

Vakumlu Jelli (SST) ve Vakumlu Düz Tüplerin Bazı Tümör Belirteçleri ve Hormonlar Açısından Karşılaştırılması

[Comparison of Serum Separator Tubes (SST) with Plain Evacuated Tubes for Some Tumor Markers and Hormones]

Aytül Ş. Kılınç
Ahmet Düzoylum
Fırat Uncugil
Doğan Yücel

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı, Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı,
Ankara
doyucel@yahoo.com
Tel: +90-312-363 33 30/1648
Fax: +90-312-362 18 57

Kayıt tarihi 09.06.2003; kabul tarihi 20.12.2003
[Received 09.06.2003; accepted 20.12.2003]

ÖZET

Sağladığı birçok avantaj ve kullanım kolaylığı nedeniyle sağlık kuruluşlarının çoğunda venöz kan örneği toplanmasında uzunca bir süredir vakumlu jelli tüpler kullanılmaktadır. Biz bu çalışmamızda, vakumlu jelli tüplerle, vakumlu düz tüpleri bazı tümör belirteçleri ve hormon sonuçları açısından birbiriyle karşılaştırdık ve separatör jelin sonuçlara önemli bir etkisinin olup olmadığını araştırdık. Beş sağlıklı kişiden vakumlu jelli (Becton-Dickinson, Vacutainer, SST) ve vakumlu düz (Becton-Dickinson, Vacutainer, Z) tüplere örnekler toplandı; 30 dakika bekledikten sonra 1300 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Jelsiz vakumlu tüpe alınan örnekler pipetle 13x100 mm'lik vakumlu düz tüplere (Becton-Dickinson, Vacutainer, Z) aktarıldı. Hemen çalışılacak olan serum örnekleri alındıktan sonra, kalan örnekler + 4°C'de saklandı. Bu tüplerden 24, 48 ve 72. saatlerde alınan örneklerde ölçümler yapıldı. Serbest T₃, serbest T₄ ve TSH Immulite 2000; FSH, LH ve prolaktin ACS-180 Plus analizörlerinde kemiluminesan yöntemle; CA 125, CA 15-3, CA 19-9 ve AFP TOSOH-AIA-21 analizöründe floresanimmunoassay yöntemle çalışıldı. Serbest T₃ dışında diğer analitlerde, vakumlu jelli ve vakumlu düz tüpler arasında anlamlı bir fark görülmedi (P>0,05). Yetmişiki saat boyunca tüm test değerlerinin iki farklı tüpte de stabil kaldığı görüldü. İlk ölçüm de dahil olmak üzere jelli tüplerdeki serbest T₃ değerleri, düz tüplerdeki serbest T₃ değerlerine oranla tüm ölçüm noktalarında anlamlı yükseklik gösterdi (P < 0.05).

Anahtar Kelimeler: serbest triiodotironin, serum separator tüp, separator jel

ABSTRACT

Because of their advantages and practicability, evacuated gel containing tubes have been used in health care institutes for a long time. In this study, we compared evacuated gel containing tubes with evacuated plain tubes for the results of some analytes such as tumor markers and hormones, so we investigated whether separator gel had a significant effect on the results. Blood samples from 5 healthy subjects were collected into 5 evacuated gel containing tubes (Vacutainer SST, Becton Dickinson) and 5 evacuated plain tubes (Vacutainer Z, Becton Dickinson); all the specimens were allowed to clot for 30 min at room temperature before centrifugation at 1300 g for 10 min. Sera separated in SST tubes were remained on the separator gel, whereas sera separated in plain tubes were transferred into 13x100 mm plain tubes (Becton-Dickinson, Vacutainer, Z) for storage. All the SST specimens and transferred control specimens were kept capped and stored in the same rack in the refrigerator (2-8 °C). Measurements were processed in aliquotes from these tubes at 0 h (40 min), 24 h, 48 h, and 72 h after drawing. FreeT₃, freeT₄, and TSH were measured in Immulite 2000 and FSH, LH, and prolactin were measured in ACS-180 Plus analyzers by immunochemiluminescent technique; CA 125, CA 15-3, CA 19.9 and AFP were analyzed in TOSOH AIA-21 analyzer by fluoroimmunoassay technique. There was not any significant difference between gel containing and plain tubes except free T₃ (P>0.05). All the parameters remained stable up to 72 h. Free T₃ values in SSTs were significantly higher than those in the plain tubes (P<0.05) at all time points.

