



## **Kan Sayımında Otomasyon Parametreleri**

*Prof. Dr. İnci Yıldız*

Pediyatrik hematolojinin tarihçesine baktığımızda ilk yayının von Jaksch'ın "Anemia pseudoleukemica infantum" ile 1889'da başladığını görürüz. Daha sonra aynı antiteyi Hayem ve Luzet de tanımladılar. Jaksch-Hayem-Luzet anemisi olarak tanımlanan ve kötü beslenme sonucu gelişen ishal, rahitis ve enfeksiyonların eşlik ettiği splenomegali, anemi, lökositoz ve psödo lösemik bir kan tablosunun eşlik ettiği derin kombine karans anemisi olarak bilinen bu antite çocuk hematolojisinin ilk yayını oluşturur.

Bu dönemlerde anemileri sınıflama sorunu vardır. Hayem bu amaçla 1877'de renk indeksi kavramını ortaya atmış ve hipokromazi terimi doğmuştur.

Mikroskop Anton von Leeuwenhoek tarafından 17. yüzyılda icat edildi. Leeuwenhoek ürettiği bu mikroskop ile her şeye baktı ve kan hücrelerini de ilk kez tanımladı. Leeuwenhoek'un ürettiği mikroskoplar 270 kez büyütüyordu ve bu üstünlük 19. yüzyıla kadar aşılamadı. Aslında bir kumaş tüccarı olan Leeuwenhoek'un ürettiği bu ilkel alet ile başlayan kan hücrelerinin sayımı 1950'lere kadar hep mikroskopta yapıldı.

1950 yılında ilk kez Wallace Coulter empedans yöntemi ile lökosit ve eritrositlerin sayımını yapmış ve bir alet geliştirmiştir. Empedans yönteminde belirli oranda sulandırılmış kan iki duyarlı elektrot arasındaki bir delikten geçirilerek her geçen hücre elektrik vuru olarak sayılır. Her çarpmanın büyüklüğü hücre büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Bu dönemdeki aletlerde lökositleri saymak için de önce eritrosit sayılır, sonra bir deterjan ile eritrositler hemolize uğrattılır, lökositler sayılırdı.

1960'larda tam kan sayımı (Complete Blood Count: CBC) 7 parametreden oluştu; WBC (White Blood Cell: Lökosit), RBC (Red Blood Cell: Eritrosit), Hb (Hemoglobin), Hct (Hematokrit), MCV (Mean Corpuscular Volume: Ortalama eritrosit hacmi), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin: Ortalama eritrosit hemoglobini), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu).

**Tablo 1.** Bazı kan sayımı cihazlarında kullanılan yöntemler ve parametreler<sup>2</sup>

Parametre	Coulter STKS, MAXM	Sysmex, SF-3000	Cell-Dyn 3500	Advia 120
<b>WBC</b>	Empedans	Optic Laser scatter	Empedans ile Optik scatter birlikte	Optic Laser scatter
<b>RBC</b>	Empedans	Empedans	Empedans	Optik Laser scatter
<b>Hb</b>	Modifiye-siyanmethemoglobin (525 nm)	Sodyum Lauril-sülfat Hb yöntemi	Siyanmethemoglobin (540 nm)	Siyanmethemoglobin (546 nm)
<b>Hct</b>	Hct: (RBCxMCV) ÷10	Hct: (RBCxMCV)÷10	Hct: (RBCxMCV)÷10	Hct: (RBCxMCV) ÷10
<b>MCV</b>	Eritrosit histogramı ortalaması	Eritrosit histogramı ortalaması	Eritrosit histogramı ortalaması	Eritrosit histogramı ortalaması
<b>MCH</b>	MCH: (Hb ÷ RBC)x10	MCH: (Hb ÷ RBC)x10	MCH: (Hb ÷ RBC)x10	MCH: (Hb ÷ RBC)x10
<b>MCHC</b>	MCHC: (Hb÷Hct)x100	MCHC: (Hb÷Hct)x100	MCHC: (Hb÷Hct)x100	MCHC: (Hb÷Hct)x100
<b>Plt</b>	Empedans	Empedans	Empedans	Empedans
<b>RDW</b>	Eritrosit histogramından RDW: (SD÷MCV)x100	RDW-SD (fl) RDW-CV (%)	Eritrosit histogramından RDW: (SD÷MCV)x100	Eritrosit histogramından RDW: (SD÷MCV)x100
<b>Lökosit Formülü</b>	Empedans, radyo dalgaları. Volume Conductivity Scatter (VCS)	Optic Laser Scatter; Bazofiller ayrı kanalda değerlendirilir.	Multiangle (0°,90°,10°, 90° depolarize), polarized scatter separation (MAPSS)	Optic Laser scatter; lökositler peroksidaz ile boyanır; Bazofillerin ise fitalik asitle boyanmama özelliğinden faydalanılır.

**Kısaltmalar:** WBC, lökosit; RBC, eritrosit; Hb, hemoglobin; Hct, hematokrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt, trombosit; RDW, red cell distribution width; SD, standart deviation; RDW-SD, red cell distribution width-standard deviation; RDW-CV, red cell distribution width-coefficient variation.

**Not:** Tablo A. Köroğlu, Hematoloji Birinci Basamak Kursu Eğitim kitabından (İzmir, 2000) izinle alınmıştır.

Trombosit sayımı bu otomatik sayıma 1970'lerde eklendi. Ancak 1970'li yıllarda trombositler için farklı bir çapta delik içeren aletler vardı. 1970-1980 arası kan sayımına 2 parametre daha eklendi, RDW (Red Cell Distribution Width: Eritrositlerin büyüklüklerine göre dağılım genişliği) ve MPV (Mean Platelet Volume: Ortalama trombosit hacmi). Bir kısım sayıcılarda ise 1984'de 3 parametrelili lökosit formülü (DLC: Differential Leucocyte Count) bu parametrelere eklendi.

Daha gelişmiş aletlerde ışık saçma teknolojisi (optik scatter) kullanıldı.

Son yıllarda Miles Technicon sayıcısı CHCM'yi (Cellular Hemoglobin Concentration Mean: Hücresel hemoglobin konsantrasyonu ortalamasını, g/dl) ve HDW'yi (Hemoglobin Distribution Width: Hemoglobin dağılım genişliği) bu parametrelere ek olarak vermeye başladı. Bunlardan sadece HDW klinik pratikte değerlidir. Bazı sayıcılarda verilen PDW (Platelet Distribution Width: Trombosit dağılım genişliği) ve PCT (Plateletcrit) parametreleri ancak özel araştırmalarda kullanılmaktadır.

Çeşitli kan sayımı aletlerinde kullanılan yöntem ve parametreler Tablo 1'de verilmiştir.

Kan sayım aletlerine son giren parametre retikülosit sayımıdır.

Kan sayımı tetkiki için taze alınmış, venöz, kapiller veya arteriel kan kullanılabilir. 1 ml kan için 1.5 mg EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) uygun antikoagülan miktarıdır. EDTA'nın 2 değerlikli veya 3 değerlikli potasyum tuzu kullanılabilir. EDTA antikoagülanlı kan laboratuvar ortamında, 4 derece veya oda ısısında, 24 saat bekletildikten sonra sayılsa da güvenilir sonuçlar verir bu sonuçlar WBC, Hb, Hct, RBC ve Plt için geçerlidir. Diğer parametrelerde oda ısısında 6 saat sonunda veya 4 derecede 24 saat sonunda istenmeyen sonuçlar alınabilir. En az stabil parametre ise MPV'dir; kan alındıktan sonraki ilk 2-6 saat güvenilir sonuçlar için geçerlidir.

Kan alete verilir, tüpten 200 veya 300 mikrolitre kan alet tarafından aspire edilir. Çeşitli sulandırıcı ve lizatlarla muamele edilir.

Trombosit sayısının kontrolünde ve eritrosit inklüzyonlarının (Howell-Jolly cisimcikleri, bazofil noktüasyon ve malarya), filarya, tripanozom gibi parazitlerin incelenmesinde mikroskop şarttır.

### **RBC (Eritrosit Sayımı)**

En az 10.000 eritrosit sayılarak manuel sayıma oranla daha güvenilir sonuçlara ulaşılır.

Sayımların yanı sıra verilen histogramlar da yararlı olabilir. Örneğin RBC normal dağılımının sol tarafında görülen bir tepelik skizositlerin varlığına işaret olabilir. Tersine RBC histogramının sağında kuyruk tarafında bir kümelenme soğuk aglütinine bağlı eritrosit aglütinasyonunu düşündürür. RBC histogramının tümüyle sola kayması mikrositoza, sağa kayması da makrositoza

işarettir. Bimodal RBC histogramı farklı morfolojili 2 eritrosit popülasyonuna, kan transfüzyonu sonrasında veya mikrositer ya da makrositer anemide tedaviye yanıtın başladığına ya da miyelodisplaziye erken bir işaret olabilir.

**MCV (Mean Corpuscular Volume: Ortalama Eritrosit Hacmi)**

Erişkinde normal değer 80-90 femtolitre veya mikronküptür. Kan sayımı aletinin doğrudan ölçtüğü bir parametredir.

**Hb (Hemoglobin)**

Siyanmethemoglobin yöntemi ile fotometrik olarak okunur.

**Hct (Hematokrit)**

Kan sayımı cihazlarında hematokrit ölçülmemekte, MCV ve eritrosit sayımından faydalanarak hesaplanmaktadır.

**Hematokrit Hesaplanması:** 
$$\frac{\text{RBC (10}^{12}/\text{l)} \times \text{MCV}}{10}$$

Mikrohematokrit santrifüj yöntemi ile ölçülen hematokrit, kan sayımı cihazıyla bulunanlardan biraz daha düşüktür. Çünkü, santrifüje edilen eritrosit sütunu ne denli hızlı çevrilse de bir miktar plazma içermektedir. Buna rağmen mikrohematokrit santrifüj yöntemi, manuel yöntemler içinde en güvenilir olanıdır.

**MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin: Ortalama Eritrosit Hemoglobini)**

Eritrosit içindeki ortalama Hb miktarını gösterir. Normal değeri 30-34 pikogramdır.

$$\frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{RBC (x10}^{12}/\text{l)}}$$

**MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu)**

Eritrosit içindeki hemoglobinin yüzde olarak ifadesidir. Normal değeri %30-36 arasındadır.

$$\frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{Hct (\%)}}$$

Bu nedenle kan sayımı aletlerinde aletin sağlıklı çalışıp çalışmadığını kontrol etmeye yarayan bir parametredir.

Hereditör sferositozda MCHC yükselir.

**HDW (Hemoglobin Distribution Width: Hemoglobin Dağılım Genişliği)**

HDW anizokromiyi gösterir. Talasemi minorda, normal RDW, yüksek HDW bulunurken, demir eksikliğinde hem RDW hem de HDW yüksektir.

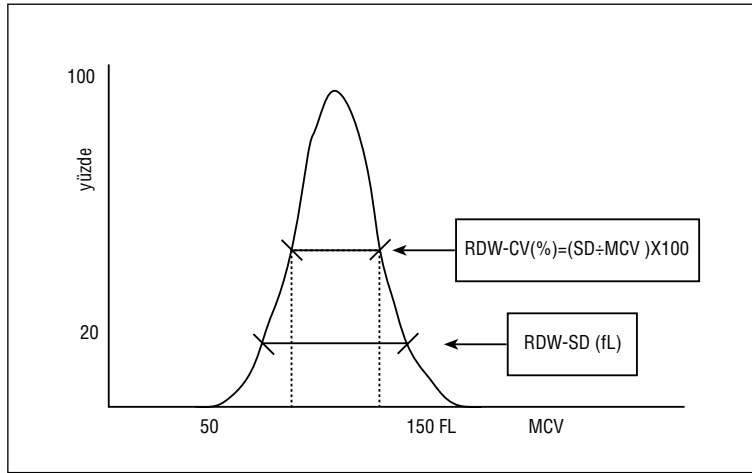
Hemolitik anemilerde de MCV, RDW ve HDW yüksektir.

**RDW (Red Cell Distribution Width: Eritrositlerin Büyüklüklerine Göre Dağılım Genişliği)**

Eritrosit histogramlarından elde edilen istatistiksel bir değerdir. Eritrositlerin büyüklüklerine göre dağılım genişliğini göstermektedir.

Eritrosit büyüklüğünün dağılımını incelemek için "Red cell distribution width-coefficient variation" (RDW-CV) ve "Red cell distribution width-standard deviation" (RDW-SD) olmak üzere iki istatistiksel yöntem kullanılır (Şekil 1). RDW-CV bir standart deviasyondaki (eritrositlerin %68.26'sının) histogram genişliğinin MCV'ye bölünüp, 100 ile çarpımıyla hesaplanır. RDW-SD ise eritrositlerin %20'sinin bulunduğu bölgedeki genişliği göstermektedir. RDW-CV'nin normal değeri %14, RDW-SD'nin değeri ise 45 fl'dir.

RDW-SD demir eksikliği anemisinin erken dönemi ile talasemi taşıyıcılarını ayırt etmede kullanılır. Talasemi taşıyıcılarında eritrositler mikrositiktir, yani anizositoz demir eksikliğindeki kadar belirgin değildir (RDW normaldir). RDW-SD çok küçük mikrositik veya makrositik bir eritrosit popülasyonunun varlığını gösterebilecek duyarlıktadır. RDW'nin %17'den fazla oluşuna mikrositoz eşlik ederse demir eksikliği düşünülmelidir. Anemi belirmeden önce en erken belirtinin RDW yüksekliği olduğu belirtilmektedir.



Şekil 1. Eritrosit histogramında RDW-CV ve RDW-SD kavramları<sup>2</sup>

### **Retikülosit Sayısı (Retic)**

Retikülosit sitoplazmasında RNA kalıntıları bulunmaktadır. Krezil mavisi ile vital boyama yapılarak RNA artıkları mikroskopta belirlenebilir. Mikroskopta 1.000 eritrosit sayarak retikülositleri belirleriz; oysa elektronik sayıcılarda en az 30.000 hücre sayılmaktadır.

Retikülositlerin normal değeri %1-2'dir. Fakat hematokriti düşük hastalarda sağlıklı değere ulaşmak için düzeltilmiş retikülosit sayısını vermek daha doğrudur.

### **Düzeltilmiş Retikülosit:**

$$\frac{\text{Hasta retikülositi (\%)} \times \text{Hasta hematokriti}}{\text{Normal Hct (\%45)}}$$

Mutlak retikülosit sayısı bir mm<sup>3</sup> kandaki retikülosit sayısını gösterir. Normal değeri 40-80 bin/mm<sup>3</sup>dür.

### **Plt (Trombositler)**

Trombositlerin hacimleri normalde 7-11 fl, çapları 1-3 mikrondur. Üç mikrondan büyük çaplı trombositlere makrotrombosit adı verilir. Normal bir bireyde trombositlerin %3'ü normalden daha büyüktür. Trombositlerde anizozitoz ve makrositoz aşırı tüketime bağlı olarak trombosit yapımının arttığı durumlarda (örneğin idyopatik trombositopenik purpura) görülür. Aplastik anemi ve hipersplenizmde trombositler küçüktür. Antikoagülan olarak kullanılan EDTA, kalsiyum iyonları ile kelat oluşturması sırasında trombosit membranındaki glikoprotein IIb-IIIa molekülünü etkileyerek glikoprotein IIb epitopunu ortaya çıkarır. Bazı kişilerin kanında bulunan otoantikorlar trombositlerin yüzeyindeki bu epitopa bağlanarak trombositlerin aglütinasyon yapmasına neden olurlar. Aglütine olan trombositler küme oluştururlar ve bu kümeler lökosit olarak algılandıklarından empedans ile ölçüm yapan kan sayımı cihazlarında lökosit olarak sayılır, trombosit sayısı normalden düşük olur. Bu nedenle yaymada trombositlerin kontrolü uygundur. Dev trombositler ayrıca beş parametrelili formül veren cihazlarda eritroblastlarla karıştırılabilmektedir.

Kan örneğinin uygun alınmadığı durumlarda (pıhtı oluşması, kan alındıktan sonra tüpün iyi karıştırılmaması) trombositlerin kümeleşme sonucu düşük sayılacağı unutulmamalıdır.

Eritrosit parçacıkları veya çok küçük eritrositler, mikrosferositler trombosit sayısını yüksek çıkarabilir.

İTP'de Plt düşük, MPV yüksek bulunmuş, reaktif trombositozda ise tersine Plt yüksek, MPV düşük bulunmuştur.

Plt histogramında solda bir pik görülmesi sitoplazmik kalıntılara işaretir,

**Tablo 2.** Kan sayımı cihazlarını etkileyen durumlar, sebep ve çözümler

Durum	Etkilenen Parametre	Açıklama	Çözüm
Soğuk aglütininer	RBC↓ MCV↑ MCHC↑	RBC histogramda iki farklı eritrosit popülasyonu, özellikle sağa kayma.	Kan ısıtılarak (37 °C) tekrar sayılır.
Lipemik veya ikterik kan	Hb↑ MCH↑ MCHC↑	Bulanıklık fotometrede Hb değerinin yüksek okunmasına neden olur.	Kan santrifüj edilerek plazması değiştirilir, sonra sayım yapılır.
Hemolizli kan	RBC↓ Hct↓ MCHC↑	Hemoliz olan eritrositler kan sayımı cihazında sayılmaz.	Tekrar örnek alınır.
Litik ajanlara dirençli eritrositler (Anormal hemoglobinler)	WBC↑ Hb↑	HB S, C, F taşıyan eritrositler litik ajanlara dirençli olabilir. Bu durumda lökosit olarak sayılırlar.	Litik ajanla manuel dilüsyon yapılarak, lizis için yeterince beklenir.
Mikrositler ve Tistositler	RBC↓	Küçük eritrositler normal eritrosit popülasyonu içine dahil edilmezler.	Eritrosit popülasyonunda sola kayma veya uyarı mesajı görülür. Periferik yayma incelenir.
Eritroblastlar, megakaryosit parçaları	WBC↑	Eritroblastlar ve megakaryosit parçaları, lökosit olarak sayılırlar.	Her 100 lökosit başına düşen eritroblast veya megakaryosit parçası periferik yaymada sayılarak, lökositler hesapla düzeltilir.
Trombosit kümeleri ve trombosit satellitizmi	Plt↓ WBC↑	Büyük trombosit kümeleri, lökosit olarak sayılır. Lökositlerin etrafına dizilen trombositler lökositlerle birlikte sayılırlar.	Periferik yayma incelenir. Sitratlı kan alınarak tekrar sayım yapılır.
WBC > 50 bin/uL	Hb↑ RBC↑ Hatalı Hct ve anormal indeksler	Bulanıklıktan dolayı Hb fotometrede yüksek okunur. Lökosit sayısı fazla olduğu için eritrosit histogramında görülürler.	Mikrohematokrit bakılır. Manuel hemoglobin bakılabilir. Manuel hemoglobin bakılabilir. Eritrosit sayımı düzeltilir, indeksler hesaplanır.
Bekletilmiş kan örneği	MCV↑ MPV↑ Plt↓	Eritrositler bekledikçe şişebilir, trombositler dejenere olurlar. Lökositler uzun süre EDTA'da beklediğinde bozulurlar. Lökosit histogramında anormal hücre popülasyonları ortaya çıkar.	Kanların sayım için bekletilebileceği maksimum süre her laboratuvar tarafından tespit edilmiştir. Bu süre 3 saati geçmemelidir. Periferik yaymalar 1 saat içinde yayılmalıdır.

**Kısaltmalar:** WBC, lökosit; RBC, eritrosit; Hb, hemoglobin; Hct, hematokrit; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt, trombosit; MPV, mean platelet volume; EDTA, etilen diamin-tetraasetik asit.

**Not:** Tablo A. Koroğlu, Hematoloji Birinci Basamak Kursu Eğitim kitabından (İzmir, 2000) izinle alınmıştır.

sağda bir pik ise skizositlere veya çok mikrositik eritrositlere ya da dev trombositlere işaretir.

Bimodal eğri sitoplazmik kalıntıları düşündürür.

### WBC (Lökosit Sayısı)

Eritrositten büyük dev trombositlerin çok sayıda olması da lökosit sayısını yanlış olarak yüksek gösterebilir.

Lökosit histogramının en solunda 50-100 fl arasında lenfositler, 100-200 arasında monosit, eozinofil ve bazofiller, 200-400 arasında ise nötrofiller yer alır. Lenfosit pikinin sola kayması normoblastların varlığını düşündürür.

Tüm bu parametrelerin güvenle sayılabileceği sınırlar şunlardır:

WBC	0.1 - 99 (x 10 <sup>9</sup> /l)
RBC	0.4 - 8.0 x 10 <sup>12</sup> /l
Hb	2 - 25 g/dl
Plt	10 - 999 x 10 <sup>9</sup> /l

Genellikle normalden %2'lik bir sapma uç değerlerde gözlenebilir ama trombosit sayımlarında 50 bin ve altındaki değerlerde bu sapma %5 kadar olur.

Bazı patolojik durumlarda da hatalı sonuçlara ulaşılabilir:

*Hiperlipidemi*, Hb, MCH ve MCHC'yi yanlış olarak yüksek çıkarabilir.

*Kriyoproteinemi*, psödotrombositoz ve psödolökositoz neden olabilir.

*Soğuk aglütininer* eritrositlerde otoaglütinasyona neden olarak, eritrosit sayısını ve Hct'i düşük, MCV'yi yüksek çıkarabilirler. Kan sayımlarını etkileyen durumlar Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Periferik yayma inceleme kriterleri

<b>MCV</b>	<70 fL, >100 fL (yenidoğanlar hariç)
<b>Plt</b>	<100 bin/ $\mu$ L, >700 bin/ $\mu$ L
<b>WBC</b>	<2.5 bin/ $\mu$ L, >20 bin/ $\mu$ L
<b>RDW</b>	>18%
<b>Eozinofil</b>	>25%
<b>Bazofil</b>	>3.5%

\* Lökosit formülünde; blast, eritroblast, trombosit kümesi, immatür granülosit, atipik lenf gibi uyarıların bulunması

\* Cihazın lökosit formülü vermediği durumda

### **SONUÇ**

Kan sayımı cihazları, iyi bakım yapıldığı ve kalite kontrolü dikkatle uygulandığı sürece güvenilir sonuçlar vermektedir.

Her laboratuvar kendi kullandığı kan sayımı cihazının özelliklerine ve şartlarına göre periferik yayma inceleme kriterleri oluşturmalıdır (Tablo 3).

### **KAYNAKLAR**

1. Gulati GL, Hyun BH. The automated CBC: A current perspective. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8(4):593-605.
2. Köroğlu A. Otomatik Kan Sayım İlkeleri ve Sonuçların Yorumlanması. Hematoloji Birinci Basamak Kursu Eğitim Kitabı, İzmir, 1 Kasım 2000, s:11-22.
3. Nathan and Oski. Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia, Saunders, 1998.
4. Rodak BF. Diagnostic Hematology. Philadelphia, Saunders, 1995.