrenin fenotipi, gelişiminin hangi evresinde bulunduğu belirlenebilir.
- Eş zamanlı bulunan birden çok hematolojik malinitenin, bifenotipik hücrelerin belirlenmesi mümkündür.

2.3.4 Dezavantajları:

- Sklerotik kemik iliğinden, hiposellüler kemik iliklerinden akım sitometri için yeterli sayıda hücre toplanamaz.
- Hücrelerin çevreleriyle olan ilişkileri gözlenemez
- T hücreden zengin lenfomalarda ufak bir monoklonal B hücre klonunun tanınması mümkün olmayabilir.
- T hücreli lenfomaların aberan bir antijen(-örneğin bir panT hücre belirleyicinin kaybı/azalması) bulundurmadıkları sürece tanınması mümkün olmaz.
- Aberan bir T hücre immünofenotipi, her zaman bir malinite göstergesi olmayıp; enfeksiyöz mononukleoz, reaktif dermatoz, enflamatuvar hastalıklarda da görülebilir.
- Lenfomalarda doku tutulumunun homojen olmadığı durumlarda yalancı negatif sonuçlar alınabilir.

- Hodgkin hastalığında neoplastik hücre sayısının az olması nedeniyle de tanıda akım sitometri kullanımının bir yararı olmaz.

Dezavantajları nedeni ile akım sitometri sonuçlarının daima ışık mikroskobu verileri ile birlikte değerlendirilmesi gerekir. Klinik veriler, moleküler/sitogenetik çalışmalar da verilerin değerlendirilmesinde yardımcı olan unsurlardır. Akım sitometri, morfolojik olarak şüphelenilen çeşitli hastalıkları doğrulamakta, hastalık alt tiplerinin belirlenmesinde, ayırıcı tanıda seçenekleri azaltmada, kullanılabilir. Bazı durumlarda morfoloji bilinmese de tanısallık değerlendirmelerin yapılabileceği savunulmaktadır(42).

Tablo 3. ASM nin Tanıya Katkıda Bulunduğu Hematolojik Hastalıklar(42)

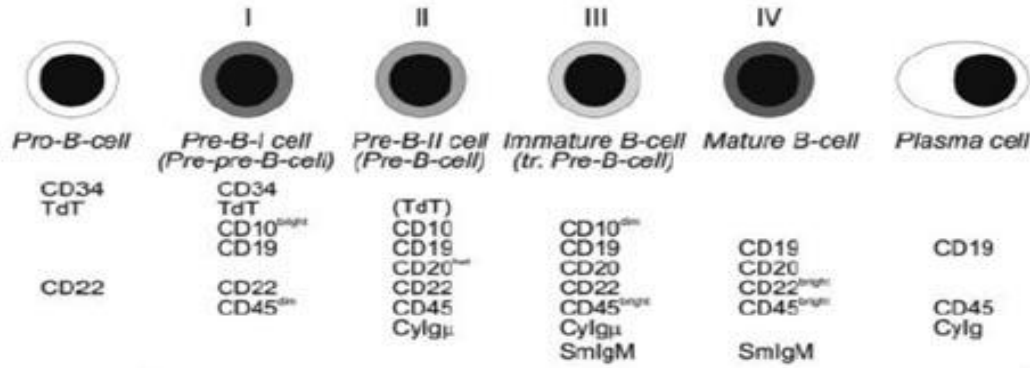
ASM nin tanıya katkıda bulunduğu hematolojik hastalıklar	
ASM ile tanı koyulabilir	ASM tanı ve ayırıcı tanıda yardımcıdır
Pre-B ALL	Foliküler NHL
T-ALL	“Mantle Cell” Lenfoma
B-CLL, SLL,	Diğer “low grade” lenfomalar
“Hairy Cell” Lösemi	Büyük B hücreli NHL
Akut Miyeloid Lösemi	Burkitt’s lenfoma
Paroxysmal Nocturnal” Hemoglobinüri	“Large” granuler lenfosit hastalıkları
	Plazma hücre hastalıkları
	MDS

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, **CLL:** Kronik Lenfositik Lösemi , **SLL:**Küçük Lenfositik Lenfoma,
NHL: NonHodgkin Lenfoma

2.3.5 Akut Lösemiler

Akut lösemilerin akım sitometre ile analizlerinde en önemli nokta; analiz edilecek hücrelerin doğru ve saf halde seçilmesidir. Kapılamanın doğru yapılması ve uygun monoklonal antikorların kullanımıyla akut lösemilerin %95’i tanımlanabilir. Periferik kan ve özellikle kemik iliği örneklerinde sadece FS/SS grafiği kullanılarak anormal hücrelerin (blast) saf bir halde kapılanması çok zordur. Ayrıca blast hücre yüzdesinin düşük olduğu olgularda kapılamayı FS/SS grafiğinde yapmak yanlış fenotipik tanımlamalar yapılmasına neden olabilir. Akut lösemilerde hücrelerin bulundukları CD45 miktarına ve 90° kırılan ışık (SSC) özelliklerine göre ayırmak ve

blastların bu grafikte seçilmesi çok daha kolaydır(bkz. Şekil 7). Ancak bu antikorun her tübe eklenmesi maliyeti arttırıcı bir faktördür(43,44).



Şekil 9. B Hücrelerin CD45 Miktarına ve 90° Kırılan Işık (SSC) Özelliklerine Göre Ayrımı(42).

2.3.5. 1 Akut Miyeloid Lösemi (AML)

AML, granülosit-eritrosit-megakaryosit serilerinin herhangi birinden köken alabilir. AML primer olarak ortaya çıkacağı gibi, miyelodisplastik sendMJ, guenromdan akut lösemiye transformasyonla da ortaya çıkabilir. AML'ler genelde ileri yaş hastalığı olmakla beraber, her yaşta görülebilir(45,46).

AML M0; büyüklük ve granül yapıları açısından lenfosit yapısında hücreler olup CD45/SS grafiğinde Lenfoblast bölgesinde lokalize olurlar. Fenotipik olarak CD13, CD33, CD34, CD117, HLA-DR antijenleri ve sitoplazmik myeloperoksidaz (cMPO) pozitifdir. CD13 pozitifliği CD33'ten daha fazla olabilir. cMPO floresan şiddeti bazı olgularda düşük (zayıf bağlanma) olabilir.

Genelde lenfoid antijenler negatiftir. Ancak bazı olgularda CD/ pozitifliği olabilir. CD/ ifadesi kötü prognoz kriteridir. Ayrıca lenfoid antijenlerin varlığı sitogenetik anomalisinin olabileceğini gösterir(47,48).

AML M1; büyüklük ve granül yapıları açısından AML M0 ile benzerlik gösterir. Blastlar M0'dan farklı olarak biraz granüllü olabilir. Fenotipik olarak CD13, CD33 ve HLA-DR pozitifdir. CD34 ve CD117 pozitifliği M0'dan azdır. AML M1 blastlarda M0'dan farklı olarak CD15 kısmi pozitifliği gösterir(49).

AML M2; M1'den en önemli farkı blast yüzdesidir. Ayrıca M2 blastlar maturasyona bağlı olarak M1'den daha granüllüdür. CD45/SS grafiğinde myeloblast bölgesinde

lokalize olurlar. Fenotipik olarak M2 blastlar, M1'den daha düşük CD34 pozitifliği, daha fazla CD15 pozitifliği ile karakterizedir. Ayrıca CD13, CD33 ve HLA-DR pozitifdir(49,50).

AML M3; hipergranüler veya hipogranüler olmak üzere morfolojik olarak iki farklı blast tipi görülebilir. Fenotipik olarak benzer antijen pozitiflikleri gösterirler. (CD13, CD33, CD15, pozitif iken, HLA-DR ve CD34 genelde negatiftir) İki M3 tipi blastların birbirinden en önemli farkı CD45/SS grafiğindeki lokalizasyonlardır. Bazı mikroganüler tip M3 blastlarda CD' antijen pozitifliği olabilir.

AML M4 ve M5; her ik gruptaki blastların fenotipik özellikleri benzerdir. Ancak CD34 pozitifliği M4 ve M5 ten daha fazladır. Blastlar M0'dakilerle karşılaştırıldığında çok daha büyük ve granüllü hücrelerdir. CD45/SS grafiğinde monositik bölgede lokalize olurlar ve CD45 açısından normal monositlere göre daha zayıf bağlanırlar. Her iki grupta fenotipik açıdan CD13, CD33, CD15, CD14 ve HLA-DR antijenleri pozitifdir. CD33 pozitifliği ve floresan şiddeti CD13'ten daha fazla olabilir. Ayrıca CD14 floresan şiddeti ve antijen pozitifliği normal monositlerden genelde daha düşüktür. Bazı M5 olgularında CD33, CD13 ve CD34 negatiftir. Ayrıca CD56 pozitifliği bazı M5 olgularında görülebilir. CD2 pozitifliği M4'ün bir alt grubu olan M4Eo için çok önemli bir bulgudur.

AML M6; çok nadir görülen ve iyi karakterize edilememiş lösemi tipidir. HLA-DR ve CD34 pozitifdir. CD34/SS grafiğinde eritroid hücrelerle karışmış veya biraz üzerinde lokalize olurlar. CD235a (glikoforin A) pozitifliği önemlidir. Ancak normal eritroid hücrelerde de CD235a pozitifliği çok kuvvetli olduğundan, kullanılacak çalışma metoduna dikkat edilmeli ve en önemlisi CD34 pozitif hücreler üzerinde CD235a pozitifliğine bakılmalıdır(51,52).

AML M7; megakaryoblastik lösemi çok nadir görülen bir lösemi tipidir. Megakaryoblastlar tipik olarak CD61 ve/veya CD41 antijenlerinin pozitifliği ile tanımlanabilir. Ancak akım sitometrik analizlerde trombositlerin blastlara yapıştıkları, ayrıca aktive olmuş trombositlerin de lökositlere ve blastlara P-selektin aracılığıyla yapıştığı ve unutulmamalı bu nedenle de yanlış CD61 ve/veya CD41 pozitifliklerine dikkat edilmelidir(53).

M7 tanısı yapılırken;

- Periferik yaymada veya kemik iliği yaymasında morfolojik olarak megakaryoblastların varlığının tespit edilmesi
- Akım sitometrik analizde ise CD34⁺ pozitif hücrelerde CD61⁺ ve/veya CD41⁺ pozitifliğinin gösterilmesi
- Ayrıca CD61 ve/veya CD41 bağlanması zayıf değil daha parlak olması M7 tanısını daha güvenilir hale getirecektir. Matür trombosit belirleyicisi olan CD42b analizi de megakaryoblast tanımlanmasında yardımcı olarak kullanılabilir.

2.3.5.2 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Çocukluk çağı kanserlerinin %25'ini, erişkin lösemilerin ise %20'sini oluşturur. ALL'leri B hücreli ve T hücreli olmak üzere 2 alt grupta incelemek mümkündür(54,58).

B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B ALL): B ALL'leri maturasyon sürecine göre 3 alt grupta incelenebilir.

B Prekürsör ALL (Pro B ALL); çocukluk çağı All'lerin %70'inden sorumludur. Erişkinlerde ise bu oran %50'dir. Blastlar tipik olarak küçük hücreler olup FS ve SS açısından minimal bölgede lokalize olur. Bazı vakalarda CD45 negatif veya çok zayıf olabilir. Fenotipik açıdan en önemli özelliği; CD19, CD22, CD34, HLA-DR, CD24 pozitifliğidir. Olguların %90'dan fazlasında CD10 pozitifdir. CD10 pozitifliği iyi, negatifliği ise kötü prognoz kriteridir. Yüzey IgM negatiftir. İntrasitoplazmik CD79a⁺ pozitifdir(56).

Pre B ALL; Blastlar tipik olarak CD19, CD24, HLA-DR, CD10 ve intrasitoplazmik CD22 pozitifdir. CD20^{+/+} ve TdT^{+/+} antijenleri değişkendir. CD34^{+/+} genelde negatiftir. Pre B ALL olgularında özellikle CD19⁺, CD10⁺, CD9⁺, CD20^{+/+}, ve CD34⁻ fenotipi t(1:19) sitogenetik anomalisine sensitiftir.

B ALL; Prekürsör B ALL blastlarına göre daha büyük ve daha granüllü olan blastlar, CD45/SS grafiğinde lenfosit ve monosit bölgeleri arasında lokalize olurlar. Fenotipik olarak CD19, CD20, CD22, CD24 ve parlak yüzey IgM pozitifdir. Birçok olguda CD10 pozitifdir.

2.3.5.3 T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T ALL):

T ALL, erişkin ALL'lerin %25'ini, çocukluk çağı ALL'lerin ise %15'ini oluşturur. T ALL'deki blastlar farklı büyüklük ve granül yapıları nedeniyle CD45/SS grafiğinde farklı bölgelerde (lenfoblast, miyeloblast, monositik) lokalize olabilirler. Bu sebeple kapılama yapılırken bu özelliklere dikkat edilmelidir.

T ALL'ler timik evrelerine göre 4 alt gruba ayrılır.

Pre T ALL; CD/ ve sitoplazmik pozitifliği ile karakterize olup diğer T antijenleri (CD2, CD5, CD4, CD8, yüzey CD3) negatiftir. Prognozu kötü seyreden T ALL grubudur.

Erken Kortikal Timik (EKT); CD7, CD2, CD5 ve TdT pozitifliği ile karakterize olup TdT kuvvetli bağlanır.

Geç Kortikal Timik (GKT); CD7, CD2, CD5, CD1 ve CD4/CD8 ortak pozitifliği ile karakterize olup minimal düzeyde yüzey CD3 pozitifliği vardır. Ayrıca CD3 zayıf bağlanır.

Medullar; CD7, CD2, CD5, CD4 ve CD8 pozitifliği ile karakterize olup CD3 pozitifliği geç kortikal timikten daha fazladır ve CD3 zayıf bağlanır(57,58).

2.3.5.4 Multiple Miyelom (MM)

Multipl miyelom nadir görülen ve çoğunlukla yaşlılarda ortaya çıkan bir kemik iliği kanseridir. Multipl miyelom, tüm kanserlerin %1'ini ve hematolojik kanserlerin %10'unu oluşturur. Bağışıklık sistemimizin savunmada görevli ana hücrelerinden B-lenfositler mikroorganizmalarla karşılaştıklarında plazma hücrelerine dönüşerek antikor (immünoglobülin, Ig) dediğimiz maddeleri üretir. Multipl miyelom, M proteini denen IgG, IgA veya hafif zincir gibi proteinler salgılayan kan hücrelerinin bir hastalığıdır. Ancak, multipl miyelomda plazma hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalarak aşırı miktarda tek tip immünoglobülin üretirler. Bununla birlikte diğer immünoglobülin tiplerinin düzeylerinde ise tehlikeli derecede azalmalar görülür ve hastalar enfeksiyonlara karşı duyarlı hale gelirler.

Plazma hücreleri farklılaştıkça B hücre antijenlerini (CD19, CD22, sIg, HLA-DR), CD45i kaybeder ve CD38(çok parlak), PCA-1, CD138 gibi yeni antijenler taşır. CD 38, T, NK hücrelerde monositlerde de bulunduğu tek başına değil de CD56,

CD45, gibi diğer antijenlerle birlikte kullanılırsa daha iyi bir ayırım sağlanabilir. Tipik fenotipler şöyle özetlenebilir:

Primitif plazma hücreleri: CD45++, CD38++, CD19+, CD10+, CD56+, VLA5+

İmmatür plazma hücreleri: CD45+, CD38++

Matür plazma hücreleri: CD45-, CD38++, CD19-

Primitif hücrelerin varlığı kötü prognoz işaretidir(42).

2.4 ANALİTİK PERFORMANS

2.4.1 Metot Validasyonu

Bir metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun deneysel çalışmalarla elde edilen objektif delillerle doğrulanmasına validasyon denir(65). Bu nedenle laboratuvar tarafından verilen sonuçların doğruluğu ayrı bir öneme sahiptir. Doğruluğun belirlenip sürdürülmesi ciddi çaba, para ve yapılan testin karmaşıklığına bağlı olarak farklı yaklaşımlar gerektirir. Yeni bir testin uygulanmasından önce o testin uygun sonuç verme yetisini belirlemek gerekir. Yöntem değerlendirmesi, yeni yöntemlerin hasta sonuçlarını bildirmeden önce kabul edilebilirliğinin doğrulanmasında kullanılır. Yöntem uygulamaya konulduktan sonra laboratuvarın zaman içerisinde testin daimi olarak geçerli kalmasını kalite kontrol süreci ile sağlanması gerekir.

Geçerli kılma yani validasyon, işlem, süreç, sistem ya da metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması, kullanım amacını karşılayıp karşılamadığının gösterilmesi için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Metot validasyonu bir hata değerlendirme sürecidir. Analitik hatalar belirlenir, tanımlanır ve değerlendirilir. Tek bir laboratuvar (internal validasyon) veya birçok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. Bir laboratuvarda kullanılacak her türlü metot rutin analiz için kullanılmadan önce laboratuvar koşullarında analiz yapan kişiler tarafından valide edilmesi gerekmektedir.

Metot validasyonun amacı seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte (performansta, kalitede) sonuç verdiğini test etmek ve metodun rutin kullanımı sırasında istenen performansı sağlamanın koşullarını belirlemek ve kontrol altında

tutmaktır. Bir metotla yapılan ölçümün sonuçları; laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart, operatör deneyimi gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle metodun ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçülerek ölçüm sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir(64).

Belli bir kalite sistemine uygun çalışan laboratuvarların kullandıkları metotları valide etmeleri gerekmektedir ve akredite laboratuvarlar için bu bir gerekliliktir. Kalite sisteminin yaygınlaşması laboratuvarlarda metot validasyonu çalışmalarının yapılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansını çeşitli faktörler etkilemektedir. Bu sebeple ölçüm metodunun çok iyi tanımlanması gerekmektedir. Analiz edilen örneğe, analiz edilen bileşenlerin cinsine ve miktarına bağlı olarak farklı metot kullanmak gerekebilmektedir. Belli bir analiz için çok değişik metotlardan hangisinin uygulanacağı analiz edilen örnek cinsine, analiz edilecek bileşenlerin miktarına, günlük yapılacak analiz sayısına, istenen sonucun kalitesine, metodunun uygulama kolaylığına, analiz süresine, analiz maliyetine bağlı olarak yapılacak bir değerlendirme sonucunda belirlenmelidir.

2.4.2 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) H26-A2 Prosedürü

Yeni bir hematoloji analizörü pazar içi bir analizör veya referans yöntemler ile karşılaştırılabilir. Aşağıdaki yöntemler referans yöntemler olarak kabul edilir:

- Beyaz kan hücresi (WBC) diferansiyel için seçici mikroskopi
- Hematokrit (HCT) için seçici mikrohematokrit (PCV) (CLSI dokümanı H 7)
- Hemoglobinsiyanür yöntemi ile hemoglobin (Hb).
- Seçici PLT monoklonal antikor (örn., Anti-CD61, anti-CD41a) Faz mikroskopisi yaklaşımı alternatif bir tarihsel karşılaştırmalı yöntemdir.
- Retikülositler, flowsitometri, bir veya daha fazla farklı hücresel özelliği bunları olgun kırmızı kan hücrelerinden (RBC) ayırır.

Dahil Edilme Kriterleri: Numuneler EDTA içerikli tüplere alınır. Ya K2EDTA ya da K3EDTA içerikli tüpler tercih edilmelidir. Mümkünse Hematolojide Uluslararası Standardizasyon Konseyi (ICSH)'nin de önerdiği gibi K2EDTA tercih edilebilir.

Hematolojide yaşlanma etkilerini en aza indirmek için flebotomi sonrası en geç sekiz saat içinde numuneleri test edin. Uzun vadeli stabilite çalışmaları bu dökümanın dışındadır.

Hariç Tutma Kriterleri:

- Gözle görünür hemolizli örnekler
- Gözle görünür pıhtılı numuneler
- Kan hacmi yetersiz olan numuneler
- Sekiz saatten daha eski numuneler

2.4.2.1 Kalibrasyon ve Kalite Kontrol Enstrüman Kalibrasyonu:

İzlenebilir bir kalibratör kullanarak üreticinin talimatlarına göre karşılaştırmalı otomatize analizörün (CAA) kalibrasyonu yapın. Çalışma sırasında CAA kalibrasyonu değiştirilirse, test edilen otomatize analizörün (TAA) kalibrasyon durumu tasdiklenmelidir.

TAA'yı normal taze tam kan numuneleri ile CAA'ye kalibre edin. Bu yaklaşım, özellikle iki aracın ticari ürünlerden bağımsız olarak kalibre edilmesini, taze kan sonuçlarının çapraz platform karşılaştırılabilirliğini sağlamak üzere tasarlanmıştır.

Validasyon çalışması sırasında, TAA ve CAA arasında tam kan çapraz referans kontrolleri (cross reference checks) uygulayarak günlük kalibrasyon doğrulamasını yapın (normal aralıkta en az 10 numune). Verileri geçersiz olan örnek çalışmalarını reddedin.

2.4.2.2 Tam Kan Cross-check

Validasyonun temel amaçlarından biri, TAA ve CAA arasındaki hasta sonuçlarını karşılaştırmak olduğundan eş-kalibrasyon statüsünün değerlendirilmesi öncelikle taze tam kan ile gerçekleştirilir, çünkü ticari materyaller arasında matriks etkileri vardır.

Amerikan Patologlar Birliği (CAP) Hematolojisi ve Koagülasyon Laboratuvarları Akreditasyon Kontrol Listesi, cihazlar arası karşılaştırmalarda, hasta numunesinin laboratuvarın çeşitli hematoloji platformlarında aynı sonuçları gösterip gösteremeyeceği konusuna doğrudan değinmek için yeni hasta veya donör numunelerin kullanılmasını tercih etmektedir. Bilimsel literatür de sistemler arası karşılaştırılma için hasta numunelerinin kullanılmasını vurgular.

Taze kan, çapraz kalibre edilmiş TAA ve CAA'nın devam eden kalibrasyon stabilitesinin doğrulanması için birincil mekanizma görevi yapar. CBC AMI genellikle tek bir kalibrasyon noktasına bağlıdır.

Değerleri laboratuvarın referans aralığında olan WBC, RBC, Hb, HCT ve PLT parametreleri 10 tam kan numunesi ile her bir enstrüman üzerinde çalışma numunelerini işleme tabi tutmadan önce her gün test edilir. 10 numunenin kullanılması, geniş bir matriks çeşidi sağlar ve tek bir numunenin metod hesaplamaları üzerindeki etkisini en aza indirir.

Her ne kadar 10 numunenin her biri, her iki cihazda da yukarıda listelenen ölçütler için geçersiz data içermemesi gerekse de, istisnalar mevcuttur. İdeal olarak, her numunenin çalışma süresince referans aralığında olması beklenir. Bunun mümkün olmaması durumunda, düşük konsantrasyonlu bir örneği yüksek konsantrasyonlu bir numuneyle dengelemeye çalışın, böylece ortalamaları referans aralığı içinde olur.

Tüm numunelerin TAA ve CAA çalışma ortalamaları ve aralarındaki fark WBC, RBC, Hb, HCT ve PLT için hesaplanır. TAA ve CAA arasındaki mutlak ortalama farklar aşağıdaki önerilen sınırlara karşı doğrulanır:

Tablo 4. Tam Kan Cross-Check Limitleri

Tam Kan Cross-Check Limitleri		
Ölçülen	Tolerans Limitleri (±)	Birim
WBC	0,3	$\times 10^9 / L$
RBC	0,15	$\times 10^{12} / L$
Hb	0,2 (2)	g/dL (g/L)
HCT	1.3 (0,013)	% (L/L)
PLT	15	$\times 10^9 / L$

NOT: Bir üretici, alternatif sınırlar veya ek karşılaştırmalı ölçütler tanımlayabilir

2.4.2.3 Ticari kontrol materyalleri

Daha önce belirtildiği gibi, taze kan, çapraz kalibre edilmiş TAA ve CAA'nın devam eden kalibrasyon stabilitesinin doğrulanması için birincil mekanizma görevi yapar. Ticari kontrol materyalleri de kalibrasyon durumunu değerlendirmek için ikincil bir mekanizma sağlar.

2.4.2.4 TAA - Test Automated Analyzer

Mean atanması: İlk birkaç gün boyunca, uygun ticari QC materyallerini yaklaşık iki saatte bir işleyin. Biriken 12 veri noktası, geçici olarak her ölçüm için bir ortalama belirlemek için kullanılır. Çalışma süresince lot değişirse, ortalama değer için aynı işleme tabi tutulmalıdır.

Aralık atanması: Kontrol paketinin aralıkları, bir laboratuarda tek bir cihaz için SD çoklu QC aralıklarını gösteremez. Bu nedenle, otomatik bir hematoloji analizörünün "kontrol altında" olup olmadığını değerlendirmede SD çoklu QC aralıkları uygun değildirler.

QC kuralları: TAA ile geçmiş bir tecrübeye sahip olunamadığı için, çalışma başlangıcında cihaz içi doğru SD değerleri mevcut değildir. Bu yüzden Levey-Jennings grafikleri ve Westgard çoklu kuralları TAA üzerinde uygulanamaz.

Westgard tarafından belirtildiği gibi: "Ortamalar, standart sapmalar, aralıklar ve laboratuvarınızın dışındaki diğer veriler, laboratuvarınızın bireysel ve özel koşullarını yansıtmaz. Laboratuvarın dışından temin edilen verilerin kullanımı geçici bir çözümdür."

2.4.2.5 CAA - Comparative Automated Analyzer

Mean atanması: Eğer çalışma başlatılmadan önce validasyona uygun ticari kontrolleri kullanıyorsa, hali hazırda her ölçüm bölgesi için geri kazanılan ortalama bir değere sahiptir. Değilse, TAA ortalama değer tespiti prosedürünü takip edin (yani, üç günde 12 veri noktası).

Aralık ataması: Validasyon için genellikle uzun vadeli imprecisyon değerleri (% CV) bulunur. Atanmış ortalama ile bağlantılı olarak, lota özel SD'ler geliştirilebilir.

QC kuralları: Validasyon çalışması bağlamında, aşağıdaki ölçütler genellikle izlenir (en azından):

• WBC • RBC • Hb • HCT • PLT

Birçok "kural", Westgard tarafından yaygınlaştırılanlar gibi QC verilerinin ve Levey-Jennings grafiğinin analizlerinde kullanılır. Bu kurallar arasında, hata tespit etme olasılığı (Ped) ve yanlış red olasılığı (Pfr) düşük olanlar vardır. Bir doğrulama çalışması amacıyla, çalışma verilerinin toplanmasına devam etmeden önce alet performansının derhal incelenmesine rehberlik etmek için yalnızca aşağıdaki Westgard çoklu kuralları gereklidir:

1 3 s (bir veri noktası ± 3 SD'yi aşması)

2 2 s (iki ardışık veri noktasının aynı ± 2 SD'yi aşması)

R 4 s (iki ardışık veri noktası, 4 SD aralığını aşması)

Bu üç kuraldan herhangi birinin ihlal edilmesi, çalışma verileri toplama işlemine başlamadan önce dökümantasyon ve düzeltici faaliyet (eğer belirtilmişse) gerektirir. Diğer QC kuralları, bu çalışmanın amaçları için kritik değildir (59).

2.4.2.6 Metot validasyon parametreleri:

- Doğruluk (Accuracy)
- Analitik aralık (Linearite)
- Analitik ölçüm limitleri

- Tekarlanabilirlik (Precision)
- Analitik Duyarlık (Analitik sensitivite)
- Analitik özgülük (Analitik spesifiklik)
- Geri elde (Recovery)
- İnterferans
- Taşıma (Carry-over)
- Matriks etkisi
- Referans aralık doğrulama
- Yöntem karşılaştırma

2.4.3 Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk elde edilen değer ile gerçek değer arasındaki yakınlığının ifadesidir. Ölçülen değerle gerçek değer arasındaki fark sistematik hata (bias) olarak tanımlanır (Ellison ve ark 2000). Doğruluğun göstergesi sistemik hatadır. Sistematik hata bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini belirtir. Sistematik hatanın hesaplanabilmesi için doğru olduğu kabul edilen referans yani gerçek değer bilinmelidir. Gerçek değer sertifikalı referans materyallerden, valide edilmiş metodun ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir. Bu üç yöntemde de ortak nokta gerçek değer birçok laboratuvarında yapılmış ölçümlerin sonucunda elde edilmiş olmasıdır.

2.4.4 Doğrusallık (Linearity) -Analitik Ölçüm Aralığı (AMI)

Yöntemin hiç düzeltme yapılmadan örnekteki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı sonuçlar verme yeteneğidir. X eksenine beklenen değerler, Y eksenine ise elde edilen değerler girilerek kalibrasyon grafiği çizilir ve ortaya çıkan çizgi doğru ise yöntem lineerdir. Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örneklerle veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “linear regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı”

belirtilir. Bu Şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı $>0,99$ olmalıdır.

Linearite kavramı, hematolojik hücre sayımı testleri (RBC, WBC, PLT) için değil, sadece konsantrasyona dayalı kolorimetrik transmisyon/absorbsiyon ile ilgili bir kimya testi olarak Hb'ye uygulanabilir.

Bilinen yüksek bir konsantrasyondaki hücrelerin seri dilüsyonlarıyla hazırlanan çalışma ile recovery yapılabilir. Burada amaç, klinik rapor edilebilir aralığın (CRI) bir alt kümesi olabilecek AMI'yi oluşturmaktır. CAP Hematolojisi ve Klinik Mikroskopi Kontrol Listesi, linearite çalışmalarının akreditasyon için son kullanıcı laboratuvarlarında gerekli olmadığını özellikle belirtmektedir. CLIA '88 da lineariteden söz edilmemektedir.

WBC Konsantrasyonu, RBC Konsantrasyonu, Hemoglobin, Hematokrit ve Platelet Konsantrasyonu

AMI'yi oluşturmak için iki yaklaşım mevcuttur:

TAA ve CAA arasındaki taze kan korelasyonu. Bu klinik açıdan en uygundur. En az iki farklı üreticinin (eğer mevcutsa) piyasada bulunan "linearite kitleri", üreticilerin talimatlarına göre analiz edilir ve değerlendirilebilir.

2.4.4.1 Analitik Ölçüm Aralığı İstatistiksel Yöntem

Her bir seviye için iki tekrar çalışmasının ortalaması hesaplanır. Linearite analizinde, CLSI belgesinde EP 6'da açıklandığı üzere, en küçük kareler regresyonu yapılır. Bu test uyum eksikliği testi ve uç değer testlerini de içerir. X-ekseni üzerinde teorik konsantrasyon ve y ekseninde TAA ile bir grafik oluşturulur. Nihai performans talepleri sonuç ölçümlerine dayanır ve bu değerlerin ötesinde herhangi bir ekstrapolasyon yapılmaz. CRI'nın kurulması, laboratuvar direktörünün tıbbi ihtiyaçları karşılamak için yaptığı tıbbi bir karardır ve kısmen test teknolojisi üzerine kuruludur. Son kullanıcı laboratuvarı AMI'yı verifiye eder ve CRI daha darsa, başka işlem yapması gerekmez. Tersisi durumda, hasta sonuçlarını AMI'nin ötesinde raporlamak için validasyon yapılması gerekir.

CRI, tipik olarak, ilk yöntem verifikasyonu sırasında oluşturulur ve metodoloji değişmedikçe tekrar değerlendirmeye ihtiyaç duymaz. Örneğin, AMI'nin

üst sınırını aşan bir sonucu raporlamak için, numune, ölçülen miktarı o aralığa getirmek için seyreltilir, seyreltilmiş numune yeniden değerlendirilir ve nihai sonuç, seyreltme faktörü kullanılarak hesaplanır. Yöntem üreticisi AMI ve AMI dışındaki numunelerin seyreltilmesi veya konsantre edilmesi için kullanılan prosedürleri sıklıkla belirtir. CRI'nın alt sınırı, metod validasyonu sırasında doğrulandığı gibi tipik olarak yöntemin AMI'sinin alt sınırıdır. Bu sınırın altındaki değerler sınırın altında olarak bildirilebilir. Hematoloji için, AMI'nin alt sınırının LoB'den daha düşük olamayacağını anlamak önemlidir(63).

2.4.4.2 Tam Kan Konsantrasyonu ve Dilüsyonu

Bu örneklerden elde edilen sonuçlar, AMI'yi doğrulamak ve CRI'yi tanımlamak için native hasta ve donör kan örneklerinden elde edilen korelasyon verilerinin tamamlanması için kullanılır.

Kan örnekleri: En geç dört saat öncesinden en az dört EDTA donör tam kan örneği alınır. Hücreleri ve plazmayı değiştiren bağışıklık fenomeni sebebiyle farklı donörlerden havuz yapılmaması gerekir.

Prosedür:

Numuneler istenilen seviyelere göre konsantre edilir ve seyreltilir. Mümkünse, yüksek konsantrasyonlu stok (HCS) örneğini, üst hedef aralığından yaklaşık % 5 ila % 10 daha fazla hazırlanır.

Hücre ayrımı düşük devirde santrifüjle sağlanır: (böylece hücreler yok edilmez) yukarıdan aşağıya doğru sırayla hücresiz plazma, trombosit açısından zengin plazma, WBC (buffy coat) ve RBC oluşumu gözlenir.

Yüksek örnek konsantrasyonu, hücresiz plazma katmanının ayrıştırılmasıyla elde edilir.

RBC, Hb, HCT, PLT: Aşağıdaki karışımları hazırlamak için en az 2.9 mL HCS ve 2.1 mL düşük konsantrasyonlu stok (LCS) gereklidir. Bir önceki aşamada hazırlanan HCS hücresel numunelerine hücresiz otolog plazma (önceki aşamadaki) veya PBS eklenir. Aşağıdaki seyreltme şeması, yüksek ve düşük ölçülen konsantrasyonları üretir, orta dereceli değerleri oluşturmaz:

Tablo 5. RBC, Hb, HCT, PLT Manipülasyon Tablosu

RBC, Hb, HCT, PLT Manipülasyon Tablosu			
Tüp No	Konsantrasyon (%)	HCS (µl)	LCS (µl)
1	100	1000	0
2	95	950	50
3	80	800	200
4	10	100	900
5	5	50	950
6	0	0	1000 µl LCS'nin içine bir damla tam

WBC: Aşağıdaki karışımları hazırlamak için en az 3.4 mL HCS ve 1.6 mL LCS gerekir.

Tablo 6 WBC Manipülasyon Tablosu

WBC Manipülasyon Tablosu			
Tüp No	Konsantrasyon (%)	HCS (µl)	LCS (µl)
1	100	1000	0
2	90	950	50
3	80	800	200
4	60	600	400
5	2,5	12,5	987,5
6	0	0	1000 µl LCS'nin içine 2 damla tam

Tüpleri numaralarına göre etiketlenir.

Seyreltme şemasına göre, iyi karıştırılmış yüksek hedef ve düşük hedef numuneler ve alikotları etiketli tüplere alınır. Test boyunca tüpleri çok eksenli bir karıştırıcıya yerleştirilir. Her bir örneği çift olarak çalışılır. Etiketli örnekleri, tek bir çalışma sırasında rastgele test edilir veya analitik çalışmalarda gruplandırılır.

2.4.4.3 Plazma İnterferans Düzeltmesi

Lipemi (özellikle şelomikronlar), lökositöz, ikteri ve yüksek konsantrasyonlarda monoklonal proteinler CBCde potansiyel interferanslardır.

- Gözle görünür lipemi
- Serum bilirübin > 10 mg/dL veya gözle görünür ikteri

- c. Hb'nin yanlış yükselmesinden dolayı genellikle anormal derecede yüksek MCH ve MCHC $> 36.0 \text{ g/dL}$ ($> 360 \text{ g/L}$)
- d. monoklonal gammopati $> 1 \text{ g/dL}$ ($> 10 \text{ g/L}$)
- e. WBC $> 100 \times 10^9 / \text{L}$
- f. PLT $> 1000 \times 10^9 / \text{L}$

Prensip

- a. Orijinal tam kan örneğinin RBC konsantrasyonu kaydedilir.
- b. Orijinal kan numunesi tüpünün dibine RBC çökene, orta katmana buffy coat yerleşene kadar dik durmasına ve süpernatanta plazmanın belirgin olmasına izin verilir.
- c. Pasteur pipet veya başka uygun bir cihaz kullanarak, plazma ve buffy coat aspire etmeden delinir. Ucu RBC tabakasının ortalarına geldiğinde yaklaşık $500 \mu\text{L}$ aspire edilir (tam hacim önemli değil). Pipet kaldırma işleminde aspirasyona devam edilmemelidir.
- d. Bu RBC aspiratı sızdırmaz kapaklı düz bir test tüpüne aktarılır.
- e. Üzerine yaklaşık eşit hacimde PBS eklenir. Yine tam hacim kritik değil. Hedef, hematoloji analizörü üzerinde kısa örnek alarmları üretmek için yeterli RBC kütlesi elde etmektir. Başka bir seyreltici kullanılmamalıdır.
- f. Tüp sıkıca kapatılır, yavaş yavaş 10 ila 20 çevirme ile karıştırılır.
- g. Hematoloji analizöründe PBS ile seyreltilmiş RBC alikotu çalıştırılır, böylece doğal plazmadan asgari derecede etkilenen MCV ve MCHC kaydedilir.
- h. Orijinal RBC'yi ve seyreltilmiş MCV sonucunu kullanarak, yeniden düzenlenmiş HCT hesaplanır.

Yeniden düzenlenmiş HCT = (seyreltilmiş MCV) (orijinal RBC) / 10

- i. Seyreltilmiş MCHC'yi ve gözden geçirilmiş HCT'yi kullanarak yeniden düzenlenmiş Hb'yi hesaplanır.

Yeniden düzenlenmiş Hb = (yeniden düzenlenmiş HCT) (seyreltilmiş MCHC)/100

- j. Orijinal RBC'yi ve gözden geçirilmiş Hb'yi kullanarak, yeniden düzenlenmiş MCH hesaplanır.

Yeniden düzenlenmiş MCH = (yeniden düzenlenmiş Hb) / (orijinal RBC) (10)

Kısaca: RBC sonucu orijinal seyreltilmemiş numuneden elde edilirken, MCV ve MCHC seyreltilmiş numuneden elde edilir. HCT, Hb ve MCH iki çalışma arasından hesaplanır.

2.4.5. Analitik Ölçüm Limitleri

2.4.5.1 Limit of blank (LOB)

Reaktif ve analit haricinde kör okumalarının belli bir olasılıkla karşılaşılabilecek en yüksek değeridir. Kör ölçüm düzeyi düşük olması daha doğru ve kesin ölçüm yapmaya izin verir.

Hematoloji için LoB, geleneksel olarak "arka plan" olarak adlandırılır. Arka plan "sayımları" (genellikle WBC, Hb ve PLT), kan içermeyen reaktiflerden ve / veya elektronik "gürültüden" kaynaklanan örneklerle ilişkili bileşenleri yanlış biçimde temsil eder. Günlük çalışmanın başında, tecrübeli operatörün manuel talimatlarına göre arka plan sayımlarını belirleyin. LoB için sayısal sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri, CLSI belgesi EP17 A2'ye göre yapılır.

2.4.5.2 Alt Tespit Sınırı (LoD) ve Alt Ölçüm Sınırı (LoQ)

2.4.5.2.1 Limit of dedection (LOD)

Analitle ilişkili sinyalin geri plan karıştırıcı etkenlerden ayrılabilirdiği en düşük analit miktardır.

2.4.5.2.2 Limit of quantitation (LOQ)

Analitin kantitatif olarak güvenilir, doğru ölçümünün yapılabilirdiği en düşük miktardır.

Hastaların düşük WBC konsantrasyonlarının doğru bir şekilde ölçülmesi, kemoterapi kararları ve kemik iliği nakli sonrası cevabın değerlendirilmesinde, düşük PLT konsantrasyonlarının doğru bir şekilde ölçülmesi de hemoraji ve PLT transfüzyon kararlarını öngörmede klinik açıdan önemlidir.

2.4.5.3 LLoD ve LLoQ CLSI dokümanı EP17;

Tercihen birkaç numuneden türetilmiş, en az 60 ölçüm önermektedir. 6 örnekten oluşan 10'ar kopya kullanılabilir. Böylece numuneden numuneye değişkenlik yakalanır(61).

2.4.5.3.1 CLSI belgesi EP 17 A2;

İki reaktif lotu

Bir cihaz sistemi

Üç test günü

Beş blank örneği

Beş düşük seviye kontrol örneği

Her reaktif-günlük kombinasyonu için numune başına dört tekrarlı ölçüm

Her reaktif lotu için 60 adet toplam boş ve düşük seviye numune ölçümü (3 gün $\times$ 5 örnek $\times$ 4 kopya)

US CLIA '88 tarafından tanımlanan istenilen imprecisyon limitleri;

- WBC: % 15
- PLT: % 25

Üretici, LLoQ çalışmasında imprecisyon kullandığı hedefi belirtmelidir.

LLoQ ve LLoD ölçümleri diğer ölçütler (RBC, Hb, HCT) için gerekli değildir; çünkü neredeyse sıfıra yakın değerler yaşamla bağdaşmaz(61).

2.4.6 Tekrarlanabilirlik (Precision)

Bir yöntemde aynı örneğin ard arda çalışılmasıyla metodun aynı sonucu verebilme gücüdür ve yöntemin kesinliğinin göstergesidir. Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını belirlemek için yapılır. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Laboratuvardaki tekrarlanabilirlik koşullarında bir seri ölçüm yapılarak hesaplanır(62).

2.4.6.1 Taze Kan Kısa Vadeli İmprezisyon

Normal Numuneler:

Bu imprecizyon çalışması, laboratuvarın referans aralığını aşmayan normal taze tam kan kullanılarak yapılır. Aynı kan tüpünün 31 ardışık aspirasyonu kullanılır. Daha küçük numune boyutları daha az arzu edilen daha geniş güven aralıkları üretir. Toplam en azından 12 çalışma için en az üç TAA'nın her biri için en az dört imprecizyon çalışması gerçekleştirilir(62).

Hassas tasarım hedefleri ile ilgili olarak, aşağıdaki tabloda, normal imalatçılar için bazı yayınlanmış öneriler bulunmaktadır; her üretici belirli kriterleri belirlemektedir:

2.4.6.2 Çalışma-içi İmprezisyon

Taze kan veya ticari kontrollerin aynı numunenin tekrarlayan ölçümlerinin imprecizyonu SD ile tanımlanır.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum [x_i - X_a]^2}{n-1}}$$

x_i tek bir tahlil sonucu,
 X_a n tahlil sonuçlarının ortalaması,
 n tekrar tahlillerinin sayısı ve
 SD veri kümesinin standart sapmasıdır.

$$\%CV = \frac{SD}{X_a} \times 100$$

2.4.6.3 Tıbbi karar Seviyelerinde İmprezisyon

ICSH protokolü, imprecizyon çalışmaların patolojik aralıkları içermesi gerektiğini belirtmektedir. Anemi ve trombositopenide yapılan tıbbi transfüzyon kararları nedeniyle, aşağıdaki iki tip patolojik numune için ek imprecizyon çalışmaları yapılmıştır:

- Hb = 6 - 10 g/dL (60 - 100 g/L)
- PLT = 0 - 50 × 10⁹ /L

Ayrıca, tıbbi terapötik kararlar ağır derecede lökopeni ve nötropeni varlığında yapıldığından, aşağıdaki aralıklarla bir imprecizyon çalışması önerilir:

- WBC = 0 - 2 × 10⁹ /L

En az 3 TAA'nın her biri için en az 3 imprecizyon çalışması (n = 31 ardışık kopya) toplam en az 9 çalışma gerçekleştirilir.

Anemik numuneler için sadece RBC, Hb ve HCT analiz edilir; Bu ölçütlere uymayan şüpheli veya geçersiz veri işaretlerini görmezden gelin. Trombositopenik

örnekler için yalnızca PLT analiz edilir ve şüpheli veya geçersiz veri işaretleri göz ardı edilir.

WBC konsantrasyonu ve yüzdesi, lökopenik zorluklarda değerlendirilir. Kan numunelerinin homojen hale getirmek için sallanan bir platform veya manuel yöntemlerden ziyade döner tarzda bir karıştırıcıda karıştırın.

Normal, anemik ve trombositopenik örneklerle taze kan ölçümü ve kesinliği için % 95, % 97.5 ve % 99 üst CL'ler geliştirildi. Düşük hücresel konsantrasyonlarda % CV'nin giderek arttığı bilinmektedir. Bu, özellikle klinik olarak karşılaşılan düşük WBC ve PLT konsantrasyonları için geçerlidir. Bu hassas profiller güven aralıklarını içermelidir(62).

2.4.6.4 Ticari Kontroller Tekrarlanabilirlik ve Cihaz İçi İmprezisyon (Uzun Vadeli)

Ticari kontroller her seviyede (düşük, normal, yüksek) iki tekrar olmak üzere, günde iki çalışma en az 25 gün boyunca test edilir. (EP 5). EP 5A2 ye göre 20 gün boyunca, Gün içi çalışmalar arası 5 ila 12 saat arayla gerçekleştirilir. CLSI dökümanı EP 5 A2'e göre, ticari kontrol paketleri ile tekrarlanabilirlik ve cihaz içi imprecizyon hesaplanabilir(62).

2.4.7 Analitik Duyarlılık (Analitik Sensitive)

Analitin konsantrasyonundaki değişime karşılık ölçüm sinyalinde meydana gelen değişiktir. Yöntemin küçük konsantrasyonları belirleme yeteneğidir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi, sensitivitenin göstergesidir.

2.4.8 Analitik Özgüllük (Analitik Spesifiklik)

Analitik özgüllük, bir metodun aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğine denir. Ölçümün sadece istenilen maddeyi ölçmesi istenir.

2.4.9 Geri Elde (Recovery)

Analitik yöntemin konsantrasyonu bilinen miktarda eklenen analiti doğru olarak belirleyebilme yeteneğidir. Geri elde bir yöntemin doğruluğu hakkında bilgi verir. Ölçümünün yapılacağı hasta örneği ve hasta örneğine standart çözelti eklenmiş örnek analiz edilir. Ölçülen miktar ile eklenmiş olan miktar karşılaştırılır.

2.4.10 İnterferans

Analitin ölçümünü etkileyebilecek çeşitli interferansların belirli konsantrasyonlarda ilavesi ile testin etkilenme düzeylerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu durumun varlığını tespit etmek için örneklerde analiz yapıldıktan sonra, interfere etkisi incelenecek maddeler örneklerle ilave edilir ve eklenen analitlerin ölçümü etkileyip etkilemediği hesaplanır(66).

2.4.11 Taşıma (Carry-over)

Otomatize çalışan sistemler için, önceki numuneden sonraki numuneye herhangi bir aktarım olup olmadığını belirlemek için yapılır. Günümüzdeki teknik imkânlar taşıma hatalarını aza indirmiştir. Çalışmanın yapılması kolaydır. Yüksek ve düşük konsantrasyondaki numuneler belli bir sıra içinde yerleştirilerek ölçüm gerçekleştirilir. Yüksek değerlerden önce gelen düşük değerler ile bir grup oluşturulur. Diğer grup yüksek değerlerden sonra gelen düşük değerlerden oluşur. Belirlenen bu iki grubun ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır. Grupların ortalamaları arasındaki farkın total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenebilir.

Carryover, en az üç TAA'nin her biri için en az üç kez gerçekleştirilir (yani, en az dokuz carryover çalışması). "Yüksek hedef değer" (high target value: HTV) konsantrasyonlarındaki taze tam kan örnekleri üçer kez okutur ve onu takiben "düşük hedef değer" (low target value: LTV) örnekleri üçlü çalışılır (ICSH). Yerine ticari kontrolleri kullanılmaz. Carryover için test edilen parametreler WBC, RBC, Hb ve PLT'dir:

Tablo 7. Önerilen Carryover Örnek Değerleri

Önerilen Carryover Örnek Değerleri		
Ölçülen Madde	HTV ^h	LTV
WBC (x 10 ⁹ /L)	>90	>0 ve <3
RBC(x10 ¹² /L)	>6.20	>0 ve <1,5
Hb (g/dL [g/L])	>22.0 (220)	>0 ve <5.0 (50)
PLT (x10 ⁹ /L)	>900	>0 ve <30

Tabloda gösterilen patolojik olarak yüksek veya düşük konsantrasyonların üretilmesi için normal vericilerden taze tam kan manipülasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, hem HTV hem LTV örnekleri WBC, RBC ve PLT içermelidir; Başka bir deyişle, hücresiz plazma olmamalı, LTV örneği hava veya dilüent aspirasyondan oluşamazlar. Hücre konsantrasyonunun tespit edilememesi beklenen uygun bir matriks sağlamak için partikülsüz yüksek plazma hacmine az miktarda tam kanlar eklenebilir. Ticari kontroller, insanın taze tam kanın matriks etkilerini karşılayamaz. Taze insan kanından farklı hücresel kompozisyon ve insan numunelerinde karşılaşılan gerçekten yüksek ya da gerçekten düşük konsantrasyonda ölçütlerin bulunmaması nedeniyle taze tam insan kanının yerini alamaz.

Carryover, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$\%Carryover = \frac{(LTV1 - LTV3)}{(HTV3 - LTV3)} \times 100$$

Carryover beklenen seviyelerini tanımlamak için, dört ölçüm alanının her biri için % 95, % 97,5 ve % 99 güven sınırları (CL) hesaplanmaktadır.

2.4.12 Matriks Etkisi

Matriks etkisi, LC-MS/MS analizlerinde standart solüsyon içindeki madde ile plazma gibi biyolojik matriksteki aynı analitin farklı yanıtlar vermesi olarak tanımlanır. Matriks etkisinin son derece değişken olması yöntemlerin doğruluk ve kesinliğinde önemli hatalara neden olmaktadır.

Ekstraksiyon olarak Elektro Sprey Ionizasyon (ESI) gerektiren çalışmalarda uçucu olmayan maddeler damla buharlaşmasını değiştirerek detektöre gaz fazında ulaşan yüklü iyon miktarını değiştirmektedir(64).

2.4.13 Referans Aralık Doğrulama

Referans aralık doğrulama çalışmasının yapılması pahalı ve zordur. Referans aralık doğrulama çalışması için en az 20 sağlıklı birey gerekmektedir. Değerlendirmede aralık dışına çıkanların sayısı %10'u geçmemelidir. Her laboratuvarın kendi referans aralığını belirleme şartı yoktur ama belirlenmiş referans aralığını teyit etmesi gerekir(64).

2.4.14 Yöntem Karşılaştırma

Örnekler iki yöntemde ve aynı zamanda çalışılır, sonuçlar karşılaştırılır ve karşılaştırma için regresyon analizi yapılır. Rapor aralığı içinde en az 40 örnek hem test yöntemi, hem de karşılaştırma yöntemi ile çalışılır. Sayı ne kadar çok olursa sonuç o kadar sağlıklıdır. İki metot ile elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki farkın ortalamalarına karşı gösterdiği dağılım Bland-Altman grafiği ile değerlendirilir(64).

2.4.15 Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda incelenen parametrelere ait değerler $X \pm SD$ olarak verildi. İkiden fazla grubun karşılaştırılmasında, normal dağılıma uyan parametrelere tek yönlü varyans analizi uygulandı (ANOVA). Takibinde yapılan post hoc analizlerde: gruplar arası ikili kıyaslamada Tukey testi kullanıldı. İkiden fazla grubun karşılaştırılmasında, normal dağılıma uymayan parametrelere tek yönlü varyans analizi uygulandı (Kruskal-Wallis), Post hoc çoklu karşılaştırma yöntemi olarak Mann-Whitney U tercih edildi. Tüm analizler SPSS sürüm 11.5 istatistiksel paket programı ile yapıldı. Değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. Hasta Gruplarının Özellikleri

Bu çalışma S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya alınan tüm hastalara, incelemeyi anlatan bilgilendirme formu verilmiş ve imzalı onay belgesi alınmıştır. Çalışma grubumuz, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi başvuran ve ALL AML Multipl Miyelom ve Lenfoma şüphesi ile takip edilen hastalar arasından oluşturuldu.

Lenfoma grubu sağlıklı kemik iliği numuneleri olarak değerlendirildi. Lenfomalardan kemik iliği numunelerinin alınma sebebi kemik iliğine metastaz olup olmadığını görmektir. Ayrıca literatürde bu tür çalışmalarda lenfoma sağlıklı hasta grubu olarak alındığından bizde sağlıklı olarak referans aldık.

Çalışma gruplarımız;

1. Akut Myeloid Lösemi (AML) (n=41),
2. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) (n=42),
3. Multipl Miyelom (n=48),
4. Lenfoma tanısı konulan hastalar (n=44)

Hasta Grubu (n=175);

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Poliklinikleri tarafından AML, ALL, Multipl Miyelom ve Lenfoma tanısı ile iki aylık periyotlarla takip edilen 41 AML hastasından, 42 ALL hastasından, 48 Multipl Miyelom hastasından, 44 Lenfoma hastasından oluşturuldu.

3.2. Örnek Toplama ve Analizlenen Parametreler

ALL, AML, Multipl Miyelom ve Lenfoma tanısı konmuş hasta gruplarından aspirasyon yöntemi ile alınan kemik iliği örnekleri EDTA'lı antikoagülanlı tüplere alındıktan sonra hematoloji laboratuvarında Pentra Dx Nexus cihazında yeterli miktarda alt üst edildikten sonra hücre sayımı yapıldı. WBC sayısı 40.000'nin üzerindeyse dilüe edilerek 40.000'nin altına çekildi. Gelen numunenin hastalık

paneline göre gerekli sayıda Trucount tüp alınarak üzerine hasta ismi ve örneğin tipi yazıldı. Gelen numuneye istenilen hastalık paneline göre Flow sitometre cihazında hücre sayımına hazır hale getirildi.

Gereçler:

1. Pentra DX Nexus Hematoloji Analizörü
2. BD FACS Canto II Flow Sitometre Cihazı
3. Mikropipetler
4. Pastör pipetleri
5. BD Falcon Cell strainer
6. Vortex
7. Santrifüj
8. Trucount tüp
9. Falkon Tüpü

Kimyasal maddeler:

1. FACS LYSİNG solüsyonu
2. Cell Wash Solüsyonu
3. CD20 Antikoru
4. CD10 Antikoru
5. CD22 Antikoru
6. CD19 Antikoru
7. CD34 Antikoru
8. CD45 Antikoru
9. TDT Antikoru
10. CD7 Antikoru
11. CD5 Antikoru
12. CDİgü
13. CD56 Antikoru
14. CDHLADR
15. CD38 Antikoru
16. CD9 Antikoru
17. CD4 Antikoru
18. CD117 Antikoru
19. CD3 Antikoru
20. CD8 Antikoru
21. CD1a Antikoru
22. CD2 Antikoru
23. KAPPA/LAMBDA/CD19
24. CD3/MPO/CD79a
25. CD13 Antikoru
26. CD33 Antikoru

3.3.Uygulanan Yöntemler

3.3.1. Akut Lenfositik Lösemi Paneli (ALL)

Yüzey Boyama Tekniği

- Gelen numune tipi (kemik iliği, periferik kan, vücut sıvısı, BOS vb.) belirlenir, kemik iliği örneği süzdürülür. Vücut sıvısı, BOS örneği santrifüj edilerek hücreler ayrıştırılır. Beyaz küre sayımı yapılır.
- Gerekli antikorlar belirlenir, hazırlanacak olan tüpler hasta adı ve içerisinde yer alan antikorlarla etiketlenir.
- Antikorlardan tabloda belirtilen miktarlarda tüplerin içine pipetlenir ve üzerine 100 µL hasta numunesi eklenir. Vortekslenir. 15-30 dk. oda ısısında, karanlıkta bekletilir.
- Süre sonunda vortekslenir, üzerine 2ml FACS LYSİNG solution (Lysin solution 50'lik falkona 1:10 dilüe edilerek hazırlanır) eklenir. Vortekslenir. 10 dk. oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- Süre sonunda tüpler santrifüjde 1300 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilir. Üstte kalan süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- Cell Wash eklenerek (2,5 ml) pelet hacmi yaklaşık 3 ml'ye tamamlanır. Vortekslenir. 1300 rpm.'de 5 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- Pelete 0,5 ml cell wash eklenir, vortekslenir. Örnek okumaya hazırdır.

Tablo 8. ALL Antikor Tablosu

ANTİKOR	RENK	MİKTAR
CD20	FITC	5 µL
CD10	PE	5 µL
CD22	PerCpCy5.5	5 µL
CD19	PeCY7	2,5 µL
CD34	APC	4 µL
CD45	APCH7	4 µL
TDT	FITC	5 µL
CD7	PE	5 µL
CD45	PERCP	5 µL
CD5	APC	4 µL
CDIgµ	FITC	5 µL
CD56	PE	5 µL
CDHLADR	APC	4 µL
CD38	APCH7	4 µL
CD9	APCH7	4 µL
CD4	FITC	5 µL
CD117	PE	5 µL
CD3	PeCy7	4 µL
CD8	APC	4 µL
CD1a	APC	4 µL
CD2	APCH7	4 µL
KAPPA/LAMBDA/CD19	MIX	5 µL
CD3/MPO/CD79a	MIX	5 µL
CD13	PerCpCy5.5-PE	5 µL
CD33	FITC	5 µL

3.3.2. Akut Myeloid Lösemi Paneli (AML P)

Yüzey Boyama Tekniği

- ❖ Gelen numune tipi (kemik iliği, periferik kan, vücut sıvısı, BOS vb.) belirlenir, kemik iliği örneği süzdürülür. Vücut sıvısı, BOS örneği santrifüj edilerek hücreler ayrıştırılır. Beyaz küre sayımı yapılır.
- ❖ Gerekli antikorlar belirlenir, hazırlanacak olan tüpler hasta adı ve içerisinde yer alan antikorlarla etiketlenir.
- ❖ Antikorlardan tabloda belirtilen miktarlarda tüplerin içine pipetlenir ve üzerine 100 µL hasta numunesi eklenir. Vortekslenir. 15-30 dk. Oda ısısında, karanlıkta bekletilir.

- ❖ Süre sonunda vortekslenir, üzerine 2ml FACS LYSİNG solution (Lysin solution 50'lik falkona 1:10 dilüe edilerek hazırlanır) eklenir. Vortekslenir. 10 dk. oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- ❖ Süre sonunda tüpler santrifüjde 1300 rpm.'de 5 dk.santrifüj edilir.Üstte kalan süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Cell Wash eklenerek (2,5 ml) pelet hacmi yaklaşık 3 ml'ye tamamlanır.Vortekslenir. 1300 rpm.'de 5 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Pelete 0,5 ml cell wash eklenir,vortekslenir. Örnek okumaya hazırdır.

Tablo 9. AML Antikor Tablosu

ANTİKOR	RENK	MİKTAR
HLADR	FITC	5 µL
CD117	PE	5 µL
CD13	PerCpCy5.5	5 µL
CD16	PeCY7	4 µL
CD34	APC	4 µL
CD45	APCH7	4 µL
CD15	FITC	5 µL
CD64	PE	5 µL
CD45	PERCP	5 µL
CD19	PeCY7	2,5 µL
CD10	APC	4 µL
CD33	FITC	6 µL
CD11b	PE	5 µL
CD56	PE	5 µL
CD3	PeCY7	4 µL
CD11c	APC	4 µL
CD38	APCH7	4 µL
CD20	FITC	5 µL
CD235a	FITC	5 µL
CD7	PE	5 µL
CD5	PERCPCy5.5	5µL
CD22	APC	4 µL
CD36	PE	5 µL
CD71	APC	4 µL
CD45/GLYA/41a	MIX	5 µL
CD4	FITC	5 µL
CD3/MPO/CD79a	MIX	5 µL

3.3.3. Multipl Miyelom Paneli (MMP)

Yüzey Boyama Tekniği

- ❖ Gelen numune tipi (kemik iliği, periferik kan, vücut sıvısı, BOS vb.) belirlenir, kemik iliği örneği süzdürülür. Vücut sıvısı, BOS örneği santrifüj edilerek hücreler ayrıştırılır. Beyaz küre sayımı yapılır.
- ❖ Gerekli antikorlar belirlenir, hazırlanacak olan tüpler hasta adı ve içerisinde yer alan antikorlarla etiketlenir.
- ❖ Antikorlardan tabloda belirtilen miktarlarda tüplerin içine pipetlenir ve üzerine 100 µL hasta numunesi eklenir. Vortekslenir. 15-30 dk. Oda ısısında, karanlıkta bekletilir.
- ❖ Süre sonunda vortekslenir. üzerine 2ml FACS LYSİNG solution (Lysin solution 50'lik falkona 1:10 dilüe edilerek hazırlanır) eklenir. Vortekslenir. 10 dk. oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- ❖ Süre sonunda tüpler santrifüjde 1300 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilir. Üstte kalan süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Cell Wash eklenerek (2,5 ml) pelet hacmi yaklaşık 3 ml'ye tamamlanır. Vortekslenir. 1300 rpm.'de 5 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Pelete 0,5 ml cell wash eklenir, vortekslenir. Örnek okumaya hazırdır.

Tablo 10. Multiple Myelom Antikor Tablosu

ANTİKOR	RENK	MİKTAR
CD117	PE	5 µL
CD45	PERCP	5 µL
CD19	PE	5 µL
CD33	PeCY7	2,5 µL
CD56	FITC	6 µL
CD38	APCH7	4 µL
CD20	APC	4 µL
CD138	APC	4 µL
CD81	PE	5 µL
CD27	PERCP	5 µL
CD28	APC	4 µL

3.3.4. Lenfoma

Yüzey Boyama Tekniği

- ❖ Gelen numune tipi (kemik iliği, periferik kan, vücut sıvısı, BOS vb.) belirlenir, kemik iliği örneği süzdürölür. Vücut sıvısı, BOS örneği santrifüj edilerek hücreler ayrıştırılır. Beyaz küre sayımı yapılır.
- ❖ Gerekli antikorlar belirlenir, hazırlanacak olan tüpler hasta adı ve içerisinde yer alan antikorlarla etiketlenir.
- ❖ Antikorlardan tabloda belirtilen miktarlarda tüplerin içine pipetlenir ve üzerine 100 µL hasta numunesi eklenir. Vortekslenir. 15-30 dk. Oda ısısında, karanlıkta bekletilir.
- ❖ Süre sonunda vortekslenir. üzerine 2ml FACS LYSİNG solution (Lysin solution 50'lik falkona 1:10 dilüe edilerek hazırlanır) eklenir. Vortekslenir. 10 dk. oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- ❖ Süre sonunda tüpler santrifüjde 1300 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilir. Üstte kalan süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Cell Wash eklenerek (2,5 ml) pelet hacmi yaklaşık 3 ml'ye tamamlanır. Vortekslenir. 1300 rpm.'de 5 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Pelete 0,5 ml cell wash eklenir, vortekslenir. Örnek okumaya hazırdır.

AYNI TÜPTE YÜZEY ve HÜCRE İÇİ BOYAMA TEKNİĞİ

- ❖ Tüpün içerisindeki yüzey ve hücre içi boyanan antikorlar etiketlenir. Önce yüzey antikorları belirtilen miktarda tüpün içerisine pipetlenir. Üzerine 100 ml hasta numunesi konur. Vortekslenir. 15-30 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilir. Vortekslenir.
- ❖ Süre sonunda 2 ml FACS LYSING (Lysing Solution 1:10 dilüe edilerek hazırlanır) solution eklenir. Vortekslenir, 10 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilir. 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Üstte kalan süpernatant atılır, dipteki pelet vortekslenir.
- ❖ Pelet üzerine 2,5 ml Cell Wash eklenerek pelet hacmi 3 ml'ye tamamlanır. Vortekslenir, 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Üstteki süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Pelet üzerine 0,5 ml FACS Permeabilizing (perm solution 1:10 dilüe edilerek hazırlanır) pelet üzerine eklenir. Vortekslenir, 10 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilir. Vortekslenir, üzerine 2,5 ml Cell Wash eklenerek hacim 3 ml'ye tamamlanır. Vortekslenir, 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Süpernatant atılır, pelet vortekslenir.
- ❖ Pelet üzerine hücre içi boyanacak olan antikorlardan belirtilen miktarda eklenerek vortekslenir. 20-30 dk arasında oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- ❖ Süre sonunda vortekslenir. Üzerine 2-3 ml Cell Wash eklenir, vortekslenir. 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Süpernatant atılır pelet vortekslenir. Pelet üzerine 0,5 ml Cell Wash eklenir, vortekslenir. Örnek okuma için hazırdır.

Tablo 11. Lenfoma Antikor Tablosu

ANTİKOR	RENK	MİKTAR
FMC7	FITCH	5 µL
CD5	APC	4 µL
CD20	FITC	5µL
CD22	PE	5 µL
CD79b	PerCPCy5.5	5 µL
CD43	FITCH	5 µL
CD19	PeCY7	2.5 µL
CD200	PE	5 µL
CD10	APC	4 µL
CD38	APCH7	4 µL
CD15	FITC	5 µL
CD25	PeCY7	4 µL
CD30	PE	5 µL
HLADR	APC	4 µL
CD56	PE	5 µL
CD103	FITC	5 µL
CD11c	APC	4 µL
CD3	PERCP	4 µL
CD4	FITC	5 µL
CD8	APC	4 µL
CD2	APCH7	4 µL
CD7	PeCY7	4 µL
CD45	APCH7	4 µL
CD23	PE	5 µL
CD16	PeCY7	4 µL
CD36	PE	5 µL
CD38	APCH7	4 µL
CD123	PeRCP	4 µL

3.4. Metot Validasyon Parametreleri

CLSI dökümanları artık validasyon yapmamızı istemediği için bizde cihaz validasyon bilgilerine göre firma tarafından verilen bilgilere göre hemogram cihazının verifikasyonunu yaptık.

3.4.1.Doğrusallık (Linearite)

CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) H26-A2 protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen metot validasyonu, kalibrasyon grafiği çizmek ve analitik ölçüm aralığını belirlemek için yapılmıştır.

Bu çalışmada sağlıklı bir kişiden 2 tane 10 mL’lik EDTA’lı tüpe kan alındıktan sonra 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan iki fazdan üstteki Plazma fazı LCS (Low Cell Stock) olarak ayrıldı. (LCS için PBS’de kullanılabilir). Alttaki hücrelerin bulunduğu faz ise HCS (High Cell Stock) olarak ayrıldı. Aşağıdaki tabloya göre farklı konantrasyonlarda 6 havuz oluşturulup 2’şer defa çalışıldı.

Tablo 12. RBC, Hb, HCT Şeması (HCS: Yüksek Sayılı Hücre Stoğu LCS: Düşük Sayılı Hücre Stoğu)

RBC, Hb, HCT, PLT Manipülasyon Tablosu			
Tüp No	Konsantrasyon (%)	HCS (µl)	LCS (µl)
1	100	1000	0
2	95	950	50
3	80	800	200
4	10	100	900
5	5	50	950
6	0	0	1000 µl LCS'nin içine 1 damla tam

Doğrusallık (Linearite) çalışması WBC ve Plt için ayrı bir prosedür uygulanarak yapılır.

WBC için doğrusallık çalışması, sağlıklı bir kişiden 2 tane 10 mL’lik EDTA’lı tüpe kan alındıktan sonra 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan iki fazdan üstteki Plazma fazı LCS (Low Cell Stock) olarak ayrıldı. (LCS için PBS’de kullanılabilir). Alttaki hücrelerin bulunduğu faz ise HCS (High Cell Stock) olarak ayrıldı. Aşağıdaki tabloya göre farklı konantrasyonlarda 6 havuz oluşturulup 2’şer defa çalışıldı.

Tablo 13. WBC Manipölasyon Tablosu

WBC Manipölasyon Tablosu			
Tüp No	Konsantrasyon (%)	HCS (µl)	LCS (µl)
1	100	1000	0
2	90	950	50
3	80	800	200
4	60	600	400
5	2,5	12,5	987,5
6	0	0	1000 µl LCS'nin içine 2 damla tam

Plt için doğrusalılık çalışması, sağlıklı bir kişiden 2 tane 10 mL'lik EDTA'lı tüpe kan alınır, alınan bu kanlar 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüjden sonra iki tüpten üst fazdaki plazmalar başka temiz boş bir tüpe aktarılır. Plazmaları aktardığımız tüp tekrar 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüjden sonra oluşan iki fazdan üstteki plazma fazı yaklaşık 5 mL başka bir tüpe LCS (Low Cell Stock) olarak kullanmak için ayrılır. Altteki plazma fazı ise HCS (High Stock Cell) olarak kullanmak için ayrılır. Cihaza okutulmadan Plt'ler tüp cidarına yapıştığından dolayı önce vortekslenmeli veya alt üst edilerek karıştırılmalıdır. Aşağıdaki tabloya göre farklı konsantrasyonlarda 6 havuz oluşturulup 2'şer defa çalışılıp, veriler kaydedilir.

Tablo 14. RBC, Hb, HCT, PLT Manipölasyon Tablosu

RBC, Hb, HCT, PLT Manipölasyon Tablosu			
Tüp No	Konsantrasyon (%)	HCS (µl)	LCS (µl)
1	100	1000	0
2	95	950	50
3	80	800	200
4	10	100	900
5	5	50	950
6	0	0	1000 µl LCS'nin içine bir damla tam

3.4.2. LOB/LOD (WBC, Hb, Plt Parametreleri için)

NCCSL (National Committee for Clinical Laboratory Standards) EP 17 dökümanı, iddia edilen limitleri doğrulamak ve limitlerin doğru kullanımı ve yorumlanması için klinik laboratuvar yöntemlerinin tespit edilmesinin alt sınırını belirlemek için tavsiyeleri belirler. Aynı zamanda, bir laboratuvarın düşük seviyedeki performans hedeflerine dayanarak daha düşük kantitatif limitleri belirlemek için kılavuzluk sağlar.

Pentra DX Nexus cihazı için: LOB (Limit of Blank) olarak cihazın dilüentinden 5 sample (örnek) hazırlandı. Low Level olarak ta cihazın kontrollerinden en düşük olandan 5 örnek hazırlanıp, 3 gün boyunca 5 örnek her gün 4'er defa tekrarlandı. 3 gün boyunca çalışılacak kontroller aynı LOT numarasına sahip olacak şekilde çalışılıp veriler kaydedildi.

3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Precision)

CLSI EP5-A protokülüne uygun olarak tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Pentra DX Nexus cihazının düşük seviye, normal seviye ve yüksek seviye kontrolleri kullanıldı. Cihazın kontrol numuneleri günlük sabah 2 ve akşam 2 kere olmak üzere 20 gün boyunca çalışıldı. 20 gün boyunca aynı lot kontrol numuneleri kullanıldı.

3.4.3.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik

CLSI EP5-A protokülüne uygun olarak tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Gün içi tekrarlanabilirlik için sağlıklı bir kişiden 10mL EDTA'lı kan numunesi alındı. Art arda, araya herhangi bir farklı çalışma girmeden 31 defa cihazda okutuldu. Çalışma veri sonuçları kaydedildi.

3.4.4. Carry Over

CLSI EP10-A3 potokolüne uygun olarak carry over çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, sağlıklı bir kişiden EDTA'lı Mor kapaklı tüpe 3 defa sayım yapacak kadar kan alınmalı (gelen taze numunelerden, değerleri aşağıdaki tabloda belirtilen değerlere yakın olanlardan da seçilebilir). Kanın plazmasını bekleyerek çökmesi beklenir veya 1500 rpm de 5 dk santrifüjlenir.

Suggested Carryover Specimen Values		
Measurand	HTV ^h	LTV
WBC ($\times 10^9/L$)	> 90	> 0 and < 3
RBC ($\times 10^{12}/L$)	> 6.20	> 0 and < 1.50
Hb (g/dL [g/L])	> 22.0 (220)	> 0 and < 5.0 (50)
PLT ($\times 10^9/L$)	> 900	> 0 and < 30

Şekil 10. Carryover Önerilen Örnek Verileri

3.5.Üreticiye Ait Performans Özellikleri

Kemik iliği numunelerinde immatur hücrelerin sayımında kullanılan flowsitometri ve Pentra DX Nexus hematoloji analizörün ölçüm yöntemleri aşağıda gösterilmiştir.

- RBC, PLT = Impedance
- WBC, BAS = Impedance
- LYM, MON, NEU, EOS, ALY, LIC, IML, IMM, IMG = Impedance and absorbance
- HGB = Photometry
- HCT, MCH, MCHC, RDW, PDW, PCT, CRC, MRV, CWBC, RHCc = Calculation
- MCV, MPV = Measurement
- RET = Impedance and fluorescence
- ERB = Impedance and fluorescence

3.5.1 Pentra DX Nexus Tekrarlanabilirlik (Precision)

Pentra DX Nexus hematoloji analizörün performans akreditasyon araçları "belgesinde, elde edilen veri sonuçları da dâhil olmak üzere analizörün kalite yönetimi, teknik gereklilikler ve performansıyla ilgili gerekli referanslara aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Kontrol kanında kabul edilebilir CV sınırları (ABX Diffrol):

Tablo 15. Pentra DX Nexus Kabul Edilebilir CV Sınırları Tablosu

Parameters	Low level	Normal level	High level
WBC	< 5%	< 4%	< 3%
RBC	< 2.5%	< 2%	< 2%
HGB	< 2.5%	< 2%	< 2%
Plt	<15%	< 8%	< 6%

Kontrol kanlarının beyaz kan hücresi sayımı, insan kanından farklı olduğu için, karşılaştırılabilir ve tekrar üretilebilir koşullar altında, aynı gün on kez insan kanı ile spesifik bir CV hesaplandı. Elde edilen varyasyon katsayıları aşağıdaki gibidir.

Tablo 16. Pentra DX Nexus Ortalama CV (insan)

Parameters	Level	CV
LYM%	28.96%	2.93%
MON%	8.29%	6.90%
NEU%	57.27%	1.97%
EOS%	3.18%	10.28%
BAS%	2.31%	19.61%

3.5.2. Tekrarlanabilirlik için Değerlendirme Protokolü (Gün içi Tekrarlanabilirlik):

Bu kesinlik çalışması, değerleri laboratuvar için normal referans aralığını geçmeyen normal taze kan kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı kan tüpünün ardışık 31 defa aspirasyonu kullanıldı; daha küçük örnek boyutları daha az istenen daha geniş güven aralıkları sağlar. Toplam en az 12 çalışma için en az üç Test AutomatedAnalyzers (TAA) 'in her biri için en az dört imprecisyon çalışması yapılır.

Tablo 17. Pentra DX Gün İçi Tekrarlanabilirlik Tablosu

Parameters	Specifications	Level of analysis
WBC	< 2 %	4 - 10 x 10 ³ /mm ³
RBC	< 2 %	3.6 - 6.2 x 10 ⁶ /mm ³
HGB	< 1 %	12 - 18 g/dL
HCT	< 2 %	36 - 54 %
Plt	< 1 %	80 - 100 fL

3.5.3 Analitik Ölçüm Aralığı (Linearite)

Doğrusallık, analitik bir işlemin, kendisiyle orantılı bir ölçüm sağlama yeteneğidir (analit), belirli bir konsantrasyon aralığında ölçülür.

Tablo 18. Pentra DX Nexus Analitik Ölçüm Aralığı

Parameter	Linearity limits	Visible Range	Error limits (CLIA '88)
WBC (10 ³ /µL)	0 - 150	150 - 180	± 0.3 or ± 15%
RBC (10 ⁶ /µL)	0 - 8	8 - 18	± 0.07 or ± 6%
HGB (g/dL)	0 - 24	24 - 30	± 0.2 or ± 7%
HCT (%)	0 - 67	67 - 80	± 2 or ± 2%
PLT (10 ³ /µL)	HGB > 2g/dL: 0 - 1900	1900 - 2800	± 7 or ± 25%
	HGB < 2g/dL: 0 - 2800	2800 - 3200	

3.5.4. Numuneler Arasında Kontaminasyon

Kontaminasyon, aşağıdaki parametreler için yüksek sonuçlara sahip bir numunenin, arka arkaya üç defa (H1, H2, H3), ardından düşük sonuçlara sahip bir numunenin, ayrıca ard arda 3 kez (L1, L2, L3) çalıştırılmasıyla değerlendirildi.

$$\text{Carry-over (\%)} = \frac{(L1 - L3)}{(H3 - L3)} \times 100$$

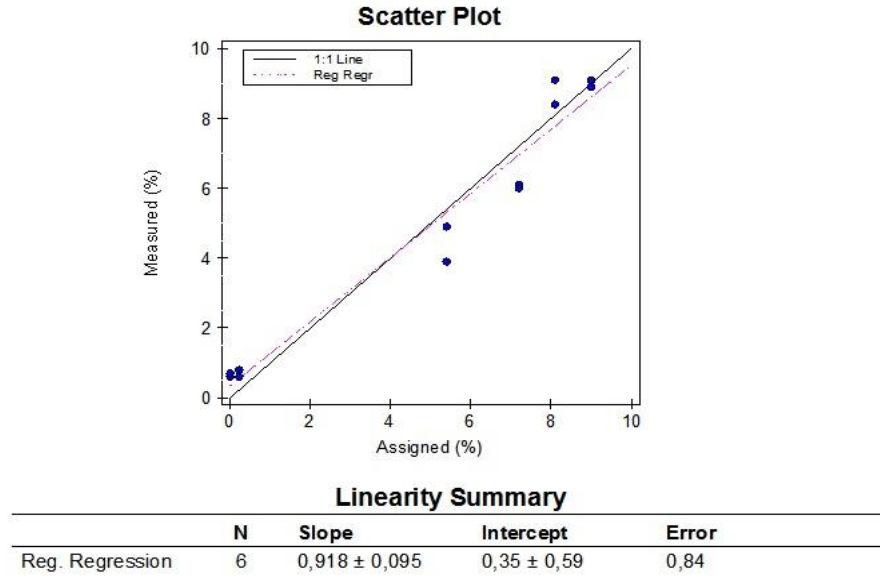
	WBC (10 ³ /mm ³)	RBC (10 ⁶ /mm ³)	HGB (g/dL)	PLT (10 ³ /mm ³)
Mean concentration of the lower level	0.76	1.68	4.83	43
Mean concentration of the upper level	46.5	7.89	20.99	554

Şekil 11. Carryover Performans Veri Tablosu

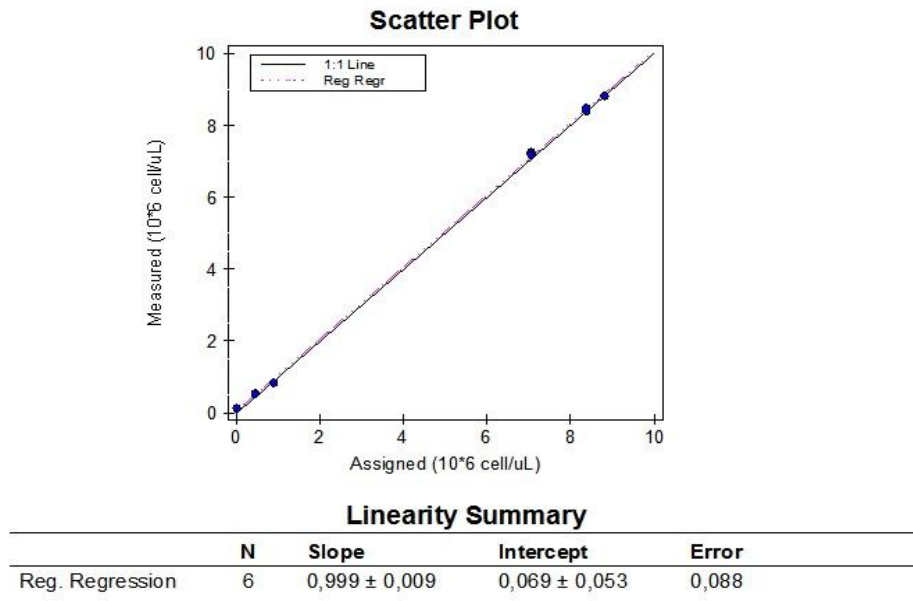
4. BULGULAR

4.1.Doğrusallık (Linearite)

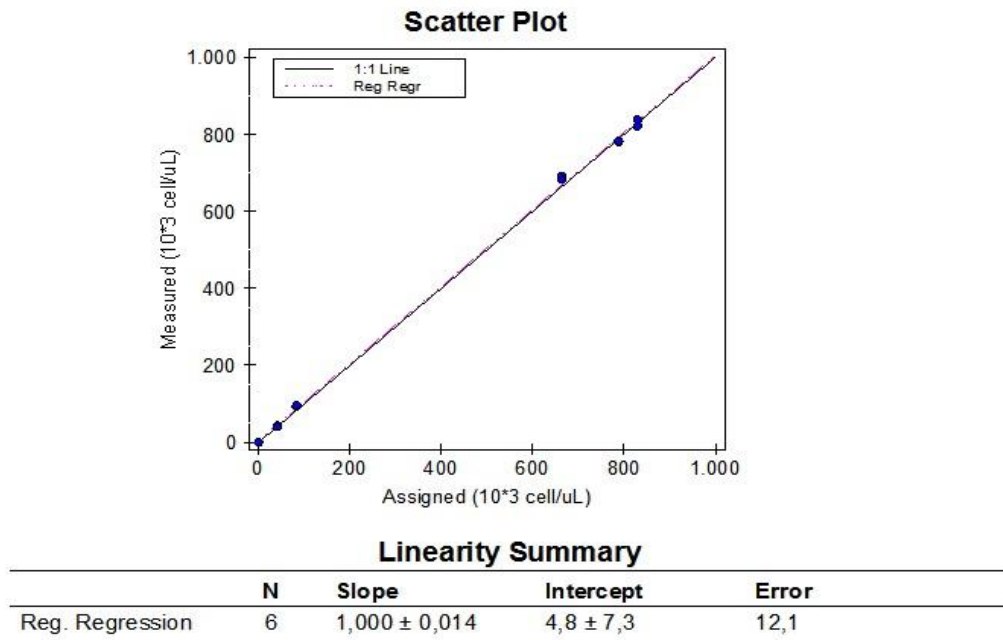
CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) H26-A2 protokolüne uygun olarak RBC, WBC, Plt, Hb için gerçekleştirilen metot validasyon verileri EP Evaluator programında işlenerek elde edilen grafikler aşağıda gösterilmiştir.



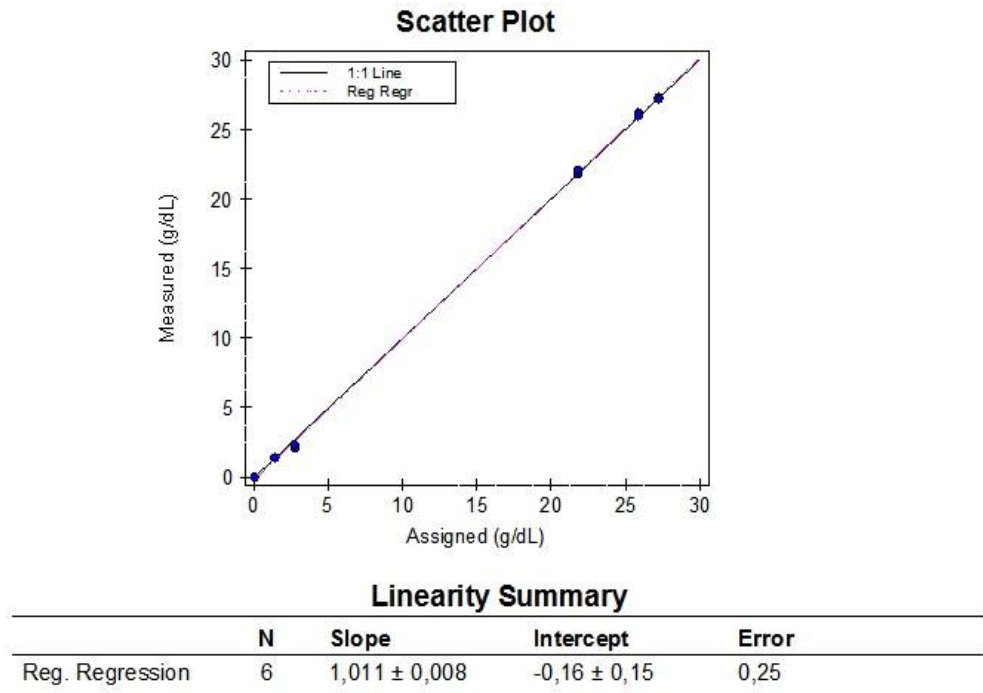
Şekil 11. WBC Linearite Grafiği



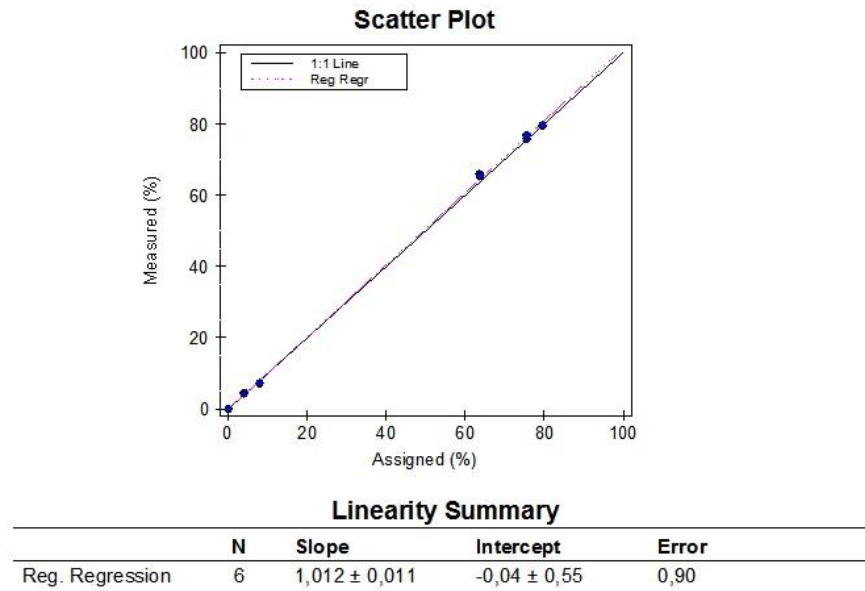
Şekil 12. Rbc Linearite Grafiği



Şekil 13. Plt Linearite Grafiği



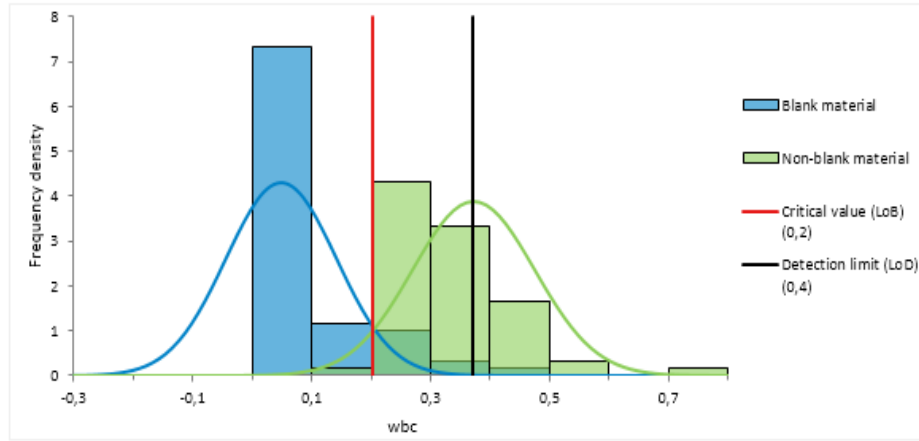
Şekil 14. Hb Linearite Grafiği



Şekil 15. HCT Linearite Grafiği

4.2. LOB/LOD (WBC, Hb, Plt Parametreleri için)

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 17 dökümanında yer alan protoküle uygun olarak ölçülen ve elde edilen veriler Analyse-İt programında işlenerek elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir.



Şekil 16. Wbc LOB/LOD Grafiği

Tablo 19. WBC- LOB/LOD Tablosu

WBC- LOB/LOD Tablosu					
Blank material	N	Mean	SD	Alpha	Critical Value (LoB)
	60	0,05	0,09	5%	0,2
Low control material	N	Pooled SD	Beta	Detection Limit (LoD)	
	60	0,1	5%	0,4	

Tablo 20. Plt- LOB/LOD Tablosu

Detection Capability					
Detection Decision					
	N	Mean	SD	Alpha	Critical Value (LoB)
Blank material	60	0	0	5%	0
Detection Limit					
	N	Pooled SD	Beta	Detection Limit (LoD)	
Non-blank material	60	4	5%	7	

Tablo 21. Hb- LOB/LOD Tablosu

Detection Capability					
Detection Decision					
	N	Mean	SD	Alpha	Critical Value (LoB)
Blank material	60	0	0	5%	0
Detection Limit					
	N	Pooled SD	Beta	Detection Limit (LoD)	
Non-blank material	60	0,1	5%	0,2	

4.3. Tekrarlanabilirlik (Precision)

CLSI EP5-A protokülüne uygun olarak tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Elde edilen veriler EP Evaluator programında işlenerek aşağıdaki grafikler elde edildi.

Tablo 22. WBC, Rbc Hb Plt İçin Tekrarlanabilirlik Tabloları

Hb İçin Tekrarlanabilirlik					
Normal HB		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	0,07	0,14	0,128	0,16
	% CV	0,84	1,79	0,95	1,89
	df	40	--		80
Düşük HB		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	0,11	0,24	0,061	0,27
	% CV	1,1	2,04	0,90	2,03
	df	40	--		57
Yüksek HB		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	0,3	0,18	0,144	0,35
	% CV	1,8	1,1	1,12	2,11
	df	40	--		82

HCT İçin Tekrarlanabilirlik					
Normal HCT		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	0,25	0,28	0,707	0,8
	% CV	0,64	0,74	1,85	2,09
	df	40	--		25
Düşük HCT	Std. Dev	0,24	0,31	0,308	0,5
	% CV	1,21	1,52	1,53	2,47
	df	40	--		41
Yüksek HCT	Std. Dev	0,46	0,61	0,790	1,1
	% CV	1	1,3	1,69	2,35
	df	40	--		35

Plt İçin Tekrarlanabilirlik					
Normal Plt		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	7	6,5	5,004	9,6
	% CV	2,7	2,5	-11,16	3,56
	df	40	--	--	81

Düşük Plt	Std. Dev	3,6	2,35	1,7	4
	% CV	5,09	-6,11	2,44	5,36
	df	40	--	--	87

Yüksek Plt	Std. Dev	8,4	7,4	5,1	12,3
	% CV	1,69	1,49	1,01	2,47
	df	40	--	--	58

RBC İçin Tekrarlanabilirlik					
Normal RBC		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	0,10	0,11	0,10	0,10
	% CV	0,55	0,80	2,08	2,30
	df	40	--		79

Düşük RBC	Std. Dev	0,03	0,03	0,05	0,06
	% CV	1,2	1,23	1,96	2,61
	df	40	--		34

Yüksek RBC	Std. Dev	0,06	0,07	0,1	0,14
	% CV	1,22	1,37	1,91	2,65
	df	40	--		36

WBC İin Tekrarlanabilirlik					
Normal WBC		Within Run	Between Run	Between Day	Total
	Std. Dev	0,16	0,14	0,21	0,3
	% CV	2,04	1,81	2,98	4,04
	df	38	--	--	36

Düşük WBC	Std. Dev	0,09	0,06	0,08	0,13
	% CV	3,61	2,49	2,99	5,29
	df	40	--	--	52

Yüksek WBC	Std. Dev	0,03	0,43	0,5	0,73
	% CV	1,72	2,31	2,67	3,93
	df	40	--	--	37

Tablo 23. Hb Gün İçi Tekrarlanabilirlik

Hb Gün İçi Tekrarlanabilirlik		
	Düşük Değerler	Normal Değerler
Mean	6,99 g/dL	14,89
Standard Deviation (SD)	0,06	0,12
95% Confidence for SD	0,05 to 0,08	0,10 to 0,16
Coefficient of Variation (CV)	0,90%	0,80%

Tablo 24. Wbc Gün İçi Tekrarlanabilirlik Tablosu

Wbc Gün İçi Tekrarlanabilirlik		
	Düşük Değerler	Normal Değerler
Mean	0,29 10*3 cell/uL	5,55 10*3 cell/uL
Standard Deviation (SD)	0,07	0,09
95% Confidence for SD	0,06 to 0,09	0,07 to 0,12
Coefficient of Variation (CV)	24,10%	1,60%

Tablo 25. Plt Gün İçi Tekrarlanabilirlik Tablosu

Plt Gün İçi Tekrarlanabilirlik		
	Düşük Değerler	Normal Değerler
Mean	44,7 10*3 cell/uL	272,6 10*3 cell/uL
Standard Deviation (SD)	2,2	9,3
95 % Confidence for SD	1,7 to 2,9	7,5 to 12,5
Coefficient of Variation (CV)	4,90%	3,40%

4.4. Carry Over

CLSI EP10-A3 potokolüne uygun olarak carry over çalışması yapılmıştır. Elde edile veriler formülle hesaplanarak veriler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

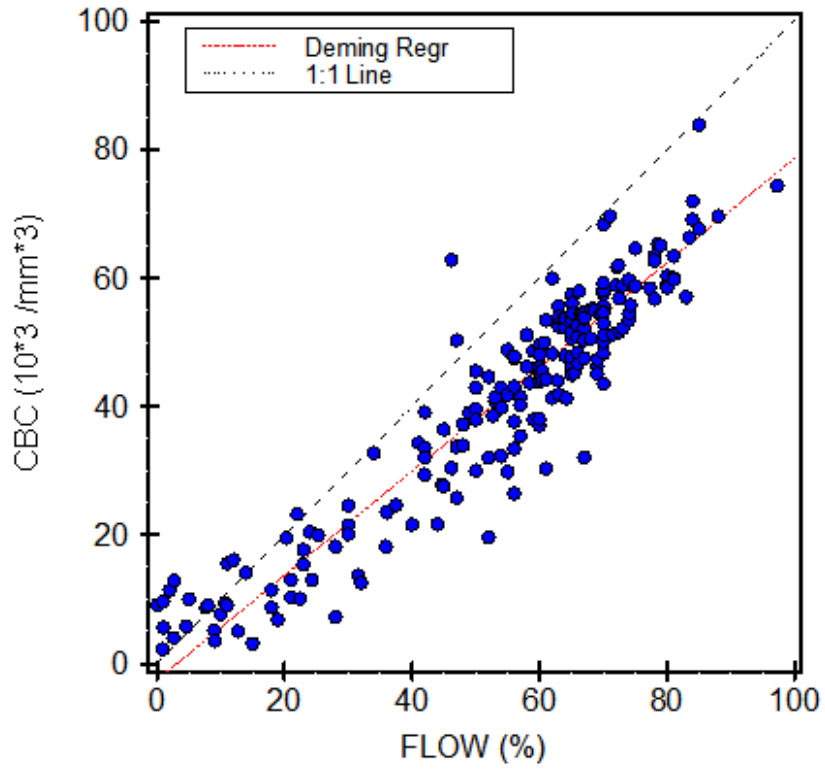
Tablo 26. Carryover Veri Tablosu

%Carryover	Sonuç
WBC	0
RBC	0,298954
Hb	-0,98039
Plt	-0,43898

$$\%Carryover = \frac{(LTV1 - LTV3)}{(HTV3 - LTV3)} \times 100$$

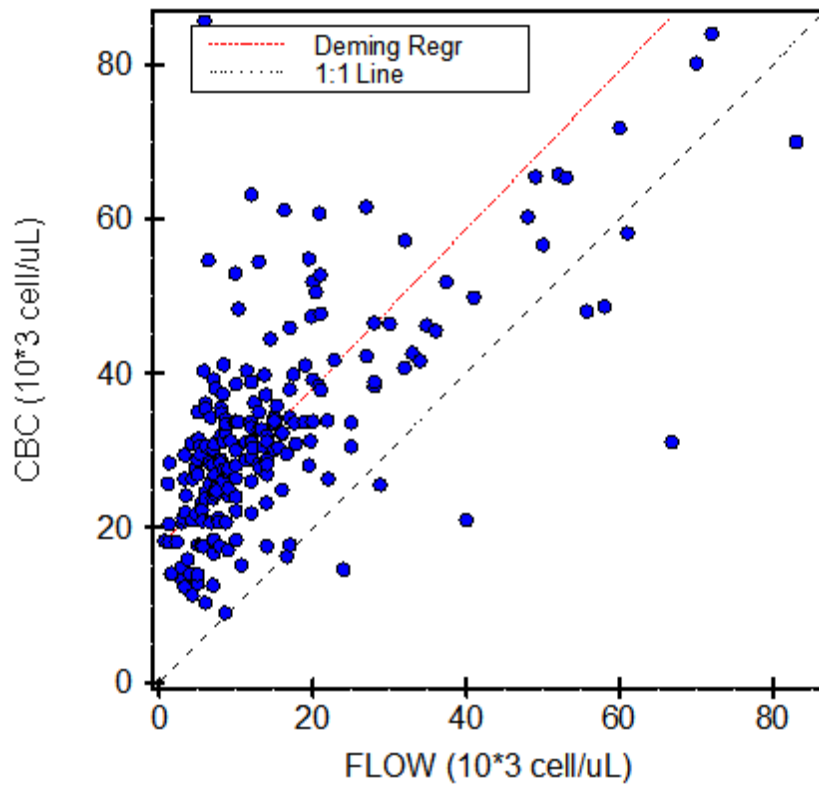
4.5. Karşılaştırma Verileri

Hastalardan alınan kemik iliği örneklerinin Flow Sitometri çalışma sonuçları ve Tam kan sayım sonuçları karşılaştırıldı. Elde edilen veriler aşağıdaki tablolarda gösterildi.



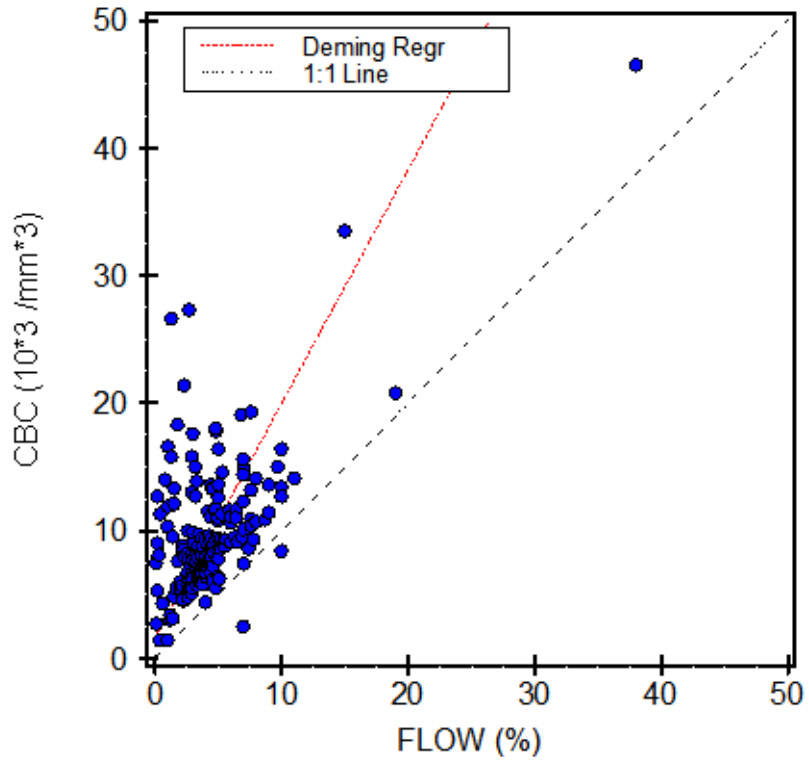
Şekil 17. %Nötrofil (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,811 (0,772 to 0,851)
Intercept:	2,52 (-4,83 to -0,21)
Std Err Est:	6,38
Corr Coef (R):	0,9382



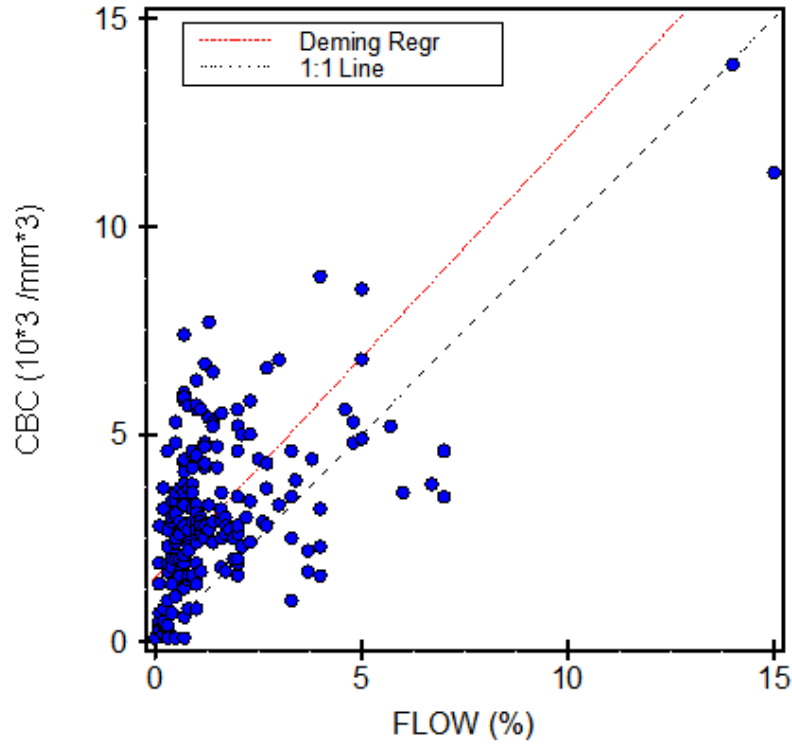
Şekil 18. %LYM (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	1,027 (0,914 to 1,141)
Intercept:	17,57 (15,17 to 19,97)
Std Err Est:	11,9
Corr Coef (R):	0,6771



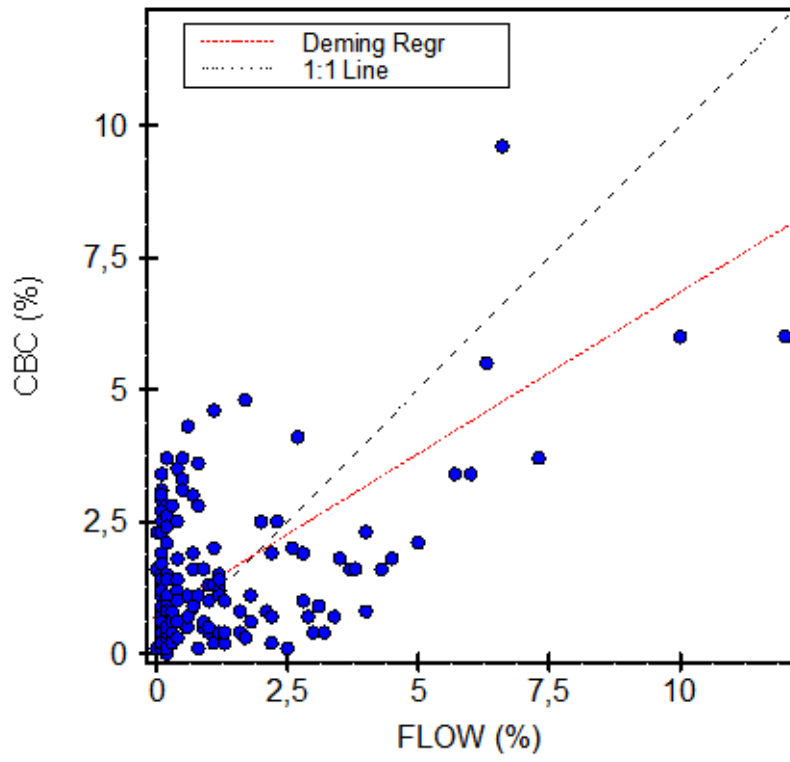
Şekil 19. %Monosit (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	1,833 (1,621 to 2,045)
Intercept:	1,64 (0,45 to 2,83)
Std Err Est:	5,22
Corr Coef (R):	0,6165



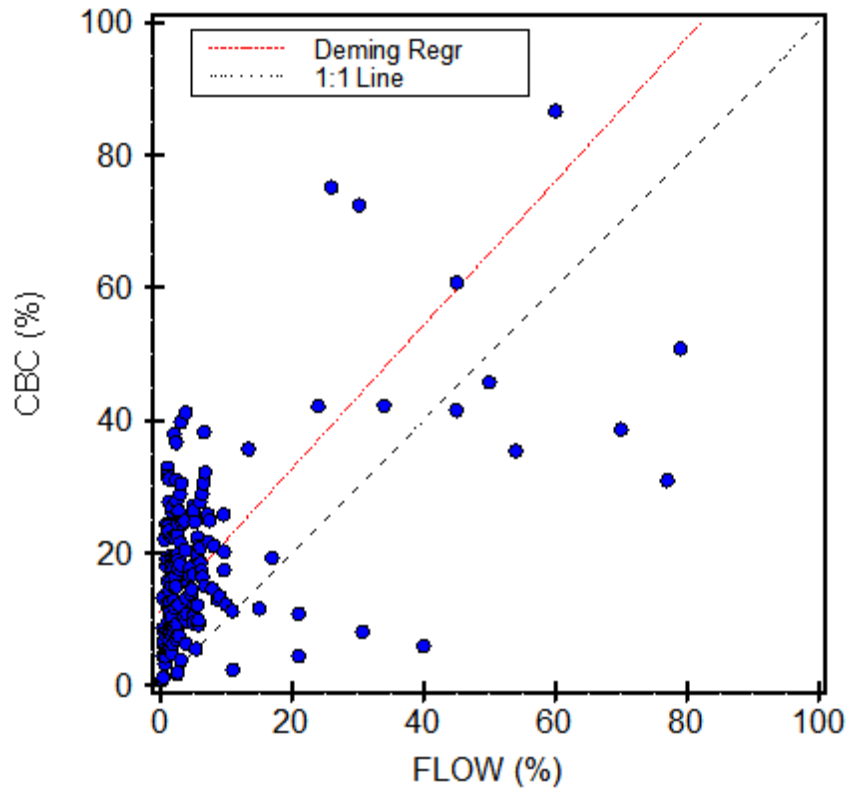
Şekil 20. %Eozinofil (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	1,060 (0,923 to 1,197)
Intercept:	1,548 (1,208 to 1,888)
Std Err Est:	1,842
Corr Coef (R):	0,5762



Şekil 21. %IML(flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,612 (0,503 to 0,721)
Intercept:	0,727 (0,491 to 0,964)
Std Err Est:	1,275
Corr Coef (R):	0,5158



Şekil 22. %LIC (flow-CBC) Karşılaştırma Grafiği

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	1,082 (0,928 to 1,237)
Intercept:	11,09 (8,61 to 13,57)
Std Err Est:	13,95
Corr Coef (R):	0,5675

Tablo 27. %CD34(flow)-%ALY(cbc) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,675 (0,542 to 0,809)
Intercept:	0,04 (-0,22 to 0,30)
Std Err Est:	1,45
Corr Coef (R):	0,3239

Tablo 28. %CD34(flow)- %İML(cbc) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,821 (0,639 to 1,002)
Intercept:	-0,05 (-0,27 to 0,16)
Std Err Est:	0,97
Corr Coef (R):	0,249

Tablo 29. %CD34(flow)-%İMM(cbc) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	1,141 (0,940 to 1,343)
Intercept:	-0,07 (-0,28 to 0,15)
Std Err Est:	0,95
Corr Coef (R):	0,3944

Tablo 30. %CD34(flow)-%LİC(cbc) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	3,927 (3,256 to 4,598)
Intercept:	-1,18 (-2,12 to -0,24)
Std Err Est:	4,16
Corr Coef (R):	0,2924

Tablo 31. %IMG (flow-CBC) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	3,563 (3,021 to 4,106)
Intercept:	5,08 (3,01 to 7,14)
Std Err Est:	12,12
Corr Coef (R):	0,3327

Tablo 32. Karşılaştırma Verileri Tablosu

Flow Sitometre	CBC	Korelasyon Katsayıları
NÖTROFİL	NÖTROFİL	0,939
MONOSİT	MONOSİT	0,616
LYM	LYM	0,677
IMG	ALY	0,674
IML	IML	0,515
LIC	LIC	0,567
CD34	ALY	0,620
CD34	IMM	0,394
CD34	IML	0,249
CD34	LIC	0,292

4.6. LIC Değeri %5'in Üstünde Olan Hastalar İçin Karşılaştırma Verileri

Tablo 33. LIC Değeri %5'in Üstünde Olan Hastalar İçin Karşılaştırma Verileri

Deming Regresyon Analizi Korelasyon Katsayıları		
	Toplam Hasta(LIC %2-%41) n=152	LIC>%5 n=44
CD34-ALY	0,2094	0,6206
İMM-ALY	0,1411	0,398
İMG-ALY	0,2545	0,6741

Tablo 34. %CD34(flow)-%ALY(CBC) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,398 (0,261 to 0,535)
Intercept:	1,33 (0,93 to 1,73)
Std Err Est:	0,90
Corr Coef (R):	0,6206

Tablo 35. %IMG(flow)-%ALY(CBC) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,644 (0,463 to 0,824)
Intercept:	1,34 (0,99 to 1,69)
Std Err Est:	0,87
Corr Coef (R):	0,6741

Tablo 36. %IMM(flow)-%ALY(CBC) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	0,113 (0,035 to 0,192)
Intercept:	2,03 (1,69 to 2,37)
Std Err Est:	1,04
Corr Coef (R):	0,3980

Tablo 37. %LIC(flow-CBC) Karşılaştırma Tablosu

Deming Regresyon Analizi	
Slope:	2,424 (1,679 to 3,170)
Intercept:	-1,64 (-12,17 to 8,90)
Std Err Est:	24,65
Corr Coef (R):	0,3569

Tablo 38. Lösemi Altgruplarının Tam Kan Sayımı Verileri

	Akut Lenfoblastik Lösemi	Akute Miyeloid Lösemi	Multiple Miyelom	Lenfoma
Parameter (unit of measure)	[median (min- max)]	[median (min- max)]	[median (min- max)]	[median (min-max)]
WBC (10 ⁹ /L)	30 (1-147)	39 (1-350)	22 (2-70)	39 (3-107)
RBC (10 ¹² /L)	3,37 (1,9-5,3)	3,2 (1,8-4,7)	3,5 (0,4-5,6)	4,61 (0,6-30,8)
HGB (g/L)	10 (6-16)	10 (5-15) ^{a*}	10 (0-16)	13 (2-93)
HCT (L/L)	31(16-46)	30 (15-45)	35(4-137)	36(6-56)
MCH (pg)	30(25-39)	29 (0-38)	29(0-38)	35(21-348)
MCHC (g/L)	33(30-40)	32 (0-35)	31(0-36)	32(29-35)
MCV (fL)	91(8-120)	109 (74-890)	93(71-112)	88(66-109)
RDW (%)	15(10-23)	18 (11-161)	15(11-20)	16(12-25)
PLT (10 ⁹ /L)	121(14-588)	116 (15-494) ^{a*}	147(21-386)	162(19-370)
MPV (fL)	8,41(6,5-10,8)	9,25 (1,3-65)	8,26(6,3-10,4)	8,17(0,2-9,7)
Neutrophils (%)	34(2-69) ^{a***b***}	31 (2-70) ^{a***b***}	48(20-65)	48(4-84)
Lymphocytes (%)	43(12-86) ^{a***b***c*}	34 (9-82)	30(16-52)	31(10-84)
Monocytes (%)	12(1-47) ^{c*}	18 (3-71) ^{a***b***}	10(4-50)	9(1-27)
Eosinophils (%)	3,19(0-13,9)	3,41 (0-11,5)	4,56(1,5-30)	4,11(0,5-37)
Basophils (%)	8,58(2,5-34,8) ^{c*}	11,94 (2,8-40,5) ^{a*b**}	7,65(1,5-23,2)	7,98(1,2-34,1)
LİC(Large immature cells) (%)	16 (2-41) ^{c***}	28 (1-93)	21(3-61)	23(1-59)
ALY (%)	4,38(0-33,1) ^{b**}	2,98(0-11)	1,66(0,4-8,8)	3,16(0,3-16,2)
IML (%)	2,11(0-18,7)	2,49(0-15,3)	1,18(0-6,4)	2(0-6,6)
IMM (%)	3,8(0,3-20,8) ^{c***}	11,21(0-55,7) ^{a*}	7,93(0,2-61)	5,45(0,1-25,8)
IMG(%)	10,54(0,2-28,8) ^{a*}	13,97(0,4-72,5)	12,48(1,8-31,7)	15,64(0,6-45,3)
Large immature cells (10 ⁹ /L)	4,29(0-23,3) ^{c*}	10,84(0-159)	4,58(0,1-25,8)	7,93(0,1-29,6)
ALY (10 ⁹ /L)	1,99(0-19,6) ^{b*}	1,47(0-14,6)	0,39(0-2,4)	1,44(0-10,5)
IML (10 ⁹ /L)	0,95(0-13,7)	1,23(0-13)	0,82(0-30,4)	0,91(0-5)
IMM (10 ⁹ /L)	1,18(0-13,9) ^{c*}	4,41(0-76,3) ^{b*}	1,31(0-10,4)	1,91(0-8,9)
IMG(10 ⁹ /L)	2,16(0-10,1)	5,22(0-75,7)	2,88(0-12,6)	5,12(0-18,6)

a vs lenfoma ***p<0,001

b vs mm **p<0,01

c vs aml *p<0,05

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Kemik iliği incelemesi (aspirasyon ve biyopsi) birçok primer ve sekonder hematolojik hastalığın klinik tedavisinde merkezi bir rol oynar. Periferik kanın sitolojik analizi esas olarak otomatik Hematoloji analizörleri ile gerçekleştirilirken, kemik iliği aspiratlarının hücresel analizi manuel mikroskopik incelemeye ve flow sitometre ile immunofenotipik incelemeye dayanır. Kemik iliği örnekleri, esas olarak daha büyük hücresel heterojenite (periferik kandan normalde bulunmayan öncülerin varlığı ve hematopoetik olmayan hücrelerin küçük miktarları göz önüne alındığında) ve stromal kökenli lipid parçacıklarının varlığı nedeniyle periferik kandan farklıdır. Bu farklılıklara rağmen, geçmiş yıllarda bazı araştırmacılar periferik kan için tasarlanmış otomatik hematoloji analizörleri ile kemik iliği aspiratlarını analiz etmeye çalışmış, lipid parçacıklarından gelen interferansları önlemek için örnekleri ön işleme tabi tutmuşlardır.

Akım sitometri ile çok parametrelili analizler yapılabilmekte, hücrelerden oldukça fazla veri elde edilebilmekte ve parametreler arasındaki ilişki ölçülebilmektedir. Hücre analizinden elde edilen bu veriler klinik tanıda ciddi katkılar sağlayabilmektedir. Ayrıca Otomatik hematoloji analizörleri ile kemik iliği analizinin daha hızlı ve daha objektif muayene yapılması mümkün gibi gözükse de çeşitli teknik problemlerden dolayı yeterli doğruluk elde edilememiştir. Bununla birlikte, teknolojiye kayda değer ilerlemeler, beyaz kan hücresi diferansiyeline ek olarak, otomatik kan hücresi sayaçlarının immatür granülositleri ve çekirdekli kırmızı kan hücreleri ayırt etmelerini ve saymalarını sağladı. Bir akış sitometri tekniği ve impedans ve absorban kombinasyonunu kullanan Pentra DX Nexus da immatür hücre ayrımını gerçekleştirebilmektedir. Otomatik sistemlerde anormal hücreler flag şeklinde uyarılara neden olur. Otomatik sistemlerdeki flagler, kan yaymalarının dikkatle incelenmesi gereken hastaları seçmek için değerli bir belirteçtir. Bununla birlikte, bazen bu işaretleme yeterince hassas değildir, bu da farklı analizörler ve manuel yöntemler arasında tutarsız sonuçlara neden olur.

Bu çalışmada, Horiba Pentra DX Nexus otomatik analizörünün analitik performansı tam kan ile değerlendirildikten sonra kemik iliği numuneleri kullanılarak elde edilen

sonuçlar flow sitometri yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Pentra DX Nexus hematoloji analizörünün kemik iliğirneklerindeki akut lösemileri tespit etme ve sınıflandırma yeteneğini referans yöntem olarak flow sitometre kullanarak değerlendirdik.

Hematoloji analizörünün analitik performans değerlendirmesini tam kan ile CLSI H26-A2 dökümanına göre yapıldı. Pentra DX Nexus'un gün içi ve gün arası CV% 'si, eritrositlerin normal değerler için within-run ve between run CV% hariç, geleneksel hemogram cihazı parametreleri için 5.0%' den daha düşüktü. Gnlerarası tekrarlanabilirlik değerleri HCT ve Plt parametreleri için cihazın validasyon bilgileri ile uyumlu olmasına rağmen, Hb için cihaz validasyon bilgileri düşük ve normal değerler hariç %2 verilmişken yapılan hesaplamalar sonucunda yüksek değerler için %2,11 bulundu. Gnlerarası tekrarlanabilirlik için cihazın Rbc validasyon değerleri normal ve yüksek değerler için <%2, düşük değerler için <%2,5 iken bizim analiz sonucunda Rbc değerleri; düşük değer %2.61, normal %2.30 ve yüksek değer %2,65 bulundu. Wbc validasyon bilgileri ise düşük, normal ve yüksek değerler için sırasıyla <%5, <%4, <%3 iken verifikasyon bilgilerimiz düşük için %5.29, normal %4.04 ve yüksek için %3,93 bulundu. Gün içi tekrarlanabilirlik parametreleri ise Wbc, Plt ve Hb verileri cihaz validason verileri ile uyumluydu. Cihaz validasyon doğrusallık parametreleri Rbc için insan kanı ile yapılan testi 0.01-8.5 aralığında verilmesine rağmen bu test aralığın dışında (0.12-8.81) bile linearite verilerimiz uyumlu ve buna göre yüzde 0.99'luk eğimle verifiye edildi. Hb, HCT ve Plt parametrelerini cihaz validasyon bilgilerine göre yüzde 1 eğimle, WBC ise yüzde 0.91 eğimle verifiye edildi. LOB/LOD değerleri ve carry overreticininzellikleri ile uyumluydu.

Mevcut cihazların donanım ve yazılım yetersizliği ayrıca kemik iliği hücre kompozisyonunun karmaşıklığı, çekirdekli kırmızı kan hücrelerinin sayım başarısızlığı, olgunlaşmamış çeşitli hücrelerin doğru bir şekilde difüzyonunun zor olması ve kemik iliğindeki lipit interferasyonundan dolayı kemik iliği numuneleri ile verifikasyon çalışması yapılmadı. Hemogram cihazlarının yazılımları tam kan hücrelerine uygun yapılmıştır. Son teknolojiye sahip hemogram cihazlarında uygun teknoloji ve yazılımlarla immatür hücreler ile ilgili Atipik lenfosit(ALY), Büyük immature hücre(LİC),İmmature granulosit(IMG),İmmature monosit(IMM),İmmature lenfosit(IML) gibi “flag” ler tespit edilebilmektedir. Hematoloji laboratuvarlarında

hemogram cihazında kemik iliği ölçümü çekirdekli hücrelerin sayısı hakkında bize fikir vermektedir ve flow sitometri ölçümü yapılacak kemik iliği için dilüsyon oranları belirlenmektedir.

Bu çalışma da Pentra DX Nexus hematoloji analizöründe 175 örnek eş zamanlı hemogram cihazı ve flow sitometrede incelenmiştir. Lösemi alt gruplarına göre karşılaştırma yapılmamış, karşılaştırmalar tüm lösemi hastaları üzerinden yapılmıştır. Nötrofil, Monosit Lenfosit Eozinofil, IML ve LIC yüzde değerleri flow sitometri ve hematoloji analizörü arasındaki korelasyon katsayıları sırasıyla 0,938, 0,616, 0,677, 0,576, 515 ve 0,567 idi. hemogram cihazı ile değerlendirilen ALY ile flow sitometri değerlendirilen CD34+ hücre, IMM ve IMG korelasyon katsayıları sırasıyla 0,209, 0,141, 0,254 iken LIC değeri 5 üstünde olan hastalarda aynı korelasyon katsayıları sırasıyla 0,620 0,398, 0,674 'e yükseldi.

Hemogram cihazında kemik iliği numuneleri değerlendirilirken görülen flag'lerin hangi hücreleri gösterdiği değerlendirildi. Multipotent kök hücre yüzey markeri olan CD34+ flow sitometride blast hücreleri göstermektedir. Flow Sitometredeki CD34+'ün hemogram cihazındaki ALY, IMM, IML ve LIC değerlerine sırasıyla 0.620, 0.394, 0.249, 0.292 korelasyonlarına bakıldığında en yüksek korelasyonu ALY ile yaptığı görülmektedir (R:0.620). Bu verilere göre hemogram cihazındaki ALY yüzdesi kemik iliğindeki blast yüzdeleri hakkında en doğru sonucu göstermektedir. Hemogram cihazındaki nötrofil yüzdeleri kemik iliğindeki nötrofilleri yüksek oranda yansıtmaktadır (R:0.9382). Flow sitometrede bakılan Monosit(R:0.616), Lenfosit(R:0.677), ve Eozinofillerin(R:0,5762) hemogram cihazı ile karşılaştırıldığında korelasyon katsayıları, flow sitometredeki LIC (R:0,567) ve IML(R:0,515) hücreleri ile benzer korelasyonu göstermektedir. Bu değerlere göre kemik iliği numunesini hemogram cihazı ile ölçtüğünde monosit, lenfosit ve eozinofil verilerine benzer oranda LIC ve IML değerlerini göstermektedir. hemogram cihazlarına uygun bir yazılım geliştirilip kemik iliği validasyonu yapıldıktan sonra ölçülen monosit, lenfosit ve eozinofil verileri oranında LIC ve IML hücreleri gösterilebilir.

AML, ALL, MM ve Lenfoma hastaları remisyonda oldukları için 131 hastanın flagleri %5'in altında tespit edildi. Lenfoma grubunun sağlıklı grup kabul edilmesine

rağmen diğer hasta gruplarının verileri hemen hemen lenfoma grubu ile benzer olması hasta alt gruplarının remisyonda olduğunu desteklemektedir. Düşük blast seviyeleri yapılan karşılaştırmada korelasyon katsayılarının yüksek bulunması üzerine LIC seviyeleri %5'in altında olan hastalar dışlanarak sadece LIC değerleri %5'in üstünde olan 44 hasta ile korelasyon analizi yapıldığında ise CD34 ile ALY, İMM ile ALY ve İMG ile ALY arasındaki korelasyonun yaklaşık üç kat arttığı tespit edildi. Sonraki çalışmalarda blast seviyesi yüksek akut dönemdeki hastalardan kemik iliği numunesi alınması veya LIC değerleri %5'in üstünde olan hastalar arasında korelasyon bakılmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak Pentra DX Nexus hematoloji analizörü kullanılarak kemik iliği aspiratlarını analizinde IML ve LIC değerleri kemik iliği blast konsantrasyonu hakkında ön bilgi verebilir. Blast konsantrasyonu yüksek hastalarda düşük hastalara göre hemogram cihazları daha fazla bilgi vermektedir.

KAYNAKÇA

- 1.Arroyo ME, Tabernero MD, Garcia-Marcos MA, Orfao A. (2005). Analytic performance of the PENTRA 80 automated blood cell analyzer for the evaluation of normal and pathologic WBCs. American journal of clinical pathology. 123(2):206-14.
2. Barteneva N.S. Vorobjev I.V. (2016). Imaging Flow Cytometry. New York
- 3.Green R, Wachsmann-Hogiu S. (2015). Development, history, and future of automated cell counters. Clinics in laboratory medicine. 35(1):1-10.
- 4.Ciesla B. (2007). Hematology in Practice. USA ,F.A.Davis Company. ss.22-138.
- 5.Kottke K. Marchant. Davis B.H. (2012) Laboratory Hematology Practice. UK. Blackwell. Publishing Ltd. s.26.
- 6.Graham, Marshall. (2013). The Coulter Principle: Imaginary Origins. Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology. 83.
- 7.Mansberg H, Saunders A, Groner W. (1974). The Hemalog D white cell differential system . J Histochem Cytochem. 22: 711 – 724.
- 8.Lee LG, Chen CH, Chiu LA.(1986). Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. Cytometry. 7: 508 – 517.
9. Turgeon, M. L. (2012). Clinical hematology: Theory and procedures. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. s.527
10. Sullivan E. (2006). Hematology Analyzer: From Workhorse to Thoroughbred. Lab Med 37: 274 –278
11. Shapiro HM. (2001). Optical measurements in cytometry: light scattering, extinction, absorption, and fluorescence. Methods in cell biology. 63:107-29
12. Marina OC, Sanders CK, Mourant JR. (2012). Correlating light scattering with internal cellular structures. Biomed Opt Express. 3(2):296–312.
13. Wilkerson MJ. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 42: 53–71
14. Taneli F. (2007). Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. Türk Klinik Biyokimya Derg. 5(2): 75-82.
15. Becton Dickinson Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. 2000. San Jose: Becton Dickinson Biosciences.
- 16.Leach M, Drummond M, Doig A. (2012). Practical Flow Cytometry in Hematology Diagnosis, UK.s.4
17. Kanev M, Muranlı FG. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. Sakarya University Journal of Science. 20(1):33-8.
18. G Telford, William.(2011). Lasers in Flow Cytometry. Methods in cell biology. Elsevier Inc. 102: 375-409.
19. Ormerod MG, Novo D. (2008). Flow Cytometry: A Basic Introduction: Michael G. Ormerod
20. Köker, Mustafa. (2014). Sağlıklı kemik iliği ve kan örneklerinde akım sitometri uygulamaları. Sivas Tıp Dergisi. 36.
21. Özdemir, Oner & Karavaizoğlu, Çağla.(2016). Utilization of Flow Cytometry in Immunologic and Allergic Diseases. Asthma Allergy Immunology.14, 117-128.
22. Rahman M. (2006). Introduction to flow cytometry. Oxford: Serotec Ltd,16-23.

23. Coulter W. Coulter electronics. Chicago, Illinois, 1956; 1034-1042.
24. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. Clin Chem 2002; 48: 1819-27.
25. Hulet HR, Bonner WA, Sweet RG, Herzenberg LA.(1973). Development and application of a rapid cell sorter. Clin Chem. 19(8): 813-6.
26. Ibrahim SF, van den Engh G. (2007). Flow cytometry and cell sorting. Adv Biochem Eng Biotechnol.106: 19-39.
- 27.Uzay Görmüş(Ed.).(2014). Laboratuvar Dünyası. İstanbul. s.99
28. Adan, A. ve Diğerleri. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications, Critical Reviews in Biotechnology.1-15
29. Reggeti F, Bienzle D. (2011). Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol, 48, 223–35.
30. Rose AS, Knox KS. (2007). Bronchoalveolar lavage as a research tool. Semin Respir Crit Care Med. 28(5): 561-73.
31. Craig FE, Foon KA. (2008). Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood.111(8): 3941-67.
32. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. Cytometry B Clin Cytom 2007; 72B: S3.
33. Georgescu D, Ferrari-Lacraz S, Villard J. (2007). Anti-HLA antibody detection and rejection in kidney transplantation: impact of the new Technologies. Rev Med Suisse.25; 3(108): 1064-9.
34. Esvet Mutlu, Meral Gültekin. (2015).Data Analysis in Flow Cytometry; 45(4): 155-159
35. Yazıcı, Metin & Yardimci, Remziye. (2016). AKIM SİTOMETRİ VE SU ÜRÜNLERİ UYGULAMALARI (Flow Cytometry and its Applications in Aquatic Sciences). Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research. 2. 159-175.
36. Mutlu, E.Gültekin,M.(2015). Akım Sitometride Veri Analizi. Türk Mikrobiyol Cem. Derg. 45(4):155-159
37. Data analysis. (2000). Introduction to flow cytometry: A learning guide. CA, USA; Beckton and Dickinson Company,27-34.
38. Çınar SA.(2009). Akan hücre ölçer cihazında veri analizi. In: Erten G, Yanıkkaya GD, Gür D (eds). Akan hücre ölçer uygulama alanları. DETAE, İmmünoloji ABD yayını.168-76.
39. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo DG, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. (2008). Diagnostic Tests Based on Human Basophils: More Potentials and Perspectives than Pitfalls. Int Arch Allergy Immunol. 11; 146(3): 177-89.
40. Appel JZ 3rd, Hartwig MG, Cantu E 3rd, Palmer SM, Reinsmoen NL, Davis RD.(2006). Role of flow cytometry to define unacceptable HLA antigens in lung transplant recipients with HLA-specific antibodies. Transplantation.15;81(7): 1049-57. Walczak H, Haas TL.Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. Methods Mol Biol 2008; 414: 221-39.
41. Johnson KW, Dooner M. Quesenberry PJ.(2007). Fluorescence activated cell sorting: a window on the stem cell. Curr Pharm Biotechnol. 8(3): 133-9.
42. Dalva, K. (2016). Hematoloji'de akım sitometri kullanımı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara. Temel Mol. Hem. Kursu. 73-85.

43. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. (1993) Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *American journal of clinical pathology*. 100(5):534-40.
44. McCoy JP Jr.(2002). Basic principles of flow cytometry. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* Apr;16(2):229-43.Review.
45. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. (2008). Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *American journal of clinical pathology*. 129(6):934-45.
46. Craig FE, Foon KA. (2008). Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 111(8):3941-67.
47. Di Noto R, Mirabelli P, Del Vecchio L. (2007). Flow cytometry analysis of acute promyelocytic leukemia: the power of 'surface hematology'. *Leukemia*. 21(1):4-8.
48. Zangrando A, Luchini A, Buldini B, Rondelli R, Pession A, Biondi S, et al. (2006). Immunophenotype signature as a tool to define prognostic subgroups in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*.20(5):888-91.
49. Wetzler M, McElwain BK, Stewart CC, Blumenson L, Mortazavi A, Ford LA, et al. (2003). HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 17(4):707-15.
50. Valet G, Repp R, Link H, Ehninger A, Gramatzki MM. (2003). Pretherapeutic identification of high-risk acute myeloid leukemia (AML) patients from immunophenotypic, cytogenetic, and clinical parameters. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 53(1):4-10.
51. Gorczyca W. (2004). Flow cytometry immunophenotypic characteristics of monocytic population in acute monocytic leukemia (AML-M5), acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Methods in cell biology*. 75:665-77.
52. Ogata K, Yokose N, Shioi Y, Ishida Y, Tomiyama J, Hamaguchi H, et al. (2001). Reappraisal of the clinical significance of CD7 expression in association with cytogenetics in de novo acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*. 115(3):612-5.
53. Paredes-Aguilera R, Romero-Guzman L, Lopez-Santiago N, Burbano-Ceron L, Camacho-Del Monte O, Nieto-Martinez S. (2001). Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *American journal of hematology*. 68(2):69-74.
54. Basso G, Lanza F, Orfao A, Bene M, Borowitz M, Campana D, et al.(2002).Flow cytometric immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia: is the time ready for consensus the guidelines? *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 16(4):257-8.
55. Diguseppe JA. (2007). Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. *Clinics in laboratory medicine*. 27(3):533-49, vi.
56. Bene MC. (2005). Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunology letters*. 98(1):9-21.
57. Riley, RS. Massey, D. Jackson-Cook, Idowu ,M. Romagnoli, G. (2002). Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.*Apr;16(2):245-99.Review.

58. Kalpana S. Reddy, Sherrie L. Perkins. (2004). Advances in the Diagnostic Approach to Childhood Lymphoblastic Malignant Neoplasms, Pathology Patterns Reviews, Volume 122, Issue suppl_1, 1 December 2004, Pages S3–S18.
59. CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI). Validation, verification, and quality assurance of automated hematology analyzers. Approved standard. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI Document H26-A2, 2010.
60. Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness; approved guideline. 2. Wayne, PA, USA: CLSI; 2006. CLSI document EP15-A2.
61. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guidelin. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2012. CLSI document EP17-A2.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2004. CLSI document EP05-A2.
63. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Wayne, PA, USA: CLSI; 2003. CLSI document EP06-A
64. Yücel, K. S, erum androstenedion ölçümünde immunoassay ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (lc-ms/ms) metodlarının karşılaştırılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, 2016.
65. Güngör, M. Klinik biyokimyada ölçüm belirsizliği, Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı, Uzmanlık Tezi, 2008, İstanbul
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2005. CLSI document EP07-A2

ETİK KURUL ONAY FORMU

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64) KARAR FORMU				
SAYI:		Tarih: 17.05.2018		
KONU: Etik Kurulu Kararı				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Hematoloji Analizörü ve Flow Sitometride Kemik İliği Örnekleri Kullanılarak Yöntem Karşılaştırılması		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
	TELEFON	216 570 91 90		
	FAKS	216 565 55 26		
	E-POSTA	etik@sbgoztepehastanesi.gov.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Ferruh Kemal İşman		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİL CİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☒		
	Retrospektif	☐		
	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	PLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2018/0141	Tarih: 17.05.2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmaya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Derya Büyükkayhan
İmza:

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 17.05.2018

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hematoloji Analizörü ve Flow Sitometride Kemik İliği Örnekleri Kullanılarak Yöntem Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
Prof. Dr. Işıl MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☐	☒	☐	☒	☐	☒	
Prof. Dr. Asif Yıldırım	Üroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
Prof. Dr. Süleyman Daşdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☒	☐	☐	☒	☒	☐	
Doç. Dr. Sebahat Dilek Torun	Halk Sağlığı	Özel Kuruluş	☐	☒	☐	☒	☐	☒	
Doç. Dr. Sıdika Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☐	☒	☐	☒	☐	☒	
Yrd. Doç. Dr. Hacer Hicran Mutlu	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	☐	☒	☐	☒	☒	☐	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Gönen Hukuk Bürosu	☒	☐	☐	☒	☐	☒	
Saliha Şahin	İşçi		☐	☒	☐	☒	☒	☐	

*:Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi

Etik Kurul Başkanı
 Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Derya Büyükkayhan
 İmza:

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Ercan ORAN

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 08 Ekim 1988, Batman

Elektronik Posta: ercannorann@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Ön lisans	Fatih Üniversitesi, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2007
Lisans	Fatih Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2011
Yüksek Lisans	Beykent Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İşletme ABD, Hastane ve Sağlık Kurumları Yöneticiliği	2012

İŞ TECRÜBESİ

Tarih	Kurum	Görev
2010	SBÜ Haseki Eğitim ve Araştırma Hasstanesi	Biyolog

YABANCI DİLLER

İleri düzeyde İngilizce, başlangıç düzeyinde Fransızca ve Arapça.

HOBİLER

Yüzme, fotoğrafçılık, voleybol, futbol.