Key Words: free triiodothyronin, serum separator tube, separator gel

GİRİŞ

Serum ayıracağı tüplerin (serum separator tube: SST) kullanımına yaklaşık olarak bundan 25 yıl önce başlanmıştır ve bugün birçok klinik laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş kabul görüp kullanılması, sağladığı birçok avantaj nedeniyedir: daha az hemoliz riski, daha kaliteli serum elde edilmesi; daha kısa sürede santrifüj etme imkanı, santrifüj işlemi sonrası kanın hücresel elemanlarıyla serum arasında fiziki bir bariyer oluşması sonucu serumu başka bir tüpe ayırmaya gerek olmadan aynı tüp üzerinde otoanalizörde çalışma ve aynı tüpte örneği saklama imkanı sağlaması gibi. Bu tüplerin kullanıma girmesiyle birlikte jel ile analit arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Genellikle rutin biyokimya analizlerinde bir fark görülmemekle birlikte, özellikle ilaç düzeylerinde jelli tüplerde önemli derecede düşüş olduğu birçok makalede rapor edilmiştir (1-5).

Genel olarak tümör belirteçleri ve hormonlar diğer rutin biyokimyasal istemlere göre daha az ve seçici olarak istenmektedir. Bu nedenle bu analitler iş yükü az olan bazı laboratuvarlarda biriktirilerek çalışılmakta, bazılarında ise büyük merkezlere gönderilmektedir. Dolayısıyla, analit ile jel arasındaki ilişki, bu parametrelerin jelli tüplerde daha uzun süre beklemesinden ötürü önem kazanmaktadır. Ayrıca çoğu peptid ya da protein-glikoprotein yapısında olan bu analitlerin jelle etkileşme olasılığı çok daha yüksektir. Öte yandan, klinik biyokimya ortamına bu analitlerin ölçümü amacıyla sürekli yeni ayıracağı ve cihaz sistemleri, yeni teknoloji uygulamaları sunulmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda jelli tüplerde örnek toplanması ve saklanması bazı tümör belirteçleri ve hormonlara herhangi bir etkisinin olup olmadığını görmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan tüpler: Kırmızı kapaklı 10 ml'lik jelli Vacutainer SST tüp (Becton Dickinson, France) ve jelsiz düz Vacutainer Z tüp (Becton-Dickinson, France); jelsiz düz 5 ml'lik Vacutainer Z tüp (Becton-Dickinson, France).

Beş sağlıklı kişiden iki adet vakumlu jelli tüpe, iki adet düz vakumlu tüpe örnekler alındı, 30 dakika bekletildikten sonra 1300 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Jelsiz vakumlu tüpe alınan örnekler pipetle 5 ml'lik düz tüplere aktarıldı; 2 saat içinde çalışılacak olan testler için gerekli hacimde serum örnekleri alındıktan sonra geri kalan örnekler +4°C'de saklanmak üzere kaldırıldı; 24, 48 ve 72. saatlerde bu tüplerden alınan serumlarla aynı testler çift olarak çalışıldı.

Serbest T₃ (sT₃), serbest T₄ (sT₄) ve TSH Immulite 2000 analizöründe (Diagnostic Products Corporation, USA) kemiluminesan teknikle; FSH, LH ve prolaktin ACS-180 Plus analizöründe (Bayer Corporation, USA) kemiluminesan teknikle; CA125, CA15-3, CA19-9 ve AFP,

Eurogenetics marka kitlerle (Belgium) TOSOH-AIA 21 analizöründe (Tosoh Corporation, Japan) floresanimmünassay tekniği ile çalışıldı.

Tüpler arasındaki farklılığın istatistiksel önemi Friedman testi ile değerlendirildi; P < 0.05 ise fark anlamlı kabul edildi. Anlamlı fark görülen testler için "tekrarlanmış ölçümler ANOVA" yöntemi uygulandı. İstatistiksel analizler SPSS 10.0 versiyonu ve Microsoft Excell 2000'de yapıldı.

BULGULAR

Serbest T₃ dışında diğer parametrelerde vakumlu jelli ve vakumlu düz tüpler arasında anlamlı bir fark görülmedi (P > 0.05) (Tablo 1). Yetmişiki saat boyunca tüm test değerlerinin iki farklı tüpte de, sT₃ dışındaki tüm analitler için oldukça kararlı olduğu görüldü. Her bir örnek için, her bir ölçüm noktasında elde edilen sT₃ değerleri Tablo 2'de verilmektedir. İlk ölçüm de dahil olmak üzere, SST tüplerindeki sT₃ değerleri düz tüplerdeki sT₃ değerlerinden anlamlı olarak daha yüksekti (P < 0.001). Oysa sT₃ dışında aynı cihazda çalışılan diğer parametrelerde (TSH, sT₄) bir değişiklik olmadı. Her bir denek için SST ve düz tüplerde elde edilen sT₃ sonuçları arasındaki farkların ölçüm noktalarına karşı grafiği Şekil 1'de görülmektedir. Görüldüğü gibi jelli tüplerdeki sT₃ değerleri zaman içinde artış göstermektedir. Yapılan ileri istatistiksel analizde, tekrarlanmış ölçümler ANOVA ile önemli grup etkisi (P < 0.001), zaman etkisi (P < 0.001) ve grup zaman etkileşimi (P < 0.001) saptanmıştır. Düz tüp değerleri temel alındığında, 0., 24., 48. ve 72. saatlerde jelli ve düz tüplerin sT₃ ortalamaları arasındaki farklar sırasıyla %36, %40, %64 ve %59 olarak bulunmuştur

TARTIŞMA

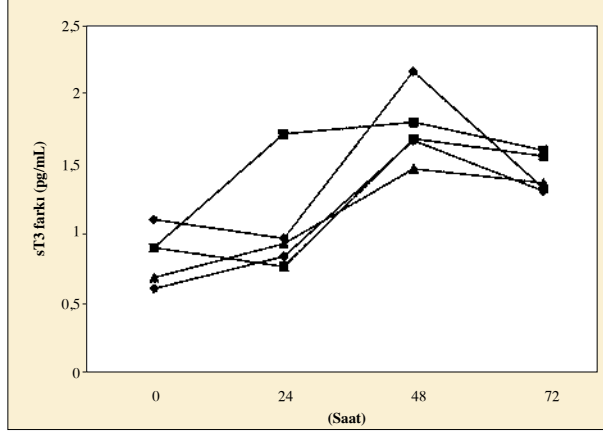
Sağladığı kolaylıklar nedeniyle kullanımı giderek yay-

Tablo 1 Vakumlu Jelli ve Vakumlu Düz Tüplerde Çalışılan Parametrelerin Ortalamaları±Standart Sapmaları ve Farkın İstatistiksel Önemi (P)

TESTLER	Vakumlu Jelli Tüp (n=20) X ± S	Vakumlu Düz Tüp (n=20) X ± S	P
TSH IU/ml	1.03275 ± 0.032	1.02095 ± 0.14	p>0.05
sT ₃ pg/ml	3.831 ± 0.531	2.5475 ± 0.179	p< 0.001
sT ₄ pg/dL	1.314 ± 0.056	1.304 ± 0.041	p>0.05
AFP ng/ml	2.96 ± 0.359	2.75 (± 0.451)	p>0.05
CA 125 U/ml	10.555 ± 0.410	11.045 ± 0.782	p>0.05
CA 15.3 U/ml	23.46 ± 0.611	23.86 ± 0.908	p>0.05
CA 19.9 U/ml	24.86 ± 1.588	25.065 ± 1.339	p>0.05
FSH mIU/ml	4.592 ± 0.303	4.5075 ± 0.487	p>0.05
LH mIU/ml	6.36 ± 0.546	6.253 ± 0.416	p>0.05
Prolaktin ng/ml	8.3295 ± 1.056	8.229 ± 0.782	p>0.05

Tablo 2 Düz ve SST Tüplerde Ölçülen sT_3 Değerleri

SÜRE	1.ÖRNEK		2.ÖRNEK		3.ÖRNEK		4.ÖRNEK		5.ÖRNEK		TÜM TÜPLERİN ORTALAMASI	
	SST	Düz Tüp	SST	Düz Tüp	SST	Düz Tüp	SST	Düz Tüp	SST	Düz Tüp	SST (n=5)	Düz Tüp n=5
0	3.69	2.56	4.36	3.43	2.93	2.21	2.92	1.99	2.35	1.71	3.25	2.38
24	3.72	2.73	5.13	3.4	3.3	2.35	3.01	2.22	3.28	2.42	3.68	2.62
48	5.2	3.03	5.67	3.86	4.46	2.98	3.58	1.89	3.74	2.06	4.53	2.76
72	4.21	2.88	4.62	3.02	3.72	2.35	3.48	1.92	3.25	1.94	3.856	2.42
Topl.	16.82	11.2	19.78	13.71	14.41	9.89	12.99	8.02	12.62	8.13	15.32	10.19
Ort.	4.20	2.8	4.94	3.42	3.60	2.47	3.24	2.00	3.15	2.03	3.83	2.54
SS	0.70	0.20	0.57	0.34	0.65	0.34	0.33	0.14	0.58	0.29	0.53	0.17

**Şekil 1** Her bir örnek için vakumlu jelli ve vakumlu düz tüpler arasındaki farkların ölçüm noktalarına karşı grafiği.

gınlaşan jelli tüplerle ilgili literatüre bakıldığında, ilaç düzeyi ölçümü gibi bazı parametreler için yapılan yayınların birbiriyle tutarlı olduğu görülürken, diğer bazı parametreler -özellikle tümör belirteçleri ve hormonlar- için yayınların birbiriyle çeliştiği görülmektedir. Bu nedenle özellikle uzun süreli saklamada jel ile analit arasındaki ilişki kanımızca çok açık değildir (1-4).

Jelli tüplerden en çok ilaç düzeyleri etkilenmektedir. Yapılan pek çok çalışmada jelli tüplerde bekletilen serumlarda, ilaç düzeylerinin jel tarafından absorpsiyonu sonucu düştüğü saptanmıştır (6-8).

Tümör belirteçleri ve hormon parametreleri açısından yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Banfi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada düz tüplerde ve tiksotropik jel içeren tüplerde CA15-3, CA19-9 ve CA125 düzeyleri karşılaştırıldığında, bu parametrelerde jelli tüplerde dikkate değer bir artış görülmüştür (9). Bizim çalışmamızda ise bu tümör belirteçlerinde bir artış ya da düşüş görülmedi. Ferry ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise düz ve jelli tüplerde progesteron, östradiol, LH, FSH, CK-MB ve troponin T çalışılmış; bu parametreler arasında sadece progesteronda jelli tüplerde yükselme görülmüştür (10). Bizim çalışmamızda ise FSH, LH, TSH ve prolaktinde herhangi bir fark görülmemiştir. Reinartz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada aldosteron, kortizol, DHEA-S, östradiol, progesteron, testosteron, tiroksin ve T_3 , düz tüpte, plastik ve cam SST tüplerinde çalışılmış, DHEA-S ve östradiol dışındaki

diğer parametrelerde bir farklılık görülmezken, bu analitlerin düz cam ve cam SST tüp değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermiş, plastik SST tüpünde sