

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNSAN PLAZMA VE SERUM ÖRNEKLERİNDE DOKUZ
ANALİT STABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE
ANLAMLİ DEĞİŞİM SINIRLARININ BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MURAT ÇELİKER

DANIŞMAN: PROF. DR. BÜNYAMİN KAPTANOĞLU

DENİZLİ-2008

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU



Üye : Prof. Dr. Diler ASLAN



Üye : Prof. Dr. S.Simin ROTA



Üye : Prof. Dr. Süleyman DEMİR



Üye : Doç. Dr. Hülya AYBEK



Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Zafer AYBKK
Tıp Fakültesi İfçkaro

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Bünyamin Kaptanoğlu, Prof. Dr. Diler Aslan, Prof. Dr. Simin Rota, Prof. Dr. Süleyman Demir, Doç. Dr. Hülya Aybek, Yrd. Doç. Dr. Yaşar Enli" ye, tezime katkılarından dolayı Doç. Dr. Beyza Akdağ' a, çalışma arkadaşlarım Dr. Mehmet Türk, Dr. Ramazan Akbay, Dr. Feride Sert, Dr. Funda Ercan, Dr. Didem Pınarbaşıllı, Dr. Koray Korkmazcan, Dr. Emine Kavalcı, Dr. Fatih Yaman, Dr. Cafer Gönen, Dr. Mahmut Şenyurf a, bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım Dr. Gamze Tekintürk, Dr. İlker Göçhan, Dr. Sezgin Tekintürk, Dr. Selahattin Sert" e, beraber çalıştığımız teknisyen arkadaşlara teşekkür ederim. Ayrıca değerli dostlarım ve Denizlideki ailem olan Şahika-Mert Özen' e, anneme, babama ve kardeşlerime desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
LABORATUVAR ANALİZLERİ.....	2
HASTA İLE İLGİLİ GEREKLİ BİLGİLER.....	3
ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	3
ÖRNEKLERİN TOPLANMASI SIRASINDA HATA KAYNAKLARI.....	4
ANALİZ SONUCUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	6
HEMOLİZİN OLUŞUM NEDENLERİ.....	6
HEMOLİZİN TEST SONUÇLARINA ETKİLERİ.....	7
İKTERİN TEST SONUÇLARINA ETKİLERİ.....	7
LİPEMİNİN TEST SONUÇLARINA ETKİLERİ.....	8
KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE NAKLEDİLMESİ.....	9
ÖRNEKLERİN ANALİZ İÇİN HAZIRLANMASI.....	11
ZAMAN.....	12
ÇEVRESEL FAKTÖRLER.....	12
ÖRNEK KABİNİN ÖZELLİKLERİ.....	13
ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ.....	13
KULLANILAN ANALİTİK SİSTEMLERLE İLGİLİ FAKTÖRLER...	14
ÖRNEKLERİN ANALİZ EDİLMESİ.....	15
ÖRNEKLERİN TEST EDİLMESİ VE HESAPLAMALAR.....	16
SONUÇLARIN RAPOR EDİLMESİ.....	17
GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
BULGULAR.....	26
TARTIŞMA.....	40
SONUÇLAR.....	49
ÖZET.....	51
İNGİLİZCE ÖZET.....	53
KAYNAKLAR.....	55

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo - 1: Anket sorulan	18
Tablo -2: Test kit kılavuzlarında belirtilmiş olan örnek tipleri ve analitlerin dayanıklılık süreleri	22
Tablo - 3: Bir birey örneğinin santrifüj ve ölçüm zamanları	23
Tablo - 4: Hemen ayrılan örneklerde bekleme süresine göre gözlenen değişimler	35
Tablo -5: Hücrelerle uzamış temas durumunda analit düzeylerinde gözlenen değişimler.	36
Tablo -6: CLIA 88 kriterlerine göre hemen ayrılan örneklerde gözlenen değişimler.	37
Tablo -7: CLIA 88 kriterlerine göre hücrelerle uzamış temas sonrasında örneklerde gözlenen değişimler.	38
Tablo - 8: Anlamlı değişim sınırına göre değerlendirme.	39
Tablo - 9: Örneklerin hemoliz değerlendirme sonuçları	42

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil - 1: Çalışma planının şematik görünümü	24
Şekil - 2: Albumin düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	26
Şekil - 3: ALT düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	27
Şekil - 4: AST düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	28
Şekil - 5: Glukoz düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	29
Şekil - 6: İnorganik fosfor düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	30
Şekil - 7: Total kolesterol düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	31
Şekil - 8: Potasyum düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	32
Şekil - 9: Total protein düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	33
Şekil - 10: Trigliserit düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu	34

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

BUN	: Kan Üre Azotu " <i>Blood Urea Nitrogen</i> "
CCL4	: Karbon Tetraklorür " <i>Carbon Tetrachloride</i> "
CLIA	: Clinical Laboratory Improvement Amendments
CVG	: Bireyler Arası Değişkenlik Katsayısı
CVJ	: Bireyiçi Değişkenlik Katsayısı
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	: Gravite
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein " <i>High Density Lipoprotein</i> "
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaF	: Sodyum Florid
NFL	: Amonyum
SCL	: Significant Change Limit
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein " <i>Very Low Density Lipoprotein</i> "

GİRİŞ

Analiz, biyolojik bir örnekteki analitin miktarını veya türünü belirlemek için gerçekleştirilen işlem basamakları iken, analit laboratuvarında ölçümü yapılan maddedir (1). Laboratuvarında analiz için kullanılan örnekler çok çeşitlidir. Bunların başlıcaları; serum, plazma, tam kan, çeşitli sıvılar (plevral, perikardiyal), idrar ve gaitadır. Tam kan, serum veya plazması ayrılmamış kandır. Serum, pıhtılaşmış kandan şekilli elemanlar (eritrosit, lökosit, trombosit) ayrıldıktan sonra geri kalan sıvı kısmıdır. Plazma, pıhtılaşması antikoagülanlarla önlenmiş kandan şekilli elemanlar ayrıldıktan sonra geri kalan sıvı kısmıdır (2).

Hastanın durumu (açlık/tokluk), örneklerin uygun olmayan şartlarda alınması, yanlış isimlendirilmesi, örneklere uygun koruyucuların katılmaması, örneklerin birbiri ile karışması, i nterf ereni erin (hemoliz. lipemi, ikter) etkileri, yanlış santrifüjleme sonucu serum örneklerinde hemolizin oluşması, örneklerin uzun süre açık da ve uygunsuz laboratuvar şartlarında (ısı, ışık, nisbi nem, hava sirkülasyonu v.b) bekletilmesi sonucu buharlaşma riskinin artması gibi birçok faktör analiz sonuçlarında hatalara neden olur.

Klinik laboratuvarlarımızda karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de kimyasal analizler için santrifüj edilmemiş örneklerin bütünlüğünün korunmasındaki zorluktur. Çünkü, plazma ve serumun hücrelerle uzamış teması hatalı test sonuçlarına neden olabilmektedir.

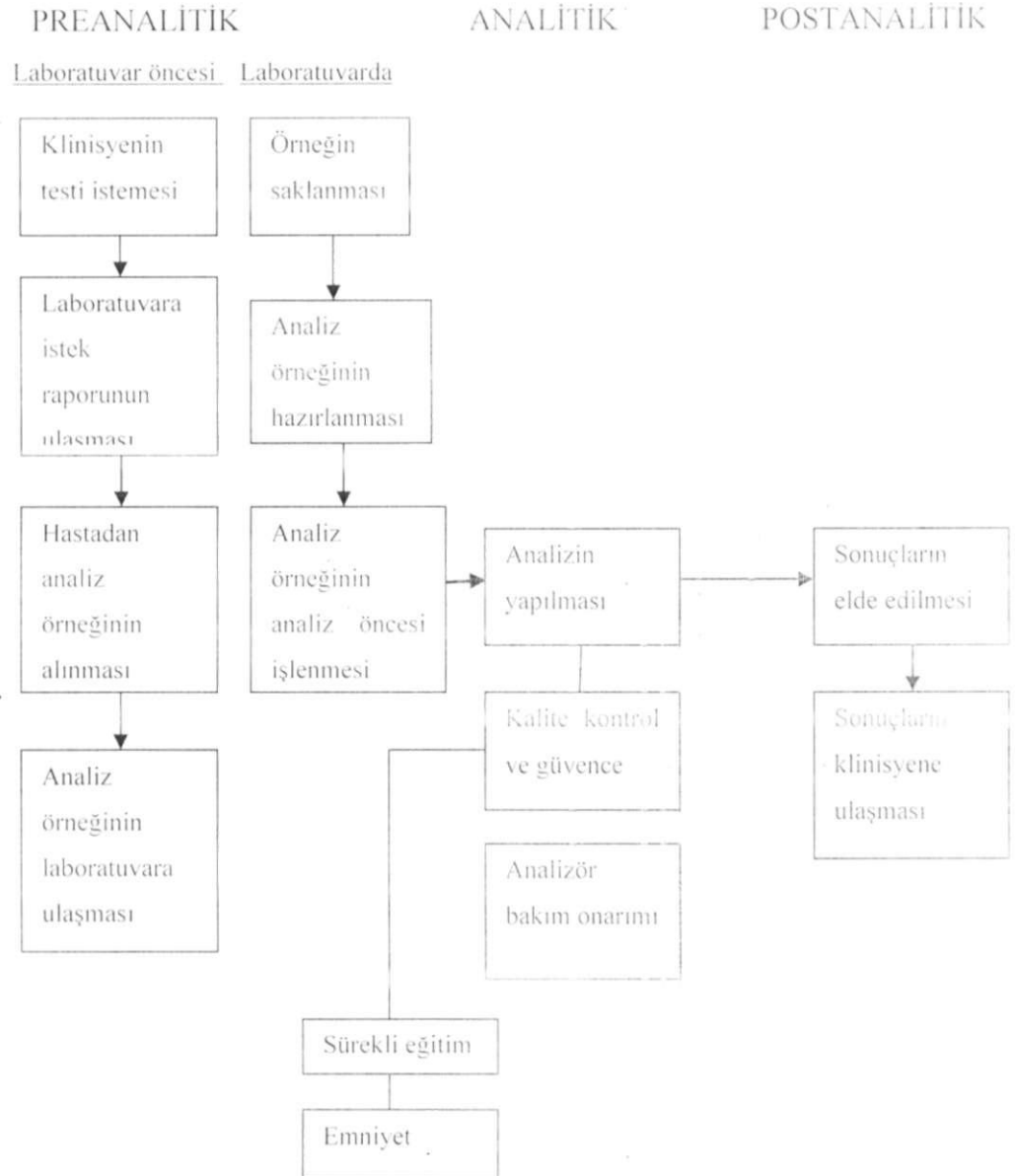
Bu çalışmada amacımız oda ısısında (25-28 °C) plazma ve serumun hücrelerle uzamış temasından sonra (48 saat) AST, ALT, total protein, albumin, trigliserit, total kolesterol, potasyum, fosfor ve glukoz analitlerinin düzeyindeki değişimleri göstermek ve bu değişimin klinik olarak anlamlı olup olmadığını araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

LABORATUVAR ANALİZİ

Laboratuvar hatalarının yaklaşık %95' i analiz öncesi ve analiz sonrası dönemlerde yapılan hatalardan kaynaklanmaktadır (3). Klinik bir laboratuvarın iş akışı aşağıdaki şemada gösterildiği gibi klinisyenin testi istemesiyle başlar ve sonuçların klinisyene ulaşımına kadar ilerler.

Klinik Laboratuvarın İş Akış Şeması (4-7, 8-10, 11-13)



HASTA İLE İLGİLİ GEREKLİ BİLGİLER

Laboratuvardan istekte bulunan hekim, gerekli bilgileri laboratuvar istek formlarına yazmalıdır. Bunlar şu başlıklar altında özetlenebilir (6, 8, 10, 12).

a - Hasta ile ilgili kişisel bilgiler: Hastanın adı, soyadı, yaşı, cinsiyeti ve ön tanı yazılmalıdır.

b- Hastanın hastalığı ile ilgili testler istenmeli gereksiz testler istenmemelidir.

c- Hastanın muhtemel tıbbi sakıncalarının belirtilmesi laboratuvar personelinin korunması açısından önemlidir.

d- Laboratuvar istek formlarının, hasta ile ilgili bilgilerin ve diğer verilerin yazılabileceği uygun bir formda hazırlanmış olması gerekmektedir.

e- Bu bilgilerin doktor tarafından doğru, açık ve okunaklı bir şekilde yazılması hataların önlenmesi bakımından gereklidir.

ÖRNEKLERİN ALINMASI

Kliniklerde yatan hastalardan klinik doktorları veya hemşireleri, ayaktaki hastalardan ise kan alma teknisyenleri veya hemşireleri tarafından örnekler alınmalıdır (11, 14-17). Bazı büyük kan alma merkezlerinde bu teknisyenler belli bir eğitimden sonra görevlendirilmektedir. Bu teknisyenlerde bazı özelliklerin olması gerekmektedir (11, 14-18).

a -El becerileri iyi olmalıdır.

b-Hasta kişisel bilgilerini hastanın laboratuvar istek formundaki bilgilerle kıyaslayabilmeli, örnek tüplerinin üzerine hasta ile ilgili bilgileri yazmalı ve bunları tüplerin üzerine yapıştırmalıdır. Başlangıçta kan alma noktalarında hasta ile ilgili bilgilerin doğru tesbit edilmesi toplanan örneklerdeki toplam hatayı önler. Poliklinik hastalarında hastanın adı, soyadı ve sosyal güvenlik numarası, kayıt numarası doğru yazılmalıdır. Birçok merkezde bu işlemler bir bilgisayar sistemi vasıtasıyla barkodlama ile yapılmaktadır. Bu sistem bu basamaktaki toplam hataları en aza indirmiştir (15, 17, 19, 20).

Örneklerin alınmasından analizine kadar geçen aşamada sıkça rastlanan hatalar 3 basamakta incelenebilir: 1- Örneklerin toplanması sırasındaki hata kaynakları. 2-

analiz sonucunu etkileyen faktörler 3- fizyolojik özelliklerdir (yaş, cinsiyet, mevsimsel değişiklikler, gebelik, yükseklik, menstruasyon) (21).

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI SIRASINDAKİ HATA KAYNAKLARI:

1- Antikoagülanların etkisi (11, 14, 15, 18).

Uygun olmayan ve gereğinden fazla veya az miktarda kullanılan antikoagulanlar çeşitli oranlarda değişikliğe neden olmaktadır (18, 22, 23, 24). Sitrat, okzalat ve EDTA kullanımı ALP'de hataya neden olur. Plazma ALP tayini için tavsiye edilen antikoagülan heparindir (25). Heparin amilaz aktivitesini inhibe ederken, sitrat, EDTA ve okzalat amilazda %15' lik aktivite azalmasına neden olur (22). Trigliserit ve kolesterol için heparin uygun antikoagülandır. Glukoz analizi için plazma kullanılacaksa glikolizi inhibe eden antikoagülan maddeler kullanılmalıdır (NaF gibi). Hücre muhteviyatından ayrılan serum genellikle uzun bir süre stabil kalır (24, 26-30). Ca ve Mg analitlerinde okzalat ve EDTA bu iyonlarla şelatlar yaparak çökmelerine ve düşük sonuçlar elde edilmesine neden olur. Serumun plastik tüplerde bekletilmesi halinde plastik kaplar Mg ve Ca absorblar. Serum örneklerinin buzdolabında bekletilmeside kalsiyumun çökmesine neden olacağından hatalı düşük sonuçlar elde edilir (31- 33). CK, CK-MB, AST, ALT, LDH, kreatin, ürik asit, fosfor, total protein, albumin, demir ve klorür için önerilen antikoagülan maddeler heparin ve EDTA' dır. BUN için sodyum florürdür. Amonyum heparinden sakılmamalıdır buna dikkat edilmezse hatalı sonuçlara neden olur (32).

2 - Diurnal ritm ile ilgili hatalar: Kan, idrar ve feçes örneklerinin toplanma periyotlarına dikkat etmeli, biyolojik ritme gerekli özeni göstermelidir (34). Analitlerin konsantrasyonlarında günlük, haftalık, aylık periyotlarda çeşitli değişiklikler olur. Metabolizmadaki diurnal değişim, biyolojik fonksiyonlardaki ritmik değişimin sonucudur.

Hipofiz hormonlarının bazıları gece ve gündüz farklılık gösterir. Bu hormonların konsantrasyonları hipofiz tarafından gece ve gündüz farklı düzenlenir. Bu nedenle bazı hormonal testler için örnek toplama zamanları belirlenmiştir (34-36). Kantitatif idrar analizleri için 24 saatlik örnek toplanması günlük değişimlerden gelen hataları önler. İdrar Na, K, P, Ca, Cre ve BUN düzeylerinde zamana bağlı

%50' lik farklılıkların gözleendiği, serum Na, K ve TP, Alb, ALP' de zamana bağlı %5, bilirubin, CK, TG ile steroid hormonlarda günlük %20, kreatininde %10' luk değişmelerin olduğu rapor edilmiştir (37, 38).

3 - Örneğin uygun olmayan şartlarda alınması: Hastadan kan alma işleminin eğer dik pozisyonda yapılacak olursa artan hidrostatik basınç nedeni ile intravasküler sıvının hücreler arası boşluğa sızması sonucu protein konsantrasyonlarında bir artış görülür. Hasta kan alma işleminin önce en az 15 dakika oturularak bekletilmelidir. Eğer bu sreden önce kan alımı yapılırsa kalsiyumda 0,2-0,8 mg/dl lik (25, 39) bazı lipoproteinlerde yukarda bahsedilen nedenlerle %5-8' lik bir artış olacaktır (15, 16). Yine aynı şekilde sırt üstü yatan hastalardan alınan kan rneklelerinde ise su ve elektrolitler vasküler boşluğa döneceğinden protein konsantrasyonlarında bir azalma görülecektir (11, 15, 16).

4- Turnike kullanımı: Laboratuvar test sonuçlarındaki değişmelerin kontrolü açısından turnikelerin kullanım pozisyonları önemlidir. Turnikeler venlerden kan almada ana damarın tesbiti ve genişlemesi amacı ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Turnike uygulanan damarda, oluşan basınç nedeni ile sıvı hareketi hemen hemen durma noktasına gelir. Bu da laboratuvar test sonuçlarını etkiler. Turnike uygulanmasından yaklaşık 1 dk sonra ekstrasellüler sıvı boşluklarına su ve elektrolit geçişinin yavaşlaması ile hücrelerdeki protein ve proteine bağlı maddelerin konsantrasyonlarında bir artma olacaktır. Turnikeden 3 dk sonra tahminen bu artış % 5-8; eğer turnike süresi 15 dakikaya kadar uzarsa, bu oran %15'e kadar çıkabilecektir. Ayrıca turnikenin neden olduğu kan akımının yavaşlaması ile dokularda metabolizma tarafından üretilen [H⁺] ve laktat konsantrasyonlarında bir artış gözlenecektir. Bu da venöz kanda laktat konsantrasyonunda yalancı bir artışa neden olacaktır (37, 38).

Kan alımında turnikeye alternatif olarak önerilen hastanın yumruğunu sıkıp, gevşetmesi ise hiperkalemiye neden olacağından bir başka problem sebebidir (38, 40).

5- Açlık ve tokluğun etkisi: Mümkünse bütün biyokimyasal analizler için açlık rneği tercih edilmelidir. Tokluktan etkilenen testler arasında glukoz, trigliserit. total

kolesterol, total bilirubin, demir, amilaz, lipaz sayılabilir (30). Trigliserit ve kolesterolde 12 saatlik açlık periyodu diğer testler için ise en az 8 saatlik açlık periyotları gereklidir. Bu analitlerin açlık ve tokluk değerleri farklıdır. Bu farklılık glukozda yemek yemeyi takiben 1. saat'e kadar % 12; tokluktan 1 saat sonrasında ise %34' e kadar çıkabilir (24, 28) Trigliserit ve kolesterolde ise %20' ye kadar fark oluşur (11, 30). Amilaz, lipaz ve total bilirubinde ise sabah açlık sekresyonunun dikkate alınması gerekir. Bu testlerde tokluğu takip eden sekresyondaki artışlar hatalara neden olmaktadır (30).

ANALİZ SONUCUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Bir reaksiyon ortamını bozucu maddelere genel olarak interferenler denir. Bunların başlıcaları hemoliz, ikter ve lipemidir.

HEMOLİZİN OLUŞUM NEDENLERİ

Hastadan kan alımı sırasında veya sonradan nisbeten nazik ve hücre membranları yırtılmaya meyilli olan eritrosit hücrelerinin bir kısmının parçalanması ile hemoliz dediğimiz olay oluşur (6, 12). Hemoliz ile eritrosit hücre içeriğinin bir kısmı veya tamamı serum veya plazmaya geçer.

Serumda Hb>200 mg/dL ise gözle görülür hemoliz vardır buna in vitro hemoliz denir. Hemolizin sebepleri ve sonuçlara etkileri aşağıda özetlenmiştir (6, 12, 41-47).

a-Hastadan kan alımı sırasında kullanılan dezenfektan maddelerin kurumasını beklemeden kan almak.

b- Kan örneğinin tüplere boşaltılırken kuvvetli bir tazyik ile boşaltılması.

c- Antikoagulan maddelerle hızlı bir şekilde karıştırma

d- Enjektörlerde kullanılan iğnelerin çaplarının küçük olması

e- Kan alma işleminin hızlı yapılması

f- Tüplere örneklerinin boşaltıldıktan sonra bazı mekanik hareketlere

(çalkalama, sallama v.b.) maruz bırakılması

g- Uygun olmayan şartlarda ve santrifüj aletlerinde santrifüjleme.

e- Uygun olmayan tüplere (ıslak, sürekli kullanılan tüpler gibi) kan örneklerinin alınması.

i- Kan alınır alınmaz pıhtılaşmasını beklemeden santrifüjleme şeklinde sıralanır.

HEMOLİZİN TEST SONUÇLARINA ETKİLERİ

İki şekilde olmaktadır (43, 45-47).

a - Eritrosit hücre muhteviyatının bir sızıntı veya yırtılma ile dışarı çıkması ve serumla kontaminasyon oluşturması.

b - Eritrositlerin yırtılması ile seruma geçen hemoglobinin ışığı absorblaması ile birçok spektrofotometrik ölçümlerde yanlış değerlerin elde edilmesi.

İkterik serumlarda yüksek seviyelerde hemoliz olsa bile (bilirubinin renginden dolayı) hemoliz gözle farkedilemeyebilir (46). Hemoglobin değeri serumda yaklaşık 3 g/L olduğunda mevcut eritrositlerin yaklaşık %V lik bir kısmının parçalandığı varsayılır. Bu da analitlerde çeşitli değişmelere neden olur.

Serum Mg, asit fosfataz ve Zn değerlerinde in vitro hemoliz sonucu yalancı yüksek değerler gözlenir (43, 44, 48-50). Bromocresol green metodu ile albumin ölçümlerinde yalancı artışlar meydana gelir. Yine aynı şekilde diazo metodu ile bilirubin ölçümlerinde yüksek değerler görülür. Eritrositlerin parçalanması ile seruma geçen adenilat kinaz enzimi, kreatin kinazm (CK) adenozin difosfatlı reaksiyonla ölçümünde bariz bir şekilde yüksek değer elde edilmesine neden olur (47).

Bu büyük hata kaynağı her ne kadar eritrosit muhteviyatından kaynaklansada önemli bir neden de hemoglobin ve hemoglobinden türeyen kimyasal bileşiklerin reaksiyonları etkilemesindedir (51-54).

İKTERİN TEST SONUÇLARINA ETKİLERİ

Normal kişilerin serumlarında 0,3 - 1,0 mg/dL kadar bilirubin bulunur. Hasta örneklerinde bilirubinin yükselmesinden dolayı bir renklenme gözlenir. Serum bilirubin değeri 2,5 mg/dL' yi geçtiğinde test sonuçlarında bilirubinin interferan etkisi gözlenir (46, 51-56). Bu interferan etki safra pigmentlerinin ultraviyole ışığı absorblamaları sonucunda oluşur (56-58). Kolesterol, O-toluidin metodu ile glukoz

ölçümleri, biüret metodu ile protein ölçümlerinde bilirubinin interferan etkileri gözlenmektedir. Kreatinin kinetik Jaffe (alkali pikrat reaksiyonu), direkt enzimatik ölçülmesi (kreatinin Amido hidrolaz) ve peroksidazla kolorimetrik ölçülmesi reaksiyonlarının her üçünde de bilirubinin negatif interferan etkisi gözlenmiştir (55-59). Diğer biyokimyasal analitlerin sonuçlarında da bilirubinin çeşitli etkileri gözlenmiştir (59). Bilirubinin neden olduğu bu etkiyi ortadan kaldırmak için bikromatik ölçüm teknikleri ve örnek körlü ölçümler önerilmektedir (46, 51-53, 57-59).

LİPEMİNİN TEST SONUÇLARINA ETKİLERİ

Öğünlerden 1 saat sonra alınan kan örneklerinde kişinin diyetinin çeşitliliğinin de etkisi ile serum örneklerinde belirgin bir bulanıklık gözlenir. Bazı analitlerin ölçümlerinde şilomikronlar, VLDL ve triglişeritlerden dolayı oluşan bu bulanıklık bariz bir hataya neden olur. Bu hata şilomikronlar, VLDL ve triglişeritlerin oluşturdukları partiküllerin okuma yapılan dalga boylarında ışığı absorblamasından kaynaklanmaktadır (44, 51, 60). Işığın dağılımı, ışık kaynağından dedektöre ulaşan ışık miktarını azaltarak olduğundan yüksek absorbans okumalarına neden olur. Sonuçta analit konsantrasyonunun absorbans artışıyla ölçüldüğü yöntemler için pozitif yönde (gerçek değerden yüksek) absorbans azalışıyla ölçüldüğü yöntemler için negatif yönde (gerçek değerden düşük) hatalı sonuçlar gözlenmektedir. Bu hatayı engellemek için testler örnek körlü olarak çalışmalı veya serum seyreltilmelidir. Son zamanlarda in vitro lipemiyi ortadan kaldıran bazı kimyasal maddeler geliştirilmiştir (deterjan türevleri, lipaz, a-siklodekstrin. CCL4 gibi). Reaktif muhteviyatına katılan bu maddelerden lipaz enzimi triglişeritleri parçalayarak gliserol ve serbest yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olmakta, a-siklodekstrin ise sabun oluşturma özelliğindeki serbest yağ asitlerini bağlayarak lipeminin neden olduğu bulanıklığın giderilmesine katkıda bulunmaktadır (44, 51, 60).

Bazı analizörlerde bu interferan maddelerin tanımlanması ile örnekler otomatik olarak dilüsyon yapılarak çalışılır. Sonuçlara bu etkilerin yansımaları engellenmeye çalışılır. Bunun için analizör örnek körü alır ve bu absorbans total absorbanstan çıkarılarak hata bertaraf edilir. Bütün bunlara rağmen lipeminin etkisi giderilemezse

serum örnekleri 2-8 °C de 10-12 saat bekletilmeli ve üstte biriken şilomikron tabakası ultrasantrifügasyon, organik çözücü ekstraksiyonu, kimyasal çöktürme, diyaliz ile uzaklaştırılmalıdır (14, 46, 51-53, 60, 61).

Bu bulanıklıktan dolayı bromocresol-green metodu ile albumin, cresophthalein metodu ile kalsiyum ve asitli-amonyum molibdat metodu ile fosfor ölçümlerinde yalancı bir artış meydana gelir. Yine yüksek lipemik serumlarda (TG> 400 mg/dL) amilaz aktivitesinde inhibisyon meydana gelir (44, 60-62). Üre ve ürik asit ölçümlerinde üreaz ve ürikaz enzimleri yüksek lipeminin etkisi ile inhibisyona uğrar ve üre, ürik asit değerlerinde anormal şekilde düşük sonuçlar bulunur. Serum TG miktarı 520 mg/dL' yi geçtiğinde protein, bilirubin ve CK değerlerinde yine anormal düşüşler gözlenir (46, 52, 53, 61).

KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE NAKLEDİLMESİ

Üç tip kan örneği vardır. Bunlar arter, kapiller ve venöz kan örnekleridir. Bunlardan arter kanı her zaman için alımının güç olması ve çeşitli zorluklar nedeni ile temin edilemez. Oysa arter kanı bütün vücut dokularını besleyen bir kaynak olması ve oksijen ve diğer vücut için gerekli maddeleri dağıttığı için analiz için kullanılacak en uygun örnektir (6, 7, 12, 14). Kan gazları ve pH analizleri için arteriyel kan şarttır. Venöz kan, arter kana göre daha kolay alman ve temin edilen bir materyaldir; bu yüzden en çok tercih edilmektedir. Venöz kan arter kandan metabolik olarak farklıdır. Metabolizmanın kullandığı oksijen ve glukoz gibi maddelerin ve aminoasitlerin (NH_4^+ ve CO_2) atıklarını ihtiva eder (14, 23, 63).

Kapiller kan genellikle venöz kana göre arterial kana daha yakın muhteviyattadır. Özel bölgelerden (kulak memesi, parmak ucu, ayak topuğu vb.) alınabilir. Daha çok 0-2 yaş çocuklarda tercih edilir. pO_2 yönünden arterial ve kapiller kanda anlamlı farklılıklar vardır. Venöz ve kapiller kandaki bazı maddelerin konsantrasyonlarındaki farklılık dokulardan salınan hormona! etkiden kaynaklanmaktadır. Kapiller glukoz konsantrasyonu venöz kana benzer. Tokluk sonrası insulin konsantrasyonundaki artışa paralel olarak kapiller örneklerde venöz örneklere göre %15 daha yüksek glukoz tesbit edilmiştir (24).

Kan alma elemanları kanın alındığı bu bölgeleri uygun dezenfektan maddelerle temizlemeli ve hemolizden korunmak için bu bölgelerin kurumasını beklemelidirler (11, 16, 63).

Birçok laboratuvarıda kan örnekleri alındıktan sonra özel donanımlı vakumlu tüplere boşaltılmaktadır. Bu tüpler cam veya plastik olabilir. Bu tüplerin ağızları lastik bir kapakla kapatılmış, havaları boşaltılmış ve içerisinde serumun hücre elemanlarından ayrılmasını kolaylaştırmak için inert jeller bulunmaktadır (20, 22-24, 34-38, 40,41,63- 66).

Alınan kan örnekleri laboratuvarlara nakledilmek üzere bu tüplere boşaltılırlar. Bu boşaltma tıpa açılmadan iğne ile delinerek direkt yapılır. Bu işlemler sırasında ilgili personel çeşitli enfeksiyon riskine karşı çok dikkatli davranmalıdır. Eğer normal cam tüpler bu amaç için kullanılacak olursa bunların tekrar yıkanmaları esnasında çeşitli deterjan türevi artıklar kalırlar. Bunlar inorganik fosfatla etkileşerek fosfor sonuçlarında hatalara neden olurlar (42, 66).

Gaz likid kromatografilerde bu kontaminasyonlar yalancı piklerin görülmesine neden olmaktadır (26, 42). Kan örneklerinin asit (HCl gibi) ile yıkanarak temizlenmiş tüplere alınması ve analiz için bu tüplerin kullanılması bir çözüm olarak görülmektedir (42). Yine 24 saatlik idrar örneklerinin bu şekilde yıkanıp temizlenmiş kaplara toplanması eser element analizleri için kontaminasyonu önlemede etkili olacaktır (41,42, 63).

Alman örneklerle doldurulan tüpler ya özel kuryelerle veya çeşitli mekanik nakil sistemleri ile laboratuvarlara nakledilmelidirler. Örneklerin transferi normal oda sıcaklığında yavaş bir şekilde olursa birçok analitte çeşitli metabolik değişimler olacaktır (26, 36, 38, 67). Normal oda sıcaklığında glukozda, glikolitik inhibitörler (florür gibi) olmadan saatte yaklaşık %3 - 5' lik bir kayıp olacaktır (27. 42). Yine aynı şekilde oda sıcaklığında çeşitli proteolizler oluşacaktır ve peptidler bu şekilde parçalanacaklardır (36, 38, 67). Analitlerdeki bu in vitro değişiklikleri önlemek için örneklerin nakli hızlı bir şekilde ve özel taşıma kaplarında soğutulmuş bölmelerde (kuru buz, su-buz v.b.) nakledilmeleri sağlanmalıdır. Bu işlemler bazı analitlerdeki

değişmeyi önleyebilirse de soğukta hücrelerden K salımını engelleyemez (36, 37).

Bu tip metabolik hataları önlemek için kapalı vakumlu tüpler kullanılmalı ve hızlı bir şekilde (kan alımını takip eden 30 dk içerisinde) santrifüj edilerek serum ve hücre elemanlarının birbirinden ayrılması sağlanmalıdır. Bu şekilde ayrılan örnekler daha sonra uygun şartlar altında laboratuvara nakledilmelidir (14, 20, 42, 63, 64, 66, 68).

Uygun bir şekilde dizayn edilen mekanik transport sistemleri bazı laboratuvarlar tarafından kullanılmaktadır. Bu sistemde hızlı bir şekilde örnek laboratuvara nakledilmektedir. Bununla birlikte bu sistemde çeşitli kazalar ve tüplerin aşırı doldurulması nedeniyle eritrositlerin hemen parçalanmaları sonucu hemoliz riski artar (20, 38, 41, 42, 63, 69).

ÖRNEKLERİN ANALİZ İÇİN HAZIRLANMASI

Kan alma merkezlerinden en kısa zamanda laboratuvara nakledilen örnekler hızlı bir şekilde analiz için hazırlanmalıdır. Örnekler toplamadan yaklaşık 20 dk (pıhtılaşma işlemi tamamlandıktan) sonra santrifüj edilmelidir. Bu amaç için örnekler mümkünse soğutmalı bölmeleri bulunan santrifüj cihazlarında 5 - 10 dk. santrifüj edilmelidir. Santrifüjleme esnasında vakumlu tüplerde bulunan inert jel mekanik bir hareketle bir bariyer oluşturarak hücresel elemanlarla serum arasına girer. Bu şekilde hazırlanan serum hastanın istenilen testlerinin özelliklerine göre çeşitli kısımlara ayrılabilir. Bu ayırma işlemleri elle yapıldığında örnekler arası kontaminasyonlara dikkat edilmelidir (12, 14, 20). Özellik arz eden testler ve örnekler barkod sistemi kullanılarak tanımlanmalıdır (20). Örnek hazırlama basamağında yapılacak bir hata bütün analiz basamaklarına yansiyarak sonucu etkileyecektir. Bu noktada çalışacak elemanların iyi seçilmiş olması gerekmektedir (12, 14, 17).

Oda sıcaklığında bekleyen kan örneklerinde glikolizin yavaşça olsa devam etmesiyle yaklaşık olarak saat de %3 - 5' lik bir azalma görülür. Bu süre uzadıkça hücrelerden K ve küçük molekül ağırlıklı enzimler sızar ve organik fosfatlardaki bozulmalarla inorganik fosfatlar oluşur. Takip eden birkaç gün sonunda hemoliz gözlenir.

Örnekler buzdolabında bekletilirse glikoliz inhibe olur fakat enzimler ve potasyumda sızma devam eder. Normalde serum veya plazma K seviyesi 3,5 - 5,5 mmol/L dir. Trombosit sayısına bağlı olarak 0,15 mmol/L' lik bir artış olur. Eğer lösemili hastalarda kan örneklerinde serum ayrılmadan bekletilirse analit sonuçlarında aşırı bir değişme gözlenir (68, 70).

Serumlar analiz edilene kadar laboratuvar içerisinde beklemek zorundadır. Bu bekleme süresince serumlardan buharlaşma ile bir miktar su kaybı olacaktır. Bu analitlerin konsantrasyonlarında belli bir artışa neden olur. Buharlaşma; bir sisteme dışardan belli bir enerjinin verilmesi ile moleküller arası çekim kuvvetinin yenilmesi sonucu sıvı fazdan ayrılan moleküllerin atmosfer basıncını da aşarak sisteme dağılması olayıdır. (71).

Buharlaşmayı Etkileyen Faktörler (72-74)

- 1 - Zaman
- 2 - Çevresel faktörler
- 3 - Örnek kaplarının özellikleri
- 4 - Örneğin özellikleri
- 5 - Kullanılan analitik sistemle ilgili faktörler

ZAMAN

Buharlaşma zamana bağlı bir özelliktir. Bu sebeple zaman buharlaşmanın büyüklüğünü tesbit etmede önemli bir faktördür. Hastadan örneğin alındığı andan kantitatif ölçüm yapılana kadar buharlaşma devam eder ve sonuçta önemli düzeyde analitik hatalara sebep olabilir (72, 75).

ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Örnek kabındaki sıvı örneğin buharlaşmasına etki eden çevresel faktörlerin etkileri iyi bilinmelidir. Bu amaçla çeşitli çalışmacılar bir kısım matematiksel ifadeler çıkarmıştır (72, 73, 75-78). Bu bize geometrik şekli bilinen bir kapdan belli bir zaman sonunda buharlaşma sonucu oluşan sıvı kaybının kantitatif tesbitini yapmayı sağlar. Buharlaşma kayıpları çevre ısısı ile doğru ve nisbi nemle ters orantılıdır. Diğer bir çevresel faktör de hava akımıdır. Hava akımı sıvı yüzeyi

boyunca artarsa buhar bu hava akımıyla süpürülür. Bu şekilde buharlaşmayı artırıcı bir güç oluşturulmuş olur. Bu nedenle örnek kapları sürekli kapalı tutulmalıdır. Bütün bunlara rağmen kapaklı kaplarda bile buharlaşma kayıpları az da olsa meydana gelebilmektedir (72, 73, 77).

ÖRNEK KABININ ÖZELLİKLERİ

Bir örnek kabında bulunan bir sıvının buharlaşması birçok çevresel şartlara bağlı olmasına rağmen kabin geometrik şekli ve fiziksel özellikleri de buharlaşmayı etkilemektedir (75, 77).

Genellikle buharlaşma hızı, sıvının yüzey alanı ile orantılıdır. Ayrıca, sıvı seviyesi kabin üstüne yakın olduğu zaman hava akımları önemli bir etkiye sahiptirler. Bu nedenle en büyük sıvı kayıpları en büyük örnek hacimlerinin olduğu kaplarda olmaktadır (72, 73, 75-77). Nisbi buharlaşma kaybı ile örneklerdeki nisbi sıvı kayıpları orantılanarak analitik hata üzerine etkileri isbat edilebilir (75).

Örnek kaplarının 25, 30 veya 37°C de bekletilmesi kayıpları çeşitli oranlarda etkileyecektir. Bu nedenle kaplar nisbi nem oranı yüksek hava akımlarını olmadığı daha düşük sıcaklıklarda tutulmalıdır. Ayrıca direkt güneş ışığından sakınılmalıdır (73-75, 77, 78).

ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ

Örneklerin fiziksel, kimyasal özellikleri buharlaşma kayıplarına çeşitli şekilde etki eder. Örneklerin çözündüğü çözücünün özellikleri buharlaşma kayıpları açısından önemli derecede etkilidir (75, 77, 78). Biyolojik örneklerin çözündüğü suyun buhar basıncı, difüzyon, yoğunluk, molekül ağırlığı gibi özellikler buharlaşma kayıplarını önemli ölçüde etkilemektedir. Organik çözücülerin kullanıldığı örneklerde buharlaşma kayıplarının daha büyük olması organik çözücülerin buhar basınçlarının sudan daha büyük olmasındandır (73, 75, 77).

Örnek kapları ile örnek arasındaki etkileşimler buharlaşmayı artıracaktır. Şayet kapın yüzeyi ıslak değilse, daha düşük bir sıvı menisküsü oluşacağından, benzer şekilde yüzeyi ıslak kaplardaki daha büyük sıvı menisküsüne göre daha az

buharlaşma görülecektir (75).

Bu zellikler bize buharlaşma kaybındaki azalmayı sağlamak için, kapların geç islanan veya daha az islanan materyallerden yapılması gerekliliğini göstermektedir (75, 77).

KULLANILAN ANALİTİK SİSTEMLERLE İLGİLİ FAKTÖRLER

Analitik sistemin çalışma modu: Cihazlarla ilgili bazı faktörler metod seğimi, kullanılan analizörlerin tipleri, analitik metodlar da buharlaşmaya neden olurlar. Süreklilik arz eden tipteki analizörlerde (flow ve discrete modellerde) referans ve örnekler tamamen aynı şartlarda tahlil edildiklerinden bu tip analizörlerde buharlaşmanın neden olduğu hatalar sonuçlara eşit biçimde yansıtacağından bu hatalar problem olmayabilir.

Bununla birlikte gizli bir hata kaynağı da referans ve serum örneklerinin çözücülerinin özelliklerinden dolayı farklı buharlaşmaya maruz kalmalarıdır. Çünkü referans ve serum örneklerindeki çözücülerin etkileri ile farklı buharlaşma olabilmektedir (75, 79, 80). Batch olarak çalışan discrete tip'deki analizörlerde kimyasal kalibratörler yerine stokiyometrik faktörler kullanıldığında, buharlaşmanın neden olduğu analitik hatalara ilave bir katkı olacaktır. Bu tip analizörlerde mikro hacimli örnekler kullanılması (500 uL den az) ve örnek kaplarına dağıtılmaları esnasında oluşacak hatalar, uzun bir süre test edilmek için örneklerin beklemesi buharlaşmanın etkilerini arttıracaktır. Bu tip analizörlerde örnekler koruyuculu bir ortamda bulunmalıdırlar (72, 73, 75, 76, 79, 80).

Örnekler mümkün olan en kısa sürede analiz edilmelidir. şayet bu yapılamıyorsa, o zaman buharlaşma kayıplarını engellemek için çeşitli koruma şekilleri önerilmektedir. Bunlar; rnek yüzeylerini örterek korumak, örnek kaplarının bulunduğu bloku nisbi nem oranı yüksek kapalı bölmelere koyma, örnek yüzeylerini küçültme ve yüzeyleri inert koruyucu sıvılarla koruma şeklinde sıralanabilir (72, 75, 80-83).

REAKTİF VE ÖRNEĞİN UYGUN BİR ORANDA KARIŞTIRILMASI VE ÖRNEĞİN ANALİZİ

Örnek ve reaktifin doğru bir oranda karıştırılması ile bunu takip eden bir seri reaksiyon sonunda spesifik bir ürün elde edilir. Elde edilen bu ürünün konsantrasyonu örnekteki ilgili analit miktarı veya aktivitesi ile orantılıdır.

İyi bir oranlama yapılmadan yapılacak işlemin sonunda elde edilen ürün konsantrasyonu hatalı olabilir. Bu nedenle daha önceden örnek ve reaktifin ne oranda karıştırılacağı belirlenmelidir (6, 7, 12, 14).



Reaksiyon ortamına fazla miktarda substrat katılırsa oluşacak ürünün yanında bir miktar substrat kalacak bu test maliyetini artıracaktır. Eğer substrat az olursa bu durumda da ortamdaki enzim miktarı tamamen tüketilemeyeceğinden reaksiyon hemen sonlanacak ve hatalı sonuçlara neden olacak ve testin tekrarı gerekecektir. Örnek ve reaktiflerin bu oranlarının otoanalizörlerde ne şekilde kullanıldığı şu şekilde gösterilebilir (12, 14).

a - Discrete test analizörlerinde örnek ve reaktifler ölçülü bir şekilde bir reaksiyon küvetine otomatik şırıngalar veya volumetrik ölçüm yapabilen makineler kullanılarak yapılmaktadır.

b - Diğer bir grup analizörlerde ise örnek ve reaktifler Peristaltik pompalar kullanılarak bir tubing içerisinde belli oranda karıştırılır. Daha sonra bu karışım bir akış yolu vasıtası ile kontrollü bir şekilde reaksiyon küvetine gönderilir.

c - Bir üçüncü tip analizörlerde ise örnek ve reaktiflerin akış yollarında elektronik valfler kullanılarak zaman kontrollü akmaları sağlanmıştır. Reaktif kaplarında reaktifler basınçla akış yoluna itilirken valfler yardımı ile reaktif oranları belli bir zaman içerisinde reaksiyon küvetine akması sağlanır (6, 7, 12, 14).

Hemen bütün otoanalizörlerde örnek ve reaktifler için dizayn edilmiş ince çelik örnek ve reaktif pipetleri kullanılmaktadır. Seviye algılayıcı sensörler vasıtası ile

örnek kapına giren pipet seviyeyi algıladıktan sonra otomatik olarak durur ve belli ölçüdeki örneği aspire eder. Bu sistem örnek kapında yeterli örneğin olmaması durumunda operatöre gerekli mesajı verir ve bu şekilde eksik örnek miktarının neden olduğu hata önlenmiş olur. Bu tip pipetlerde örnek içinde bulunan pıhtılar örnek pipetini tıkayarak bir hata oluştururlar. Bu da eksik miktarda örnek almalarına neden olur. Bu riske karşı pıhtı tanımlayıcı pipetler geliştirilmiştir (9).

Örnek pipetlerinin bir seri örnekte kullanılması eğer iyi bir yıkama sistemi yoksa bir önceki örnek ile kontaminasyon oluşturacaktır. Bu hatalı sonuçlara neden olacaktır. Bu hataları önlemek için örnek ile yıkama materyali arasına inert bir madde veya hava koyan sistemler vardır. Bu tekniklerin kullanılması örnek pipetinin pıhtı ile tıkanma riskini azaltacaktır (9, 12).

ÖRNEĞİN TEST EDİLMESİ VE HESAPLAMALAR

Reaktif ile belli bir oranda karıştırılan örnek şu basamaklardan geçirilerek test edilir.

a - Karıştırma: Bu işlem değişik analizörlerde farklı mekanizmalarla yapılır.

1- Reaksiyon küvetinin mekanik bir hareketle sallanması.

2- Reaksiyon küvetinin herhangi bir karıştırıcı vasıtasıyla mekanik olarak karıştırılması.

3- Reaktif ortamının hava kabarcıkları veya ultrasonik dalgalar vasıtası ile karıştırılması.

4- Reaktifin örnek üzerine boşaltılması esnasında bir tazyik uygulanarak karıştırılması.

Bütün bu sistemler çeşitli otoanalizörlerde değişik şekillerde kullanılmaktadır,

b - İnkübasyon: Otoanalizörlerde bu işlem iki şekilde yapılmaktadır.

1 - Reaksiyon küvetleri sıcaklığı belli derecelere ayarlanabilen (25, 30, 37 °C) bir su banyosunda tutulurlar.

2 - Isıtıcı katı bir blok içerisinde reaksiyon küvetlerini ısıtmak şeklindedir.

Her iki işlemde de tanımlanan sıcaklık değeri aşıldığı zaman devre otomatik olarak kapanır, altına düştüğünde ise yine devre otomatik olarak açılarak ısı istenilen sıcaklığa getirilir buna 'peltier effect' denir.

c - Hesaplamalar: Otomasyonda hesaplamalar iki şekilde yapılır.

1 - Analog hesaplamalar

2 - Dijital hesaplamalar

Analog hesaplamalarda bir sensör tarafından algılanan elektrik sinyalleri kullanılarak değerler pikler halinde gösterilir. Dijital hesaplamalarda ise bu pikler rakamlarla ifade edilir.

SONUÇLARIN RAPOR EDİLMESİ

Hasta örneklerinde istenilen testler yapıldıktan sonra bu test sonuçları rapor formatlarına yazılır. Bu formatlarda sonuç, referans değerler, interferenslerle ilgili çeşitli bilgiler, laboratuvar adı ve teknik sorumlu adı ve hasta ile ilgili bilgiler doktor adı ve ön tanının yazıldığı bilgiler bulunmalıdır (8, 9). Bu sonuçlar iki şekilde transfer edilir:

a - Mekanik yolla

b - Bilgi işlem yolu ile

Mekanik yolla sonuçların transferinde doktorla laboratuvar arasında kullanılan kuryelerden faydalanılmaktadır. Bilgi işlem seçeneğinde ise laboratuvarla, doktor arasında kurulan bilgisayar ağından faydalanılmaktadır. Bu sistemde operatör hasta testlerini otoanalizöre girdikten sonra ilgili doktor bu sonuçları kendi monitöründen izleyebilmektedir. Ayrıca hasta ile ilgili bu bilgiler arşivlenerek hastanın tekrar gelişinde kullanılmaktadır. Bu sistem hızlı veri transferi sağlaması yanında doktorun istediği arşiv bilgilerine kolayca ulaşabilmesini sağlar. Sistem teknik problemlerden etkilenmediği sürece avantajlıdır (6, 7, 11, 12, 14).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda albumin, ALT, AST, glukoz, inorganik fosfor, total kolesterol, potasyum, total protein, trigliserit analitleri için saklama koşullarına göre kan örneklerindeki dayanıklılığı değerlendirildi. Kan alınmadan önce bireylere çalışma hakkında bilgi verildi. Gönüllü bireylere Tablo 1' deki anket soruları soruldu.

Tablo 1: ANKET SORULARI

Sıra No	Soru
	Sorulan Sorular
1	Kronik bir rahatsızlığınız/hastalığınız var mı ? Varsa belirtiniz
2	Devamlı kullandığınız bir ilaç var mı ? Varsa belirtiniz
3	Son 24 saat içinde alkol aldınız mı ?
4	Son 1 saat içinde sigara içtiniz mi ?
5	Sabah egzersizi yaptınız mı ?

Çalışma Grubu: 18-60 yaş arası; erkek [n=15, yaş ort:38(29-46)]; kadın[n=7, yaş ort:36(27-44)] olmak üzere 22 sağlıklı bireyin kan örnekleri 8.00-10.00 arasında alındı ve şekil 1' de gösterildiği gibi yürütüldü.

Ölçülen Analitler: Glukoz, AST, ALT, Total Protein, Potasyum, İnorganik Fosfor, Total Kolesterol, Trigliserit, Albumin.

KULLANILAN CİHAZLAR

- Masa üstü santrifüj (NF 1200, Nüve. Türkiye)
- Analizör: Modular P (Roche/Hitachi, Japonya)
- Otomatik pipet (10-100 ul) (Isolab, Almanya)

KULLANILAN ANALİZ KİTLERİ

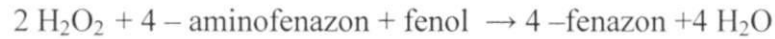
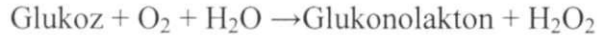
- Albumin (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 682913)
- ALT (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 684956)
- AST (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 684121)
- Glukoz (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 689381)
- İnorganik fosfor (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 682623)
- Total kolesterol (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 682883)
- Potasyum (Roche Diagnostics. Mannheim Almanya katalog no: 10825441)
- Total protein (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 682017)
- Trigliserit (Roche Diagnostics, Mannheim Almanya lot no: 678670)

SARF MALZEMELER

- Heparinli tüp (Vacutainer lityum heparinli tüp 5 ml İngiltere)
- Jelli vakumlu tüp (Vacutest jelli vakumlu tüp 8 ml, İtalya)
- 2,5 ml lik gode
- Parafilm 'M' Laboratory film, Chicago.

ANALİTLERİN ÇALIŞMA YÖNTEMLERİ

GLUKOZ:



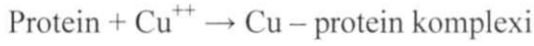
Glukoz. atmosferik oksijenin mevcudiyetinde glukoz oksidaz tarafından glukonolaktone oksitlenir. Açığa çıkan hidrojen peroksit, peroksidazın. 4-amino-fenazon ve fenolün mevcudiyetinde 4 - fenazona oksitlenir. Kırmızı boyanın renk yoğunluğu glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak tespit edilir (enzimatik kolorimetrik metod) (84). (Referans aralık: 55-115 mg/dl)

ALBUMİN:



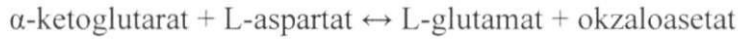
pH değeri 4,1' de albumin bromokresol yeşil (BCG) ile mavi-yeşil kompleks oluşturmak üzere bağlanmasını sağlayacak yeterli katyonik karakter sergiler. Mavi-yeşil rengin renk yoğunluğu albumin konsantrasyonu ile direkt orantılıdır ve fotometrik olarak tespit edilebilir (kolorimetrik yöntem) (85). (Referans aralık: 3,4-5 g/dl)

TOTAL PROTEİN:



Bakır, alkali çözeltisinde karakteristik mor renkli biüret (peptid bağına benzeyen ve Cu^{2+} iyonları ile proteinlerin verdiği reaksiyona benzer bir renkli kompleks oluşturan madde) yapısını oluşturacak şekilde proteindeki peptid bağlarıyla tepkimeye girer. Oluşan renk yoğunluğu, fotometrik olarak belirlenebilen protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (kolorimetrik yöntem) (86). (Referans aralık: 6.4-8.3 g/dl)

ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ (AST)

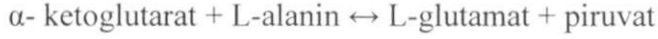


AST enzimi bu denge reaksiyonunu katalize eder. Piruvattaki artış, laktat dehidrojenaz tarafından katalize edilen gösterge reaksiyonunda belirlenir.



NADH, NAD' ye oksitlenir. Fotometrik olarak tespit edilen NADH azalma oranı piruvat oluşum oranıyla ve buna bağlı olarak da AST aktivitesi ile doğru orantılıdır (87). (Referans aralık: 15-40 IU/L)

ALANIN AMİNOTRANSFERAZ (ALT)



ALT enzimi bu denge reaksiyonunu katalize eder. Piruvattaki artış, laktat dehidrojenaz tarafından katalize edilen gösterge reaksiyonunda belirlenir.



NADH, NAD' ye oksitlenir. Fotometrik olarak tespit edilen NADH azalma oranı piruvat oluşum oranıyla ve buna bağlı olarak da ALT aktivitesi ile doğru orantılıdır (88). (Referans aralık: 10-50 IU/L)

TRİGLİSERİT:



Oluşan hidrojen peroksit 4-aminofenazon ve 4-klorofenol ile kırmızı bir boya maddesi oluşturmak için peroksidazm katalitik etkisi altında reaksiyona girer (enzimatik kolorimetrik yöntem) (89). (Referans aralık: 40-200 mg/dl)

T. KOLESTEROL:



Açığa çıkan hidrojen peroksidaz, peroksidazm katalitik etkisi altında 4-aminofenazon ve fenol ile reaksiyona girerek kırmızı bir boya oluşturur. Renk yoğunluğu kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak tespit edilebilir (90). (Referans aralık: 140-200 mg/dl)

İNORGANİK FOSFOR:

İnorganik fosforun, sülfirik asit mevcudiyetinde amonyum molibdat ile amonyum fosfomolibdat kompleksi oluşturmasına dayanan örnek boşaltma ile end point yöntemine dayanmaktadır (91). (Referans aralık: 2,7-4,5 mg/dl)

POTASYUM:

İSE (İyon Selektif Elektrod) indirekt potansiyometri kullanılmaktadır (92). (Referans aralık: 3,3-5,1 mmol/L)

Tablo 2: Test kit kılavuzlarında belirtilmiş olan örnek tipleri ve analitlerin dayanıklılık süreleri

TEST	ÖRNEK TIPI	ÖRNEĞİN STABİLİTESİ
Albumin	Serum, plazma (heparin, EDTA)	15-25°C 2.5 ay, 2-8°C 5 ay, (-15)-(-25)°C 4 ay
Total protein	Serum, plazma (heparin, EDTA)	2-8°C 3 gün, (-15)-(-25)°C 6 ay
ALT	Serum, plazma (heparin, EDTA)	15-25°C 3 gün, 2-8°C 7 gün, -70°C 7 gün<
ASI	Serum, plazma (heparin, EDTA)	15-25°C 24 saat, 2-8°C 7 gün
Glukoz	Serum, plazma (heparin, EDTA)	15-25°C 8 saat, 2-8°C 72 saat
T.Kolesterol	Serum, plazma (heparin, EDTA)	2-8°C 5-7 gün, (-15)-(-25)°C 3 ay
Trigliserit	Serum, plazma (heparin, EDTA)	2-8°C 5-7 gün, (-15)-(-25)°C 3 ay
Potasyum	Serum. Plazma (lityum heparin)	2-8°C 2 hafta
I. Fosfor	Serum, plazma (heparin, EDTA)	20-25°C 8 saat, 2-8°C 24 saat. -20°C 1 yıl

ÖRNEK TOPLANMASI ve ÖLÇÜMLER:

Örnek Tipleri ve Dayanıklılık Deneyi İçin Örneklerin İşlenme Durumları

ÖRNEK TİPLERİ:

Serum: Jelli vakumlu tüpler içine, her bireyden 6 tam kan alındı. 22 bireyden toplam 154 serum örneğinde 9 analit düzeyi ölçüldü.

Plazma: Lityum heparinli tüpler içine, her bireyden 6 tam kan alındı. 22 bireyden toplam 154 serum örneğinde 9 analit düzeyi ölçüldü.

ÖRNEK HAZIRLAMA:

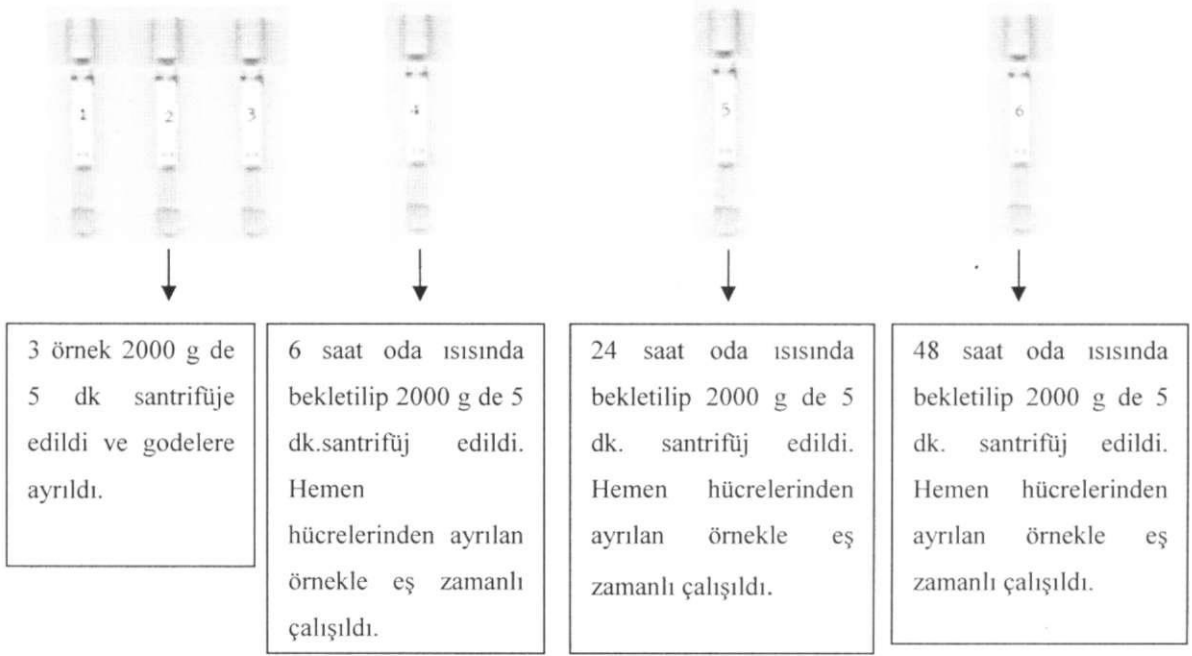
Serum Örnekleri: İlk 3 örnek 20 dakika beklendikten sonra 2000 g de 5 dakika santrifüj edildi. Bir tanesi hemen analiz edildi. 0. saat örneğidir. Diğer örnekler 6. 24. ve 48. saatlere kadar bekletildi. Tablo 3' te gösterildiği saatlerde ölçümler yapıldı.

Plazma Örnekleri: Antikoagülanlı kan örneklerinden ilk üçü hemen santrifüj edildi. Bir tanesinde hemen ölçüm yapıldı. Bunlar 0. saat ölçümler olarak adlandırıldı. Diğerleri 6. 24. ve 48. saatlerde tekrar ölçüldü. Diğer 3 antikoagülanlı örnek Tablo 3' te şematize edildiği gibi santrifüj edildi ve ölçüldü.

Tablo 3 : Bir bireyin örneğinin santrifüj ve ölçüm zamanları (n=22 birey)

ÖRNEKLER		OLCUM ZAMANI							
		0.saat		6. saat		24. saat		48. saat	
		santrifüj	ölçüm	santrifüj	ölçüm	santrifüj	ölçüm	santrifüj	ölçüm
1	serum	x	x		x				
	plazma	x	x		x				
2	serum	x					x		
	plazma	x					x		
3	serum	x							x
	plazma	x							x
4	serum			x	x				
	plazma			x	x				
5	serum					x	x		
	plazma					x	x		
6	serum							x	x
	plazma							x	x

Bekletme Koşulları: Tüm örnekler oda sıcaklığında (25-28°C), kapalı tüplerde bekletildi. Oda ısısı klima 26 °C ye ayarlanarak sağlandı. Termometre kullanılarak 4 saatte bir kontrolleri yapıldı.



Şekil 1: Çalışma planının şematik görünümü

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bekleme sürelerinde yapılan ölçümlerin sonuçları arasındaki ilişki ve değişim derecesi Friedman iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile değerlendirilmiştir. Aynı kişilerden farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerin değerlendirilmesinde kullanılması nedeniyle bu istatistiksel yöntemler uygulanmıştır.

KLİNİK OLARAK ANLAMLILIK:

1- Kabul edilen toplam hata kriterlerine göre: Bekleme sürelerinin neden olduğu değişikliklerin klinik anlamlılığı ABD Klinik Laboratuvarlar Geliştirme Önlemleri (Clinical Laboratory Improvement Amendments-CLIA 88) yasası toplam hata kriterlerine göre değerlendirildi (93).

2- Anlamli değişim sınırına (Significant Change Limit-SCL) göre:

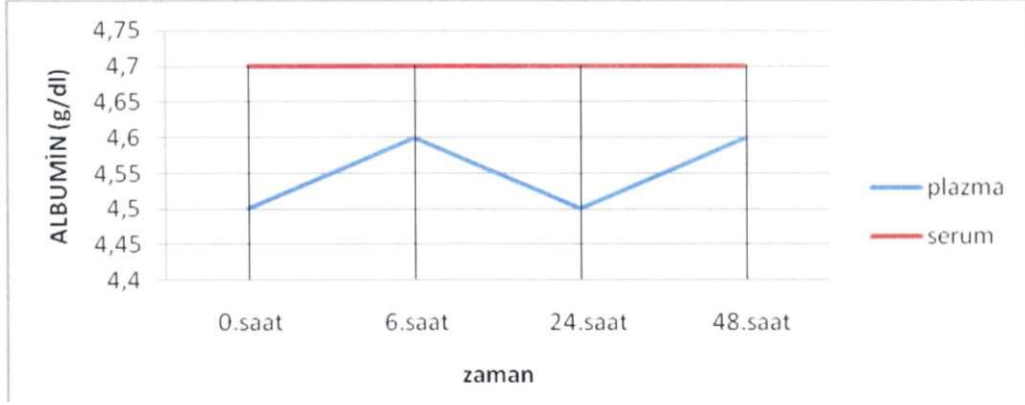
SCL= ilk değer \pm 2.8SD formülüne göre bekleme sürelerindeki değişiklikler hesaplandı (94). Standart sapma değerleri, laboratuvarımızda çalışma süresindeki günlerarası standart sapma değerlendirildi.

ETİK KURUL RAPORU: Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Başkanlığımın izni ile 1 Mayıs-30 Mayıs 2007 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi kan alma ünitesine başvuran bireyler arasında yapıldı.

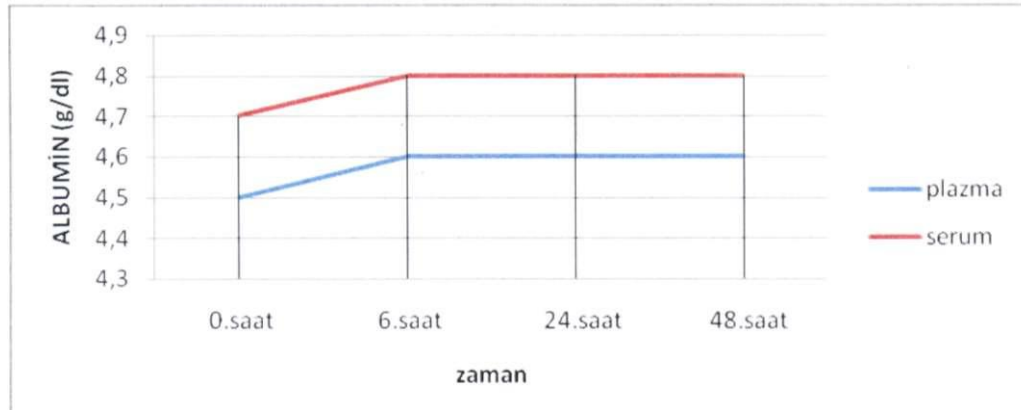
BULGULAR

Çalışmamızda hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerle ölçüm sonuçları Tablo 4 ve Tablo 5' de özetlenmektedir.

Hemen ayrılan örnekler



Bekletilen örnekler

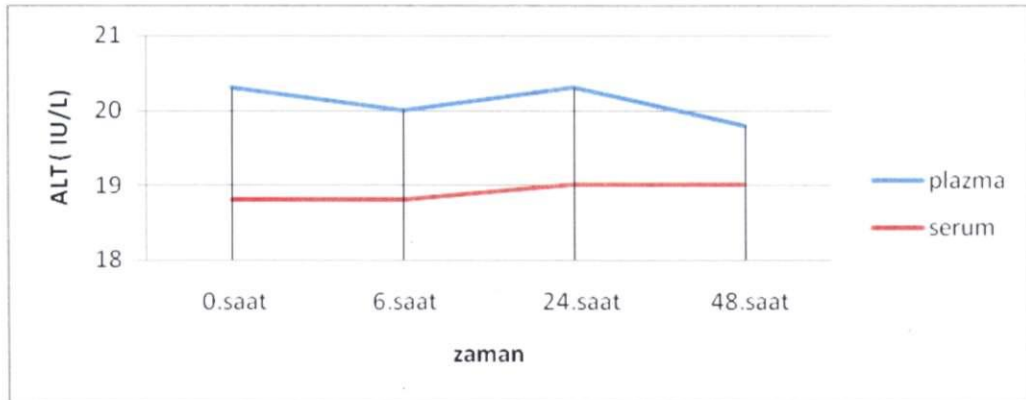


Şekil 2: Albumin düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler

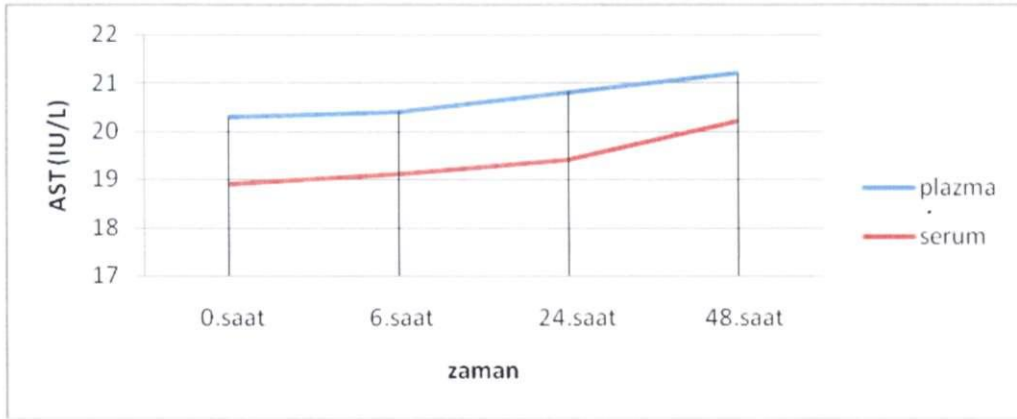


Bekletilen örnekler

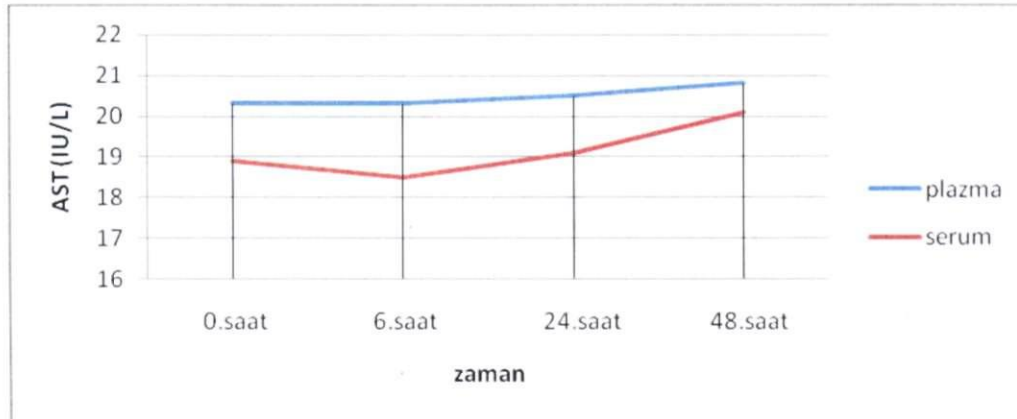


Şekil 3: ALT düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler

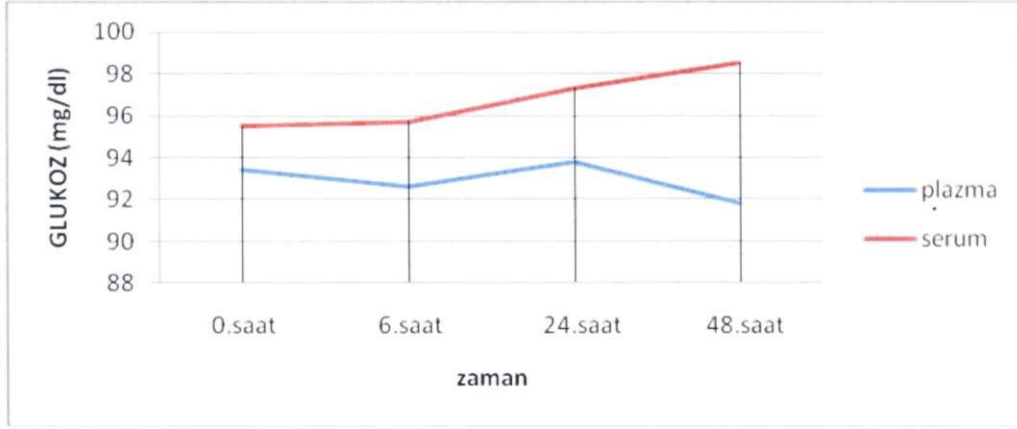


Bekletilen örnekler



Şekil 4: AST düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler

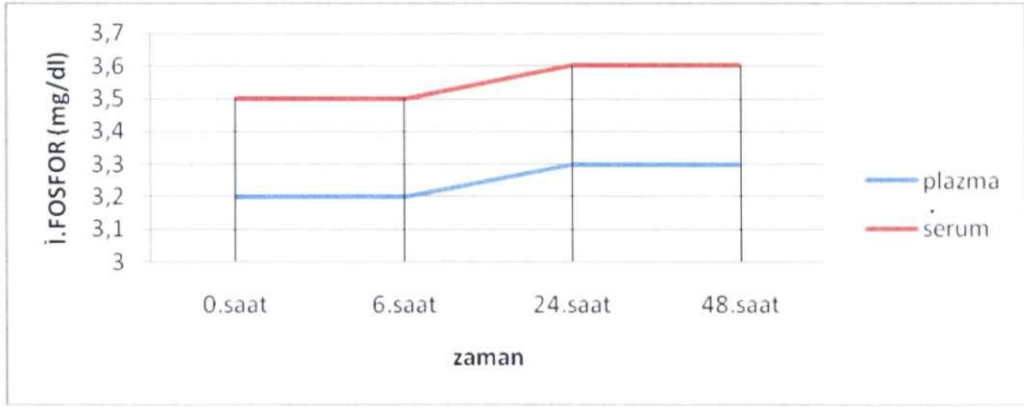


Bekletilen örnekler

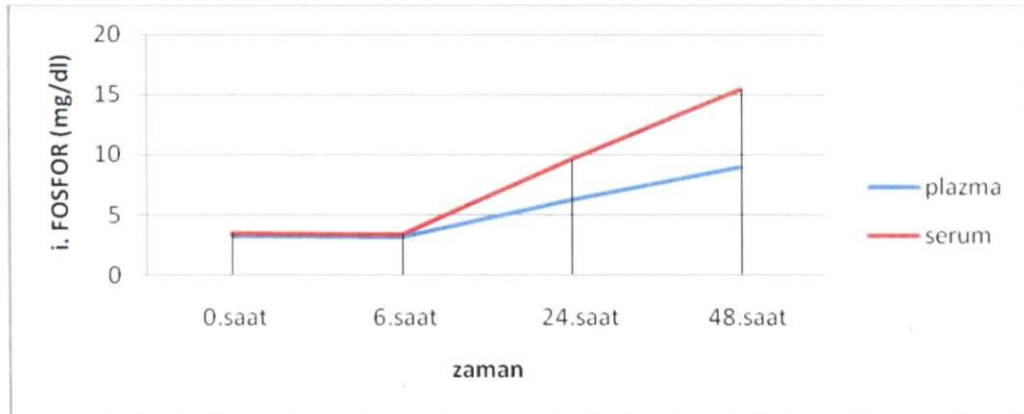


Şekil 5: Glukoz düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler



Bekletilen örnekler

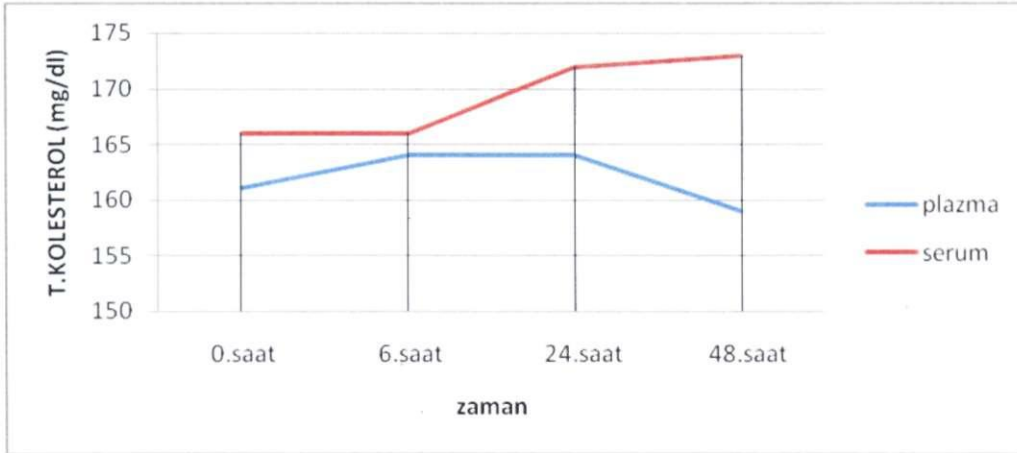


Şekil 6: İnorganik fosfor düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler

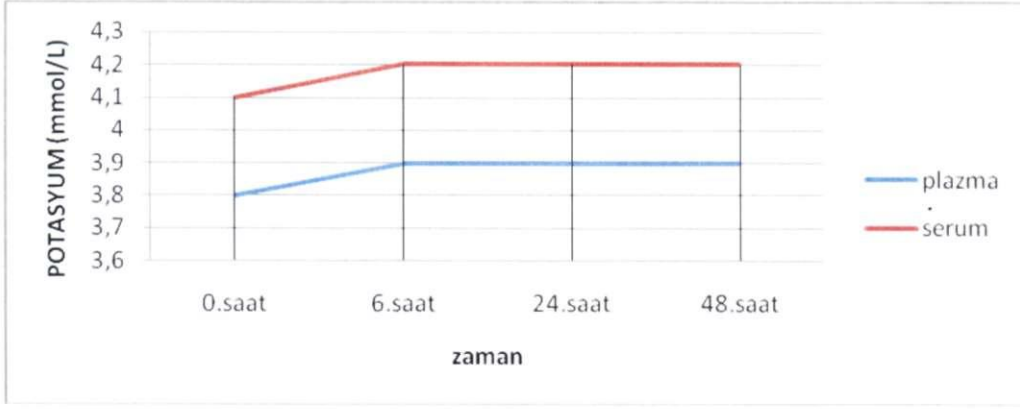


Bekletilen örnekler

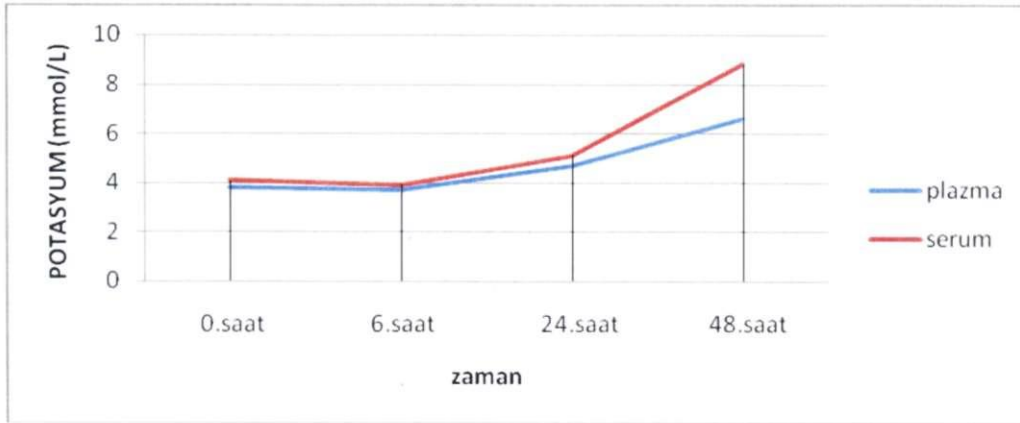


Şekil 7: Total kolesterolün düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler

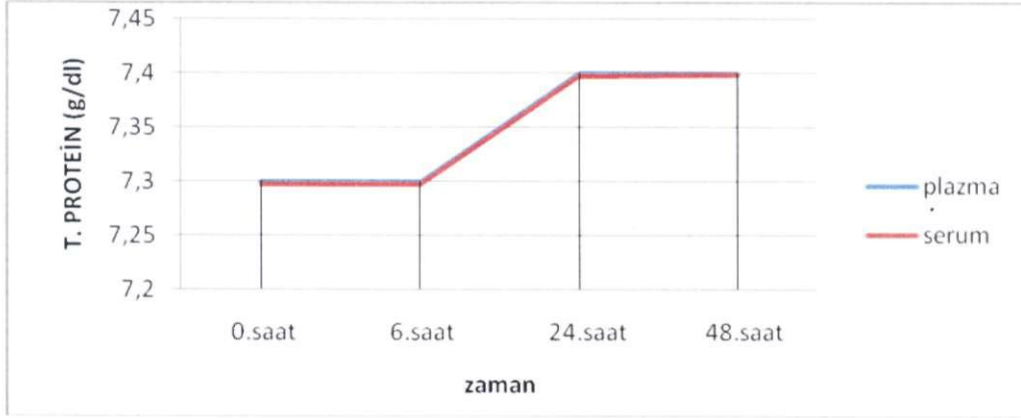


Bekletilen örnekler

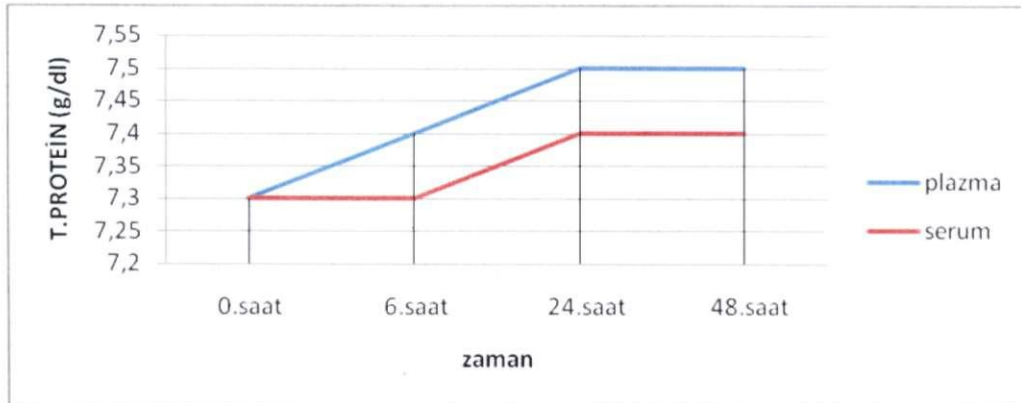


Şekil 8: Potasyum düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler

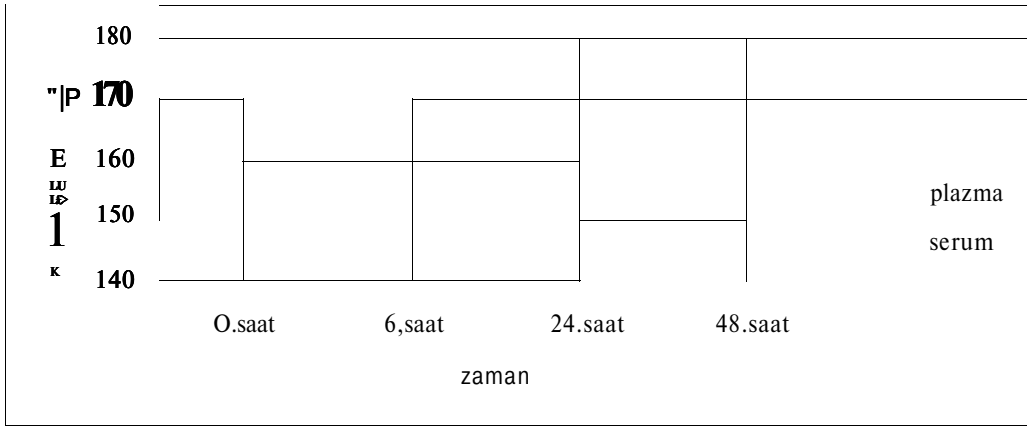


Bekletilen örnekler

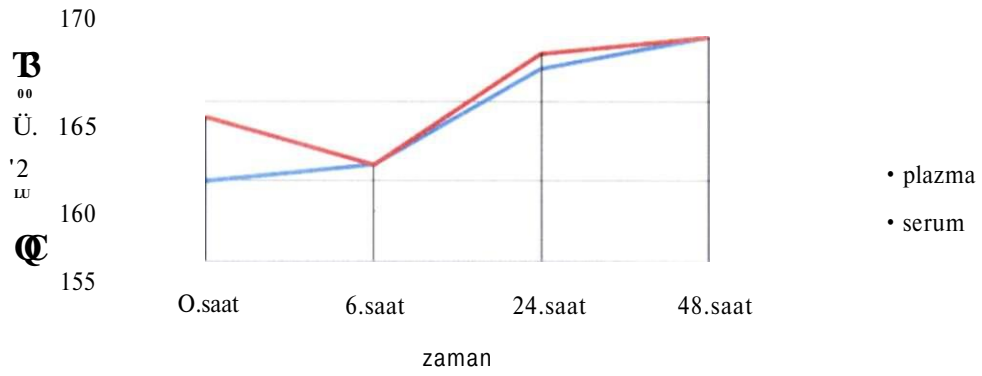


Şekil 9: Total proteinin düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Hemen ayrılan örnekler



Bekletilen örnekler



Şekil 10: Trigliserit düzeylerinin hemen ayrılan ve hücrelerle uzamış temastaki örneklerde değişim durumu

Tablo 4 : Hemen ayrılan örneklerde bekleme süresine göre gözlenen değişimler (birey sayısı n:22)

ANALİT	ÖRNEK	0.saat		6.saat			24.saat			48.saat			p
		ort.	min-maks.	ort.	min-max.	% değişim	ort.	min-max.	% değişim	ort.	min-max.	% değişim	
ALBUMİN (g/dL)	Serum	4,7	4,2-5,2	4,7	8-44	0,0	4,7	7-43	0,0	4,7	8-43	0,0	0,312
	Plazma	4,5	4,0-4,9	4,6	11-44	2,2	4,5	10-42	0,0	4,6 ^a	9-42	2,2	0,005
ALT (IU/L)	Serum	18,8	8-43	18,4	11-29	-2,1	18,1	14-31	-3,7	16,4 ^a	12-30	-12,7	0,0001
	Plazma	20,3	10-43	20,5	14-28	1,0	20,3	16-31	0,0	19,5 ^a	15-32	-3,9	0,01
AST (IU/L)	Serum	18,9	13-30	19,1	69-151	1,1	20,0	73-148	5,8	20,2 ^a	71-142	6,8	0,003
	Plazma	20,3	14-27	20,4	69-145	0,5	20,8	68-142	2,5	21,2 ^a	66-140	4,4	0,0001
GLUKOZ (mg/dL)	Serum	95,5	72-150	95,7 ^a	3,63-5,15	0,2	97,3 ^a	3,69-5,26	1,9	98,5 ^a	3,72-5,27	3,1	0,0001
	Plazma	93,4	70-147	92,6 ^a	3,39-4,58	-0,9	93,8 ^a	3,42-4,61	0,4	91,8 ^a	3,45-4,62	-1,7	0,0001
İ.FOSFOR (mg/dL)	Serum	3,5	2,7-4,5	3,5	2,6-4,7	0,0	3,6 ^a	2,7-4,7	2,9	3,6 ^a	2,8-4,8	2,8	0,0001
	Plazma	3,2	2,4-4,1	3,2	2,6-4,2	0,0	3,3 ^a	2,7-4,2	3,1	3,3 ^a	2,7-4,3	3,1	0,0001
T.KOLESTEROL (mg/dL)	Serum	166	110-261	165	111-262	-0,6	166	114-269	0,0	171 ^a	107-272	3,0	0,0001
	Plazma	161	99-252	159	108-243	-1,2	158	108-244	-1,9	160	112-249	-0,6	0,922
POTASYUM (mmol/L)	Serum	4,1	3,5-5,07	4,2	66-471	2,4	4,2 ^a	67-491	2,4	4,2 ^a	69-496	2,4	0,0001
	Plazma	3,8	3,37-4,54	3,9	62-457	2,6	3,9 ^a	65-466	2,6	3,9 ^a	61-485	2,6	0,0001
T.PROTEİN (g/dL)	Serum	7,3	6,7-8,3	7,3	6,8-8,0	0,0	7,4	6,8-8,7	1,4	7,4 ^a	6,8-8,2	1,3	0,004
	Plazma	7,3	6,6-8,5	7,3	6,7-8,2	0,0	7,4	6,8-8,2	1,4	7,4 ^a	6,7-8,2	1,3	0,0001
TRİGLİSERİT (mg/dL)	Serum	164	64-471	164	4,3-5,2	0,0	175 ^a	4,2-5,3	6,7	177 ^a	4,3-5,1	7,9	0,0001
	Plazma	160	60-460	156	4,0-5,2	-2,5	154	4,0-5,2	-3,8	153	4,2-5,1	-4,3	0,124

a-İstatistiksel olarak anlamlı b-Klinik olarak anlamlı

Tablo 5 : Hücrelerle uzamış temas durumunda analit düzeylerinde gözlenen değişimler (birey sayısı n:22)

ANALİT	ÖRNEK	0.saat		6.saat			24.saat			48.saat			p
		ort.	min-maks.	ort.	min-max.	% değişim	ort.	min-max.	% değişim	ort.	min-max.	% değişim	
ALBUMİN (g/dL)	Serum	4.7	4.2-5.2	4,7 ^a	4,1-5,2	0.0	4.8 ^a	4,8 ^a	2.1	4,8 ^a	4,3-5,3	2.1	0,0001
	Plazma	4.5	4.0-4,9	4,6 ^a	4,0-5,0	2.2	4,6 ^a	4,6 ^a	2,2	4,6 ^a	4,1-5,1	2,2	0,026
ALT (IU/L)	Serum	18,8	8-43	18,8	9-45	0.0	19,0	8-45	1,1	19,0	9-44	1,1	0,896
	Plazma	20,3	10-43	20,0	9-41	-1,5	20,3	1 1-44	0,0	19,8	10-43	-2,5	0,1 18
AST (IU/L)	Serum	18,9	13-30	18,5	12-29	-2.1	19.1	13-30	1,1	19,4	14-30	2,6	0,0001
	Plazma	20.3	14-27	20,3	16-31	0.0	20,5	15-29	1.0	20,8	13-29	2.5	0,139
GLUKOZ (mg/dL)	Serum	95,5	72-150	67,7 ^{ab}	31-120	-29.1	38.0 ^{ab}	8-77	-60,2	21,1 ^{a,b}	2-52	-77,9	0,0001
	Plazma	93,4	70-147	61,3 ^{ab}	34-110	-34.4	24,1 ^{ab}	4-54	-74.2	9.3 ^{ab}	2-30	-90.0	0,0001
İ.FOSFOR (mg/dL)	Serum	3.5	2,7-4,5	3,4	2,4-4,2	-2.9	9,6 ^{ab}	7,4-14,5	174.3	15,4 ^{ab}	11,6-22,5	340.0	0,0001
	Plazma	3,4	2.4-4,1	3,1	1,9-4,0	-8.8	6.2 ^{a-b}	4,3-11,2	82,4	9,0 ^{ab}	6,9-16,4	164.7	0,0001
T.KOLESTEROL (mg/dL)	Serum	166	110-261	166	113-254	0.0	172 ^a	113-278	3.6	173 ^a	116-286	4,2	0,0001
	Plazma	161	99-252	164	104-260	1.9	164	103-257	1.9	159 ^a	109-251	-1.2	0,01
POTASYUM (mmol/L)	Serum	4,1	3.5-5,07	3,9	3,18-4,91	-4.9	5. U ^b	4,34-6,19	24,4	8,8 ^{ab}	7,14-10,65	114.6	0,0001
	Plazma	4,0	3.37-4.54	3,8	2,61-4,08	-5,0	4,1 ^{a,b}	3,56-5,14	17.5	6,6 ^{ab}	5,43-8,68	65,0	0,0001
T.PROTEİN (g/dL)	Serum	7,3	6.7-8.3	7,3	6,6-8,2	0.0	7.4 ^a	6,8-8,2	1.4	7.4 ^a	7,0-8,3	1,4	0,0001
	Plazma	7,3	6.6-8.5	7.4	6,8-8,0	1.4	7.5 ^a	6,8-8,1	2,7	7.5 ^a	6,8-8,1	2,7	0,0001
TRİGLİSERİT (mg/dL)	Serum	164	64-471	161	65-471	-1.8	167 ^a	68-478	2,4	169 ^a	67-484	3.0	0,0001
	Plazma	160	60-460	161	61-478	0.6	167 ^a	59-538	4.4	169 ^a	55-545	5.6	0,0001

a-İstatistiksel olarak anlamlı b-Klinik olarak anlamlı

Hemen ayrılan örneklerdeki değişiklikler CLIA 88 toplam hata kriterlerine göre tablo 6' da gösterilmektedir.

Tablo 6: Hemen ayrılan örneklerde gözlenen değişiklikler

(%)

		CLIA 88	CV _i	CV _G	TE	0-6. saat	0-24.saat	0-48.saat
Albumin	S	10	3,1	4,2	3,9	0,0	0,0	0,0
	P					2,2	0,0	2,2
ALT	S	20	24,3	41,6	32,1	-2,1	-3,7	-12,7
	p					1,0	0,0	-3,9
AST	S	20	11,9	17,9	15,2	1,1	5,8	6,8
	p					0,5	2,5	4,4
Glukoz	S	10	6,5	7,7	6,9	0,2	L9	3,1
	p					-0,9	0,4	-L7
İ.Fosfor	S	15	8,5	9,4	10,2	0,0	2,9	2,8
	p					0,0	3,1	3,1
Kolesterol (T)	S	10	6,0	15,2	8,5	-0,6	0,0	3,0
	p					-L2	-L9	-0,6
Potasyum	S	15	4,8	5,6	5,8	2,4	2,4	2,4
	p					2,6	2,6	2,6
Protein (T)	S	10	2,7	4,0	3,4	0,0	1,4	L3
	p					0,0	1,4	L3
Trigliserit	S	25	21,0	37,2	27,9	0,0	6,7	7,9
	p					-2,5	-3,8	-4,3

CV_i: Birey içi değişkenlik katsayısı CV_G: Bireyler arası değişkenlik katsayısı TE: Toplam hata (95)

Bekleme sonucundaki değişiklikler CLIA 88 toplam hata kriterlerine göre tablo 7' de gösterilmektedir.

Tablo 7: Hücrelerle uzamış temas sonrasında gözlenen değişiklikler

(%)

		CLIA 88	CV _s	CV _G	TE	0-6. saat	0-24.saat	0-48.saat
Albumin	S	10	3,1	4,2	3,9	0,0	2,1	2,1
	P					2,2	2,2	2,2
ALT	S	20	24,3	41,6	32,1	0,0	1,1	1,1
	P					-1,5	0,0	-2,5
AST	S	20	11,9	17,9	15,2	-2,1	1,1	2,6
	p					0,0	1,0	2,5
Glukoz	S	10	6,5	7,7	6,9	-29,1	-60,2	-77,9
	p					-34,4	-74,2	-90,0
İ.Fosfor	S	15	8,5	9,4	10,2	-2,9	174,3	340,0
	p					-8,8	82,4	164,7
Kolesterol (T)	S	10	6,0	15,2	8,5	0,0	3,6	4,2
	p					1,9	1,9	-1,2
Potasyum	S	15	4,8	5,6	5,8	-4,9	24,4	114,6
	p					-5,0	17,5	65,0
Protein (T)	S	10	2,7	4,0	3,4	0,0	1,4	1,4
	p					1,4	2,7	2,7
Trigliserit	S	25	21,0	37,2	27,9	-1,8	2,4	3,0
	p					0,6	4,4	5,6

Hemen ayrılan örneklerde 6. 24. ve 48. saatlerde ölçülen düzeyler, SCL kriterine göre hesaplanan alt ve üst sınırlar içinde saptandı.

Bekleme sonucundaki değişiklikler anlamlı değişim sınırlarına (SCL) göre Tablo 8' de gösterilmektedir. Glukoz düzeyleri alt, inorganik fosfor ve potasyum düzeyleri üst sınırı aştı.

Tablo 8: Anlamlı değişim sınırına göre değerlendirme (SCL: ilk değer \pm 2.8SD)

Analit		SCL	Alt	Üst	6. saat	24.saat	48.saat
Albumin	S	4,7 \pm 0,56	4,14	5,26	4,7	4,8	4,8
	P	4,5 \pm 0,56	3,94	5,06	4,6	4,6	4,6
ALT	S	18,8 \pm 4,2	14,6	23	18,8	19,0	19,0
	p	20,3 \pm 4,2	16,1	24,5	20,0	20,3	19,8
AST	S	18,9 \pm 3,6	15,3	22,5	18,5	19,1	19,4
	P	20,3 \pm 3,6	16,7	23,9	20,3	20,5	20,8
Glukoz	S	95,5 \pm 9,1	86,4	104,6	67,7	38,0	21,1
	P	93,4 \pm 9,1	84,3	102,5	61,3	24,1	9,3
İ.Fosfor	S	3,5 \pm 0,36	3,14	3,86	3,4	9,6	15,4
	P	3,2 \pm 0,36	2,84	3,56	3,1	6,2	9,0
Kolesterol(T)	S	166 \pm 7,28	158,72	173,28	166	172	173
	P	161 \pm 7,28	153,72	168,28	164	164	159
Potasyum	S	4,1 \pm 0,22	3,88	4,32	3,9	5,1	8,8
	P	3,8 \pm 0,22	3,58	4,02	3,7	4,7	6,6
Protein (T)	S	7,3 \pm 0,5	6,8	7,8	7,3	7,4	7,4
	P	7,3 \pm 0,5	6,8	7,8	7,4	7,5	7,5
Trigliserit	S	164 \pm 10,44	153,56	174,44	161	168	169
	P	160 \pm 10,44	149,56	170,44	161	167	169

TARTIŞMA

Bir test için laboratuvar süreci, örneğin alınmasından raporlanmasına kadar geçen basamakları içerir. Bu basamaklar analiz öncesi (preanalitik), analiz (analitik), analiz sonrası (post analitik) olarak gruplanabilir. Her basamak aynı zamanda potansiyel bir hata kaynağıdır. Bu hataların önemli bir kısmı analiz öncesi basamağına aittir. Preanalitik hata kaynaklarının en az kontrol edilebilir olması bunun nedenidir. Analitik basamak kalite kontrol prosedürleriyle kontrol edilebilirken, preanalitik dönemde hata ve ya hatanın ne zaman ortaya çıktığı sıklıkla belirlenememekte böylece test sonucumuzun hastanın gerçek sonuçları ile uygun olmadığı durumlar gelişebilmektedir.

Biz çalışmamızda preanalitik hata kaynaklarından, hücrelerinden hemen ayrılmayan örneklerdeki analit düzeylerinin stabilitesini değerlendirdik. Stabilitenin belirli bir dönem boyunca belli koşullar altında, ortalama değışikliğıin elde edilen verilerin standart sapmasından daha düşük olmasıdır. Klinik kimyada stabilitenin kritik değeri vardır fakat bu yöndeki çalışmalar ihmale uğramıştır (96).

Laboratuvarımıza analiz edilmek üzere gelen örneklerin bir an evvel santrifüj edilip hemen çalışılmaması test sonuçlarını olumsuz etkilemektedir. Bu durum sonuçların klinisyene yanlış ulaşmasına neden olabilmektedir. Serum-pıhtı arasındaki temas süresi uzadığında hem hücrelerin biyolojik aktivitesi hem de analitlerin hücre içerisine geçebilmeleri söz konusu olup bazı analitlerin serum konsantrasyonları değışebilmektedir (97).

Biz çalışmamızda ALT, AST, glukoz, total protein, albumin, total kolesterol, trigliserid, potasyum ve inorganik fosfor olmak üzere dokuz analitin oda sıcaklığındaki (25-28 °C) değışimini santrifüj edilmeden beklenen serum ve plazma örneklerinde 6. 24. ve 48. saatteki değışimlerini hemen santrifüj edilen örnekler ile karşılaştırdık. Böylece bu 9 analitin hücrelerle uzamış temasının sonuçlara olan etkisini araştırdık. Ayrıca bu çalışmamızda hemen santrifüj edilip ayrılan örneklerin yine oda ısısında bekletilip 6. 24. ve 48. saatte tekrar çalışılmasıyla elde edilen

değişiklikleri de saptadık. Bu 9 analiti seçmemizdeki neden bu analitlerin, hastanemiz aylık test çalışma sayılarına göre en fazla sayıda istenen analitler içinde olmasıydı.

Çalışmamıza 18-60 yaş arasındaki bireyler dahil edildi ve kadın-erkek arasında istatistiksel farklılık olmayacağı varsayıldı. Hemolizin bazı biyokimyasal analitler üzerine olumsuz etkisi göz önüne alınarak bu örneklerin çalışma dışı bırakılması planlandı. Bu amaçla tüm örneklerimizin hemoglobinin değerleri ölçüldü. Hemoglobini 5000 mg/L' den daha büyük olan bir örneğimiz olmadığı için başta planladığımız tüm örnekler çalışmaya dahil edildi.

Frank ve arkadaşları (98) yaptıkları çalışmada hemolizin biyokimya sonuçlarına olan etkisini araştırmışlar. Hemoliz oluşumu için serum örneklerine hemolizat eklemişler. Hemoglobinin konsantrasyonları 90-2800 mg/dl olarak ölçülmüş ve 0 ile 4 arasında derecelendirme yapmışlar. Hemolizin en fazla etkilediği analit olarak LDH' ı bulmuşlardır.

Caraway (99) yaptığı çalışmada eritrositlerin plazmanın yaklaşık 160 katı LDH, 20 katı AST ve 23 katı potasyum içerdiğini bulmuş. Laessig ve arkadaşları (100) yaptıkları çalışmada hemolizin bazı biyokimyasal analitler üzerine olan olumsuz sonuçlarını ortaya koymuşlardır.

Sonntag (101) yaptığı çalışmada serumda hemolizat ekleyerek 26 biyokimyasal analit üzerine olan etkisini saptamış. 6,6 g/dl ye kadar olan hemoglobinin konsantrasyonları albumin, kalsiyum, klor, kolesterol, kolinesteraz, kreatinin, demir, glukoz, GGT, ürik asit. üre, sodyum, inorganik fosfor, total protein, transferrin, trigliserit analitlerinde hiçbir interferansa yol açmamıştır. Hemoglobinin varlığında yanlış yüksek değer saptanan parametreleri: LDH (Hb>0.2 g/dl), AST, potasyum (Hb>1.5 g/dl); yanlış düşük değer saptananlar ise bilirubin (Hb>0.8 g/dl) ,ALP (Hb>1.5 g/dl), GGT (Hb>3.0 g/dl) olarak saptamıştı.

Bu yapılan çalışmalar da göstermektedir ki bazı biyokimyasal analitler hemolizden çeşitli derecelerde etkilenmektedir. Biz çalışmamızda bu yüzden her

örneğin hemoglobinin değerini ölçtük (Roche Modular cihazında). Bizim çalışmamızda hiçbir örnek, test sonucunu olumsuz etkileyecek derecede hemoglobin içermemekteydi. Bu yüzden hiçbir örneğimizi çalışma dışı bırakmadık.

	0. saat		6. saat		24. saat		48. saat	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Hemoglobin g/dl	0,12	0,18	0,14	0,28	0,24	0,32	0,30	0,38

Tablo 9: Örneklerin hemo iz değerlendirme sonuçları (serum-plazma)

Çalışmamızda hücrelerle uzamış temas sonrasında, 48 saat boyunca 25-28°C de bekletilen örneklerde klinik olarak anlamlı değişiklikleri glukoz, potasyum ve fosfor analitlerinin düzeylerinde tesbit ettik (SCL ve CLIA 88 kurallarına göre). Bu anlamlı değişikliklerin glukoz düzeyinde 6. saatten, potasyum ve fosfor düzeylerinde ise 24. saatten itibaren başladığını saptadık. Bu sonuçlar bize göstermiştir ki glukoz, potasyum ve fosfor düzeylerinin uzamış temastan etkilenmemesi için bir an evvel örneklerin santrifüj edilerek çalışılması gereklidir.

İstatistiksel olarak ise glukoz, potasyum ve fosforun yanı sıra total kolesterol, trigliserit, total protein ve albumin düzeylerinde de anlamlı farklılıklar olduğunu saptadık. Bu analit düzeyleri istenen örneklerimizin bekletilerek çalışılması durumunda daha dikkatli davranmamız gerektiğini ortaya koyduk. AST ve ALT düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını tesbit ettik. Çalışmamızın 48 saatten daha uzun sürmesi halinde bu analit düzeylerinde de bir takım farklılıkların olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

- a) Glukoz düzeylerindeki düşmeyi glikoliz
- b) İnorganik fosfor düzeylerindeki yükselmeyi intraselüler hidroliz sonucunda eritrositten çıkıp plazmaya geçişi
- c) Potasyum düzeylerindeki yükselmeyi Na-K pompa yetersizliği olarak açıklayabiliriz.

Homeostazda önemli rol oynaması ve metabolizmadaki santral rolü nedeniyle

glukoz kanda en çok ölçülen analitlerden biridir. Glukoz ölçümünde sık karşılaşılan problem; taşıma ve işlem sırasında eritrositlerdeki glikoliz nedeniyle örneklerimizdeki glukoz tüketimidir (102). Bu durumdan kurtulmak için çeşitli yaklaşımlar denenmiştir; örnek toplanmasından sonra hemen plazmanın santrifüjle ayrılması ve başka bir tüpe aktarılması, transport sırasında buzda soğutma (103). tüplere iyodoasetat (104), mannoz (105), florid (106) gibi antiglikolitik ajanların eklenmesi, yatan hastalara hasta yanında ölçüm yapılabilmesi için dizayn edilen glukoz analizörlerinin kullanımı gibi (107).

Örnek toplanması ile analiz sırasında önemli gecikme durumlarında bu yaklaşımlar kullanılabilir ancak çeşitli kısıtlamaları vardır (106). Hasta yanı ölçümü yapan cihazların pahalı olması ve diğer analitlerin ölçümü yapılamadığından uygun olmamaktadır. Glikolizin inhibisyonu ise elektrolit, kreatinin, üre gibi analit düzeylerinde etkilenmelere neden olması, hücresel bütünlüğü bozması (hemoliz) gibi nedenlerden dolayı önemli bir kısıtlamadır (108). Glukoz kaybını engellemek için toplama tüplerine eklenebilen, hücresel bütünlüğü bozmayan ve ortak analitik metodlara uygunluk gösteren antiglikolitik maddenin keşfi oldukça önemlidir (108). Ayrıca bu maddenin kanların toplandığı oda ısısında stabil kalması ve ucuz olmasında önemlidir (108). Hücresel glikolitik enzimleri inhibe eden florid ve ya iyodoasetat kullanımında glikoliz anlamlı oranda azaldığı halde örnek biriktirilmesinden sonraki birkaç saat içinde devam eder (109, 110). Antiglikolitik ajan olarak florid kullanımı hemolize neden olurki bu durumda potasyum gibi glukozla birlikte sıklıkla istenen diğer analitlerin analizi için uygun olmayan bir durum yaratır, mannozun kullanımı ise birkaç glukoz metodunda interferansa neden olmasının rapor edilmesiyle güçlüğü uğramıştır (111, 112). Depolama sürecinde hücresel potasyumun plazmaya geçmesi nedeniyle elektrolit analizi için mannozun kullanımının uygun olmadığına karar verilmiştir (113).

Örneklerin hemen soğutulması ve buzda transportu glukoz konsantrasyonlarını etkili olarak korur ancak taşıma sırasındaki sıkıntıyı arttırmasının yanında soğutma ile metabolizma yavaşlar hücresel potasyum plazmaya doğru hızla difüze olarak 1 saat sonra plazma potasyum konsantrasyonları belirgin olarak artar (103). Uygun antiglikolitik madde kullanımının glukoz düzeylerindeki düşmeyi engelleyeceği.

pentoz-fosfat yolu ile de NADPH oluşumunun devam edeceği, sonuç olarak hücrenin hemoliz olması belli bir süre de olsa engellenerek plazma potasyum ve fosfor düzeylerinin stabilitesinin korunabileceği kanaatindeyiz. Çalışmamızda hücrelerle uzamış temas durumunda klinik olarak anlamlı değişiklikler gösteren glukoz, potasyum ve fosfor düzeylerinin böylece belli sürede olsa stabilitelerinin korunmasında faydalı olacağını göstermektedir.

Çalışmamızda hücrelerle uzamış temas durumunda total protein ve albumin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu bulduk. Bu anlamlı değişiklikler total proteinin hücre içi konsantrasyonunun (16 g/dl), hücre dışına (2 g/dl) göre daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Böylece eritrosit membran bütünlüğünün zamanla bozulması sonucu hücre içinden hücre dışına doğru geçişi söz konusu olabilmektedir.

Total kolesterol düzeyindeki hücrelerle uzamış temas düzeyindeki artışları da aynı şekilde hücre içindeki kolesterolün hücre dışına çıkması şeklinde açıklayabiliriz.

Çalışmamızda ALT düzeylerinin hücre içi konsantrasyonlarının hücre dışına göre daha fazla olması nedeniyle uzamış temas durumunda daha yüksek değerler bulmayı bekledik. Ancak ALT düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler bulamadık. Devam eden glikoliz sonucu oluşan laktat hücre dışına geçer ve LDH enzimiyle piruvata çevrilir. ALT; Alanin + a-ketoglutarat->Glutamat+Piruvat reaksiyonunu katalizler. Piruvatın hücre dışında aşırı çoğalması sonucu bu reaksiyon yavaşlayarak ALT aktivitesi düşmüş olabilir. Bu şekilde bir denge sağlanmış olabilir.

Çalışmamızda hücrelerle uzamış temas durumunda AST ve ALT düzeylerinin hemen ayrılan örneklerle göre stabilitesinin daha iyi olduğunu saptadık. Bu analitlerin hücre içi düzeylerinin hücre dışına göre daha fazla olması zamanla bozulan hücre yapısıyla plazmaya geçerek yüksek sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Ancak oda ısısında aktivitelerindeki düşmeyle bir denge sağlanmış olabilir.

Biz ayrıca hemen santrifüje edilip ayrılan örneklerin oda sıcaklığında bekletilerek 6. 24. ve 48. saatte çalışılmasıyla zaman içindeki değişimlerini de

saptadık.

Trigliserit ve total kolesterolün plazmada, albuminin de serumda stabilitesinde istatistiksel olarak farklılık olmadığı, diğer analitler için ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu sonucuna vardık. Ancak hemen santrifüje edilerek ayrılan örneklerde bütün analitlerin oda sıcaklığında 48 saat boyunca saklanmasında klinik olarak anlamlı olmayan değişimler saptandı. Ancak istatistiksel olarak farklılık olduğu için bu konuda daha dikkatli davranılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda bir kişiden ard arda yapılan ölçümlerin değişiminin değerlendirilmesi amacıyla biyolojik değişkenliğin etkisini inceledik. Biyolojik değişkenlik; birey içi ve bireyler arası değişim olmak üzere T ye ayrılır. Birey içi değişim (CV) aynı kişiye ait sonuçların günler arası değişimini ifade eder. Bireyler arası değişim (CVG) aynı analitin kişiler arası değişimini ifade eder (114).

Çalışılan 9 analit içinde hücrelerle uzamış temastaki örneklerimizde glukoz, potasyum ve fosfor düzeylerindeki değişim yüzdesini biyolojik değişkenlik TE (tablo 6, 7) değerlerinden daha büyük bulduk. Glukoz düzeyi için 6. saatte, potasyum ve inorganik fosfor düzeylerinde ise 24. saatten itibaren bu değişimler anlamlı bulundu. Klinik olarak bu anlamlı farklılıklar CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre bulduğumuz sonuçlarla benzerlik göstermekteydi. Hemen ayrılarak çalışılan örneklerde tüm analitlerdeki değişim yüzdesini biyolojik değişkenlik TE değerlerinden daha düşük bulduk.

Zhang ve arkadaşları (97) yaptıkları çalışmada serum-pıhtı kontakt zamanının laboratuvar sonuçlarına olan etkilerini araştırmışlardır. Her kan örneği 4 adet tüpe alınarak kontrol serumu 30 dk. içerisinde pıhtıdan ayrılarak elde edilmiş, diğer tüpteki kanlar 32 °C de inkübe edilerek 3. 6. ve 24. saatlerde ayrılmış ve toplam 63 analit çalışılmıştır. Bu analitler içinde potasyum, fosfor ve glukozun en az stabil olduğu bulunarak 3 saat içerisinde serumun pıhtıdan ayrılması gerektiğini saptamışlardır. Bizim yaptığımız çalışmada da bu 3 analitin en düşük stabiliteye sahip olduğunu bulmuştuk. Çalışmamızda hem istatistiksel olarak hem de klinik olarak anlamlı değişiklik gösteren sadece bu üç analitti.

Boyanton ve arkadaşları (115) 24 analitin plazma ve serumda santrifüje edilmemiş tüplerde kan hücreleri ile uzamış teması sonrasındaki stabilitesini araştırmışlar. Tüm örnekler bizim çalışmamızda olduğu gibi oda sıcaklığında saklanmış ve 0,5-4-8-16-24-32-40-48-56. saatlerde çalışılmıştır. Plazma ve serumda potasyum, glukoz, inorganik fosfor, kreatinin, albumin, plazmada total protein, total kolesterol, magnezyum, ALT' nin anlamlı değişim limitlerini aştığını bulmuşlardır (SCL kriterine göre). Bizim çalışmamızda farklı olarak ALT' nin plazmada stabilitesini koruduğunu tespit ettik. Bunun nedeninin ise bizim yaptığımız çalışmanın 48. saate kadar sürmesi oysa ki yapılan bu çalışmada ALT için bu farklılığı yaratan ölçümler 48. saat ve 56. saatteki değerlerden kaynaklanmıştı. Aynı zamanda hemen hücrelerden ayrılan örnekleri çalışıp oda sıcaklığında oldukça stabil olduğunu göstermişler. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hücrelerle uzamış temas durumunda glukoz, potasyum ve inorganik fosforda klinik olarak anlamlı fark olmakla birlikte hemen ayrılan örneklerde bu analitler için klinik olarak anlamlı olmayan değişimler göstermekteydi.

Laessig ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (116) 25 analitin oda sıcaklığında saklanıp 1, 2, 4, 8, 24 ve 48. saatlerde çalışılarak serum-pıhtı teması üzerine etkilerini araştırmışlardır. 2 saat beklemeyle LDH, potasyum, glukozda. 8 saat beklemeyle de demir ve klorda anlamlı değişiklikler olduğunu göstermişlerdir.

Chu ve arkadaşları (117) yaptıkları çalışmada oda ısısında 3 günlük serum-pıhtı temas sonuçlarını araştırmışlardır. Depolanan örneklerle 3 saat içerisinde ayrılan serum örneklerini karşılaştırmışlardır. 3 gün sonunda glukoz düzeyinde %60 azalma, inorganik fosfor düzeyinde %180 artma, potasyum düzeylerinde %77 artma olduğunu saptamışlar. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla tutarlılık göstermektedir.

Rehak ve Chiang (118) yaptıkları çalışmada 29 analitin 7 farklı sıcaklıkta 24 saat boyunca değişimlerini incelemişlerdir. Kreatinin, glukoz, inorganik fosfor, potasyum, AST ve ALT" de anlamlı değişimler gözlemlemişler, geri kalan 23 analitin depolama sıcaklığından etkilenmediğini bulmuşlardır.

Heins ve arkadaşları (119) serumda 22 analit üzerine zaman ve sıcaklığın

etkisini araştırmışlardır. 9 °C de 7 gün boyunca depolanan serum örneklerinde inorganik fosfor ve LDH' da German Federal Medicine Council'in rehberine göre izin verilebilen hata payını aşmış, diğer analitler ise stabil kalmıştır. Oda sıcaklığında ise serumda inorganik fosfor, ürik asit, HDL, trigliserit sürekli artış göstermiş bunun yanı sıra bilirubin, LDL, CK ve AST izin verilebilen değerlerden daha fazla azalmıştır. 9 °C de 7 gün boyunca depolanan örneklerde sadece stabil kalan analitler kalsiyum, üre, total kolesterol, HDL, LDL, trigliserit, CK, GGT olarak bulunmuştur. Oda sıcaklığında 3 gün sonra stabilitesini koruyan analitlerse; sodyum, ürik asit, bilirubin, kolesterol, trigliserit, AST, ALT, ALP olarak bulunmuştur.

Hanok ve Kuo yaptıkları çalışmada (120) buzdolabı (10°C) ve derin dondurucuda (-15°C) saklanan serum örneklerinde sıcaklığın bazı analitler üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır. alışmalarının sonunda depolanan serum rneklerinin -15 °C de 3 haftadan daha fazla, 10 °C de ise 5 gün süreyle stabilitesini koruyabildiğini saptamışlardır. Örneklerin bizim sakladığımız derecelerden farklı ısılarda depolanması yönünden çalışmamızdan farklılık göstermektedir.

1981 yılında T.ono ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıcaklığın ve antikoagülan içermeyen kanın serum ile temas süresinin 25 analit üzerine olan etkisini araştırmışlardır (121). alışmalarında 0, 2, 4, 6, 8, 24 ve 48. saatlerde 4. 23. 30 °C sıcaklıktaki ortamlarda serum örneklerindeki değişimlerini analiz etmişlerdir. 48 saat boyunca her 3 sıcaklık değerinde bilirubin, albumin, ALP, total kolesterol, trigliserit, amilaz, BUN, kreatinin, ürik asit ve GGT* nin etkilenmediği saptanmıştır.

Bizim alışmamızda benzer şekilde serumda albumin ve plazmada da total kolesterol ve trigliseridin stabilitesini koruyabildiğini bulmuşduk. Bizim alışmamızda farklı olarak serumda total kolesterol ve trigliseridin stabilitesini koruyamadığını ancak klinik olarak anlamlı değişimler göstermediğini tespit ettik.

Bizim alışmamızda sonuç olarak; oda ısısında (25-28 °C) hücrelerle uzamış temas durumunda glukoz, potasyum ve inorganik fosfor düzeylerinde serum ve plazmada klinik olarak anlamlı farklılıklar olduğunu saptadık. Hücrelerden hemen ayrılan örneklerde ise oda ısısında 48 saat bekletilerek çalışılmasında bu 3 analit

dahil tüm analit düzeylerinde klinik olarak anlamlı bir fark bulamadık. Bu sonuca göre örneklerimizin hücrelerden bir an evvel ayrılarak çalışılması glukoz, potasyum ve inorganik fosfor düzeyinin doğru ölçümleri için son derece önemlidir.

SONUÇLAR

1- Albumin: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre klinik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı. Değişim oranları biyolojik değişkenlik için müsaade edilen toplam hata değerinden daha küçüktü.

2- ALT: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre klinik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı. Değişim oranları biyolojik değişkenlik için müsaade edilen toplam hata değerinden daha küçüktü.

3- AST: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre klinik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı. Değişim oranları biyolojik değişkenlik için müsaade edilen toplam hata değerinden daha küçüktü.

4- Glukoz: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre hücrelerle uzamış temas eden örneklerimizde klinik olarak anlamlı değişiklikler saptandı. Bu anlamlı farklılıklar 6. saatten itibaren gözlendi. Bu örneklerdeki değişim oranları 6. saatten itibaren glukoz düzeyi için belirlenen biyolojik değişkenlik toplam hata değerinden daha büyüktü.

5- İnorganik Fosfor: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre hücrelerle uzamış temas eden örneklerimizde klinik olarak anlamlı değişiklikler saptandı. Anlamlı farklılıklar 24. saatten itibaren gözlendi. Bu örneklerdeki değişim oranları 24. saatten itibaren inorganik fosfor düzeyi için belirlenen biyolojik değişkenlik toplam hata değerinden daha büyüktü.

6- Total Kolesterol: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre klinik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı. Değişim oranları biyolojik değişkenlik için müsaade edilen toplam hata değerinden daha küçüktü.

7- Potasyum: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre hücrelerle uzamış temas eden örneklerimizde klinik olarak anlamlı değişiklikler saptandı. Anlamlı farklılıklar 24. saatten itibaren gözlendi. Bu örneklerdeki değişim oranları 24. saatten itibaren

potasyum düzeyi için belirlenen biyolojik değişkenlik toplam hata değerinden daha büyüktü.

8- Total Protein: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre klinik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı. Değişim oranları biyolojik değişkenlik için müsaade edilen toplam hata değerinden daha küçüktü.

9- Trigliserit: CLIA 88 ve SCL kriterlerine göre klinik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı. Değişim oranları biyolojik değişkenlik için müsaade edilen toplam hata değerinden daha küçüktü.

ÖZET

İnsan plazma ve serum örneklerinde dokuz analit stabilitesinin değerlendirilmesi ve anlamlı değişim sınırlarının belirlenmesi

Dr. Murat Çeliker

Analiz öncesi değişkenlerle ilgili laboratuvar çalışmaları tüm dünyada hala etkinliğini korumaktadır. Plazma ve serum örneklerinin hücrelerden mümkün olduğu kadar kısa süre içinde ayrılması sonuçların doğruluğu açısından oldukça önemlidir. Hemen çalışılmayacak örnekler için en uygun saklama sıcaklıkları 4 °C ve ya -20 °C dir.

Analit stabilitesi, 1950 li yıllardan günümüze kadar önemini hiçbir zaman yitirmemiştir. Test stabilitesinin sağlanmasında örneğin alındığı ve saklandığı ortam ısısı, kan örneğinin şekilli elemanlar ile temas süresinin uzunluğu gibi faktörler rol oynamaktadır.

Biyokimyasal analiz için santrifüje edilmemiş örneklerin bütünlüğü klinik laboratuvarların karşılaştığı genel bir sorundur. Plazma ya da serumun hücrelerle uzun süre teması hatalı test sonuçlarının yaygın bir nedenidir. Bu nedenle plazma ve serum hücrelerden mümkün olduğunca çabuk ayrılmalıdır. Ayırma işlemi hücresel içeriğin devam eden metabolizmasını ve analitlerin plazma ya da serum ile hücresel kompartmanlar arasındaki aktif ve pasif geçişini engeller.

Çalışmamızda; 9 analitin (glukoz, potasyum, fosfor, total protein, albumin, total kolesterol, trigliserid, AST, ALT) plazma ve serum örneklerinde hücrelerle uzamış temasından sonra ve bir an evvel hücrelerden ayrıldıktan sonra, oda ısısında (25-28 °C) bekletilerek çalışılmasında stabilitesindeki değişimleri saptadık. Ayrıca bu analitlerin stabilitesindeki değişimin klinik yoruma olan etkisini gözlemledik.

Çalışmamızda sonuç olarak; hücrelerle uzamış temas halinde glukoz, potasyum ve fosforda klinik olarak anlamlı farklılıklar olduğunu saptadık (CLIA 88 kriterlerine göre). Glukozun stabilitesindeki anlamlı değişimlerin 6. saatteki ölçümlerde potasyum ve fosfor içinse 24. saatteki ölçümlerde olduğunu saptadık. Bu üç analitin

stabilitesinin son derece düşük olduğunu bulduk. Hemen ayrılan örneklerde ise bu analitlerde klinik yorumu etkileyecek düzeyde bir farklılık olmadığını saptadık. Bu da bize göstermektedir ki örneklerimizin bir an evvel hücrelerden ayrılması sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratan ancak klinik olarak anlamlı farklılık göstermeyen analitler için de daha dikkatli davranılması gerektiğini düşünmekteyiz.

SUMMARY

Evaluation of nine analytes stability and determination of their significant variability limits in human plasma and serum samples.

Dr. Murat Olikler

Laboratory studies related to preanalytical variability are still of great importance in all over the world. Separation of serum and plasma from blood cells as soon as possible is very important for the reliability of results obtained. The most suitable temperatures are 4° C or -20° C if the sample will not be used immediately.

Analyte stability issue has not lost its importance since 1950's at all. Some factors such as temperature in which the sample is taken and stored and the duration of the separation time of serum or plasma from blood cells play important role in maintaining the test stability.

Unprocessing of the blood in time is a general problem for the biochemical analysis in clinical laboratories. One of the common cause of wrong test results is the long contact time of serum or plasma with blood cells. The separation enables us not to proceed the metabolic activity of blood cells and the transport of substances between serum and the cells.

In this study we determined changes in the stability of 9 analytes (glucose, potassium, phosphorus, AST, ALT, albumin, triglyceride, total protein, total cholesterol) in plasma and serum after the centrifugation of sample normal and extended time in room temperature (25-28° C). In addition, we observed effects of the change in the stability of these analytes on clinical evaluation.

In conclusion we found that there were significant clinical differences in the stability of glucose, potassium and phosphorus in samples obtained after long contact time (according to CLIA 88 criterias). Significant changes in glucose, potassium and phosphorus were observed in the 6 th, 24. th and 24 th hours respectively. It was found that stability of these three parameters were very weak. There were no

SUMMARY

Evaluation of nine analytes stability and determination of their significant variability limits in human plasma and serum samples.

Dr. Murat (~Jeliker

Laboratory studies related to preanalytical variability are still of great importance in all over the world. Separation of serum and plasma from blood cells as soon as possible is very important for the reliability of results obtained. The most suitable temperatures are 4° C or -20° C if the sample will not be used immediately.

Analyte stability issue has not lost its importance since 1950's at all. Some factors such as temperature in which the sample is taken and stored and the duration of the separation time of serum or plasma from blood cells play important role in maintaining the test stability.

Unprocessing of the blood in time is a general problem for the biochemical analysis in clinical laboratories. One of the common cause of wrong test results is the long contact time of serum or plasma with blood cells. The separation enables us not to proceed the metabolic activity of blood cells and the transport of substances between serum and the cells.

In this study we determined changes in the stability of 9 analytes (glucose, potassium, phosphorus, AST, ALT, albumin, triglyceride, total protein, total cholesterol) in plasma and serum after the centrifugation of sample normal and extended time in room temperature (25-28° C). In addition, we observed effects of the change in the stability of these analytes on clinical evaluation.

In conclusion we found that there were significant clinical differences in the stability of glucose, potassium and phosphorus in samples obtained after long contact time (according to CLIA 88 criterias). Significant changes in glucose, potassium and phosphorus were observed in the 6 th, 24. th and 24 th hours respectively. It was found that stability of these three parameters were very weak. There were no

significant difference, which can affect the clinical evaluation, in the samples separated immediately for those parameters. This means that the prompt separation of serum or plasma from blood cells is quite important for the reliability of results. We also think that parameters which make difference statistically but do not display clinical difference need more careful handling.

KAYNAKLAR

- 1- Bermes EW, Young DS. General Laboratory Techniques, Procedures and Safety. In Burtis CA, Ashwood EW. eds. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia : W.B sounders company 2001 ;2
- 2- Estridge BH, Reynolds AP, Walters NJ. Specimen collection and processing for clinical chemistry. Basic Medical Laboratory Techniques 2000; 395-399
3. Blick KE. Decision-making laboratory computer systems as essential for achievement of total quality. Clin Chem 1997; 43: 908-912
4. Boyd .IC, Felder RA, Savory J. Robotics and the changing face of the clinical laboratory Clin Chem 1996; 42: 1901-1910
5. Asian D, Köseoglu M. Klinik laboratuvarlarda otomasyon 1998; 1: 3-26
6. Pesce MA. Automation. Clinical chemistry : teory, analysis and correlation. In Kaplan LA, Pesce MA eds. Boston : St. Mosby 1996 ; 424-435.
7. Boyd JC, Young DS. Automation in the clinical laboratory. In Burtis CA. Ashwood EW. eds. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia : W.B sounders company 2001; 213-231
8. Lifshitz MS, DeCresce RP. Clinical Laboratory Instrument Selection. Lab med 1990; 21: 367-370
9. Burtis CA, Painter CP. Analytical Systems for the Clinical Laboratory Am Clin Lab 1989; 8:14 -19 February and 1989; 43-49 March
10. Burtis CA. Sample Evaporation and Its Impact on the Operating performance of an Automated Selective-access Analytical system Clin Chem 1990 ; 36 :544-546

11. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved standart procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture. Villanova 1982; 23-56

12. Young DS, Bermes EW. Specimen collection and other preanalytical variables. In Burtis CA, Ashwood ER. eds. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia : W.B sounders company 2001 ; 30 -53

13. Aslan D. Klinik laboratuvarlarda analitik kalite yönetimi. 2001; 2: 3

14. Dufour DR. Sources and control of preanalytical variation. Clinical chemistry : teory, analysis and correlation : In Kaplan LA, Pesce MA.eds. Boston; St. Mosby 1996; 65-81

15. So You're Going to Collect a Blood Specimen: An Introduction to Phlebotomy 5th ed. Northfield, III: College of American Pathologists; 1992. 29. Calam RR. Blood collection. In: Faulkner WR, Meites S, eds. Selected Methods for the Small Clinical Chemistry Laboratory Washington, DC: AACC Press; 1982;9: 1-10.

16. Pendergraph GE. Handbook of phlebotomy Philadelphia Lea and Febiger 1988 ; 23-88

17. Henry JB. Chemistry principles and technic : Clinical diognosis management by laboratory methods. Philadelphia :Harper and Rom 1996; 1-25

18. Columbus RL, Palmer HT. The Integrated blood-collecting system as a vehicle into complete clinical laboratory automation. Clin Chem 1991; 37: 1548-1556

19. Werlert M, Tilzer LI. Putting bar codes to work for improved patient care. Clin Lab Med 1991; 11: 227-238

20. Maffetone MA, Watt SW, Whisler KE. Automated specimen handling bar codes and robotics. *Lab Med* 1990; 21: 436-443
21. Narayanan S. The preanalytic phase an important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 429-452
22. Me Geachin RL, Daugherty HK, Haryon LA, Potter BA. The effect of blood anticoagulant on serum and plasma amylase activities. *Clin Chim Acta* 1957; 2: 75-76
23. Adroque HJ, Rashad MN, Gorin AB, et al. Assessing acid-base status in circulatory failure differences between arterial and central venous blood. *N Engl J Med* 1989; 320: 1312 -1316
24. Irjala K, Koskinen P, Nõntõ V, Peltola O. Interpretation of oral glucose tolerance test: capillary-venous difference in blood glucose and the effect of analytical method. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46 : 307-313
25. Tietz NW, Burtis CA, Duncal P et.al. A reference method for the measurement of Alkaline Phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1983; 29: 751-761
26. Sazama K, Robertson EA, Chesler RA. Is routine antiglycolysis required for routine glucose analysis? *Clin Chem* 1979; 25: 1086-1087
27. Grampietro O, Navalesi R, Buzzigoli G, et al. Decrease in plasma glucose concentration during storage at -20 degrees C. *Clin Chem* 1980; 26: 1710-1713
28. Atkin S, Dasmahapatra A, Jaker MA et al. Fingertstick glucose determination in shock. *Ann Intern Med* 1991; 114: 1020-1024
29. Sullivan JB. Age gradient in blood glucose levels. *Diabetes* 1974; 23: 713-715

30. Ghck MR, Ryder KW. Analytical systems ranked by freedom from intreferece. Clin Chem 1987 ; 33: 1453-1458
31. Tietz NW. Clinical quide to laboratory tests. Philadelphia : WB saunders 1990; 1120-1208
32. Hall RA, Whitehead TP. Adsorption of serum Calcium by plastic sample cups. J Clin Pathol 1970; 23: 323-326
33. Burtis CA. The effects of temperature and evaporation on analytical error in the clinical laboratory. Clin Lab. Annu 1982; 1: 1-35
34. Liskawsky DR. Biological rhythms and shift work. JAMA 1992; 268: 3047
35. Arendt J, Minors DS, Waterhouse JM, eds. Biological rhythms in clinical practice Boston Wright 1989; 231-257
36. Rössing RG, Foster DM. The stability of clinical chemistry specimens during refrigerated storage for 24 hours. Am J Clin Path 1980; 73: 91-98
37. Statland BE, Bokelund H, Winkel P. Factors contributing to intra individual variation of serum constituents: 4. Effect of posture and tourniquent application on variation of serum constituents in healthy subjects. Clin Chem 1974; 20: 1513-1519
38. Stantland BE, Winkel P. Effects of non-analytical factors on the intra-individual variation of analytes in blood of healthy subject consideration of preparation of the subject and time of venipuncture. CRC Crit rev Clin lab Sei 1977; 8: 105-112
39. Robertson WG, Marshall RW. Calcium measurments in serum and plasma total and ionized. Crit Rev Clin Lab Sei 1979; 11: 271-304

40. Don BR, Sebastian A, Cheitlin M, et al. Pseudohyperkalemia caused by fist clenching during phlebotomy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1290-1292
41. Caraway WT, Kammeyer CW. Chemical interference by drugs and other substances with clinical laboratory test procedures. *Clin Chim Acta* 1972; 41: 395-397
42. Calam RR. Reviewing the importance of specimen collection. *J Am Med Technol* 1977; 39 : 297
43. Laessig RH, Hassemer DJ, Raskey TA, et al. The effects of and 0.1 percent erythrocytes and hemolysis on serum chemistry values. *Am J Clin Path* 1976 ; 66: 639-641
44. Dennis WJ, Debra P. Characterization and mathematical correction of hemolysis Interference in selected Hitachi 717 Assays. *Clin Chem* 1993; 39: 1804-1810
45. Frank J.I, Bermes EW, Bickel MJ, Wathins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem* 1978; 24: 1966 -1970
46. Glick MR, Ryder KW, Vroon DH, Masters BE, Sanntog O. Practical uses of serum indices to reduce errors from lipemia, icterus and hemolysis (Abstract) *Clin Chem* 1990; 36: 1008
47. Greenson .IK, Farber SJ, Dubin SB. The effect of hemolysis on Creatine Kinase determination. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 184-185
48. Pai SH, Cry-Manthey M. Effect of hemolysis on chemistry tests. *Lab Med* 1991; 24: 408-410
49. Provasek D, Jay D. Bichromatic determination of hemoglobin on the Hitachi 717 (Abstract) *Clin Chem* 1992; 38: 942

50. Grosset A, Knopp ML, Mayne PD. The effect of hemolysis on the measurement of plasma Alkaline phosphatase activity. *Ann Clin Biochem* 1987; 24: 513-517

51. Randell AG, Garcia WebbP, BeilbyJP. Interference by hemolysis, Icterus and Lipemia in assays on the Beckman Synchron CX-5 and methods for correction. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 345-352

52. Glick MR, Ryder KW. Erroneous laboratory results from hemolyzed, icteric and lipemic specimens. *Clin Chem* 1993; 39: 175-176

53. Glick MR, Ryder KW, Click SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem* 1989; 35: 837-839

54. Glick MR, Rayder KW, Sheila A.I. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986; 32: 470-475

55. Moreno J, Vera MC, Yorio MA. Effect of bilirubin covalently attached to albumin on measurement of serum creatinine. *Clin Chem* 1992; 38: 315-321

56. Lott JA and Dumas BT. Direct and total bilirubin tests: contemporary problems. *Clin Chem* 1993; 39: 641-647

57. Vreman HJ, Verter J, William OH, et al. Interlaboratory variability of bilirubin measurements. *Clin Chem* 1996; 42 869-873.

58. Dumas BT and Eckfeldt JK. Errors in measurement of total bilirubin: A perennial problem. *Clin Chem* 1996; 42: 845-848

59. Beyne P, Letteron P, Herve C, et al. Bilirubin interference with determination of creatinine, lactate, phosphorus and uric acid on Beckman Synchron CX-7. *Clin Chem* 1996; 42: 988-989

60. Creer MH, Ladenson J. Analytical error due to lipemia. Lab med 1983; 14: 351-355
61. Musiala TS and Dubin A. Effect of chylomicrons and their removal on spectrophotometric analyses. Clin Chem 1977; 23: 1121
62. NCCLS publication EP-7-P, Interference testing in Clinical Chemistry. Proposed Guideline Villanova PA. National committee for Clinical Laboratory standards 1986; 341-344
63. Steige H. Jones JD. Evaluation of pneumatic tube system for delivery of blood specimens. Clin Chem 1971; 17: 160-165
64. Feiding P, Hyltoft PP, Horder M. The stability of plasma and serum constituents during simulated transport Scand J Clin Lab Invest 1981; 41:35
65. Doumas BT, Hause LL, Simuncak DM, Breitenfeld D.: Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektochem 700 XR analyzer and evaluation of plasma separator tubes (PST) Clin Chem 1989; 35: 151-153
66. Hill BM, Laessig RH, Hassemer DJ. Comparison of plastic vs. glass evacuated serum-separator (SST) blood-drawing tubes for common clinical chemistry determinations. Clin Chem 1992; 38: 1474-1478
67. Godolphin W, Bodtker K, Uyeno D and Goh LO. Automated blood-sample handling in the clinical laboratory. Clin Chem 1990; 36: 1551-1555
68. Pragay DA, et al. Evaluation of an improved pneumatic-tube system suitable for transportation of blood specimens. Clin Chem 1974; 20: 57-58

69. Dimagno EP, Corle D, Brien JF, et al. Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum. Mayo Clin Proc 1989; 64: 1226-1234

70. Schwartz MK. Interferences in diagnostic biochemical procedures. Adv Clin Chem 1973; 16: 1-6

71. Sankaya Y. Fizikokimya : A. Ü. Fen Fak. kimya bölümü fizikokimya ABD. Ankara : Gazi Büro Kitabevi, 1997; 37-174

72. Loeb HG, Tramell PR, Szepessy G, et.al. Effect of a sample evaporation retordont on enzyme activity results with the Abbott Bichromatic Analyzer-100. Clin Chem 1972; 18: 698-699

73. Burtis CA, Johnson WF and Overton .IB. Automated loading of discrete, microliter volumes of liquids into a miniature fast analyzer. Anal Chem 1974; 46: 786-788

74. Burtis CA, Watson .TS. Desing and evaluation of an anti-evaporation cover for use with liquid containers. Clin Chem 1992; 38: 768-775

75. Burtis CA, Begovich JM, Watson JS. Factors influencing evaporation from sample cups and assessment of their effect on analytical error. Clin Chem 1975; 21: 1907-1917

76. Burtis CA, Johnson WF, Maden JC, et.al. Devolopment of on analytical system based around a miniature fast analyzer. Clin Chem 1973; 19: 895-896

77. Morris G and Andrew S. Study of evaporation losses from test tubes and plastic sample cubs.(Abstract). Clin Chem 1973; 19: 662

78. Glenn GC, Hathaway TK, et.al. Effects of specimen evaporation on quality control. Am J Clin Pathol 1976; 66: 643-652

79. Burtis CA. Sample evaporation and its impact on the operating performance of an automated selective Access analytical system. Clin Chem 1990; 36: 544-546
80. Campbell BG. Evaluation of two types of medically significant error limits and two quality control procedures on a multi channel analyzer. Arch Pathol Lab med 1989;113:834-837
81. Hemphill G. Evaluation of a device for limiting specimen evaporation and carry over on automated instruments (Abstract). Clin Chem 1981; 27: 1045
82. Spandrio L. Preanalytical variability: Evaporation and its effect on measurement error, particularly for sodium and potassium. Quad Sclavo Diagn Clin Lab 1984; 20: 110-121
83. Barnett RN. Error limits and quality control. Arch Pathol Lab Med 1989; 113:829-830
84. 689381 lot nomorah glukoz kit prospektiisii Roche Diagnostics. Mannheim Almanyanya, 2007
85. 682913 lot nomorah albumin kit prospektiisii Roche Diagnostics, Mannheim Almanyanya, 2007
86. 682017 lot nomorah total protein kit prospektiisii Roche Diagnostics. Mannheim Almanyanya, 2007
87. 684121 lot nomorah AST kit prospektiisii Roche Diagnostics. Mannheim Almanyanya, 2007
88. 684956 lot nomorah ALT kit prospektiisii Roche Diagnostics. Mannheim Almanyanya, 2007

89. 678670 lot numaralı trigliserit kit prospektüsü Roche Diagnostics, Mannheim Almanya, 2007

90. 682883 lot numaralı total kolesterol kit prospektüsü Roche Diagnostics, Mannheim Almanya, 2007

91. 682623 lot numaralı fosfor kit prospektüsü Roche Diagnostics, Mannheim Almanya, 2007

92. 10825441 katalog numaralı potasyum kit prospektüsü Roche Diagnostics, Mannheim Almanya, 2007

93. <http://www.westgard.com/cli.htm> erişim tarihi:25.05.2008. CLIA Requirements for Analytical Quality.

94. Passey RB. Quality control for the clinical chemistry laboratory. Clinical chemistry : theory, analysis and correlation. In Kaplan LA, Pesce MA.eds.Boston : St. Mosby, 1996; 387-388

95. <http://www.westgard.com/biodatabasel.htm> erişim tarihi:25.05.2008. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias. Derived from Biologic Variation.

96. Thiers RE, Wu GT, Reed AH, and Oliver LK. Sample stability: A suggested definition and method determination. Clin Chem 1976; 22: 176-183

97. Zhang D.I, Elswick RK, Miller WG. Bailey JL. Effect of serum-clot contact time on Clinical Chemistry laboratory results. Clin Chem 1998; 44: 1325-1333

98. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. Clin Chem 1978; 24(11): 1966-1970

99. Caraway WT. Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. Effect of hemolysis, lipemia, anticoagulants, medications, contaminants, and other variables. *Am. J. Clin. Pathol.* 1962; 37: 445-464
100. Laessig RH, Haessemer DJ, Paskay TA, and Schwartz TH. The effects of 0,1 and 1,0 percent erythrocytes and hemolysis on serum chemistry values. *Am. J. Clin. Pathol.* 1976; 66: 639
101. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24(2): 127-139
102. Sidebottom RA, Williams PR, Kanarek KS. Glucose determinations in plasma and serum: potential error related to increased hematocrit. *Clin Chem* 1982; 28: 190-192
103. Lin YL, Smith CH, Dietzler DN. Stabilization of blood glucose by cooling with ice: an effective procedure for preservation of samples from adults and newborns. *Clin Chem* 1976; 22: 2031-2034
104. Bueding E, Goldfarb W. The effect of sodium fluoride and sodium iodoacetate on glycolysis in human blood. *J Biol Chem* 1942;141:539-544.
105. Nakashima K, Takei H, Nasu Y, Andoh Y. D-Mannose as a preservative of glucose in blood samples. *Clin Chem* 1987; 33: 708-710.
106. Dietzler DN, Smith CH. Carbohydrates. In: Sonnenwirth AC, Jarett L, eds. *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. Vol.1, 8th ed. St. Louis: CV Mosby. 1980; 210⁹
107. Innanen VT, DeLand ME, deCampos FM, Dunn MS. Point-of-care glucose testing in the neonatal intensive care unit is facilitated by the use of the Ames Glucometer Elite electrochemical glucosemeter. *J Pediatr* 1997; 130: 151-155.

108. Landt M. Glyceraldehyde preserves glucose concentrations in whole blood specimens. *Clin Chem* 2000; 46: 1144-1149

109. Chan AYW, Swaminathan R, Cockram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989; 35: 315-317

110. Meites S, Saniel-Banrey K. Preservation, distribution, and assay of glucose in blood, with special reference to the newborn. *Clin Chem* 1979; 25: 531-534

111. Ho CS, Fung SLM, Chan AYW. Interference of D-mannose in glucose measurements by glucose oxidase and hexokinase methods [Letter]. *Clin Chem* 1991; 37: 477

112. van Dijck P, Lievens MM. Interference of D-mannose, antiglycolytic agent, in glucose determinations [Letter]. *Clin Chem* 1991; 37: 1308-1309.

113. Chan AYW, Ho CS, Chan TYK, Swaminathan R. D-Mannose as a preservative of glucose in blood samples. *Clin Chem* 1992; 38:411—414

114. Widjaja A, Morris RJ, Levy JC, Frayn KN, Manley SE, Turner RC. Within and between subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables. *Clin Chem* 1999;45:561-566

115. Boyanton BL, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem* 2002; 48:12, 2242-2247

116. Laessig RH, Indnksons AA, Hassemer D.I, Paskey TA, Schwartz TH. Changes in serum chemical values as a result of prolonged contact with the clot. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 598-604

117. Chu SY, MacLeod J. Effect of three-day clot contact on results of common biochemical tests with serum. *Clin Chem* 1986; 32: 2100.

118. Rehak NN, Chiang BT. Storage of whole blood: effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. Clin Chem 1988; 34: 2111-2114

119. Heins M, Heil W, Withold W. Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:231-238

120. Hanok A, Kuo J. The stability of a reconstituted serum for the assay of 15 chemical constituents. Clin Chem 1968; 14: 58-69

121. Ono T, Kitaguchi K, Takehara M, Shiiba M, Hayami K. Serum constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. Clin Chem 1981; 27: 35-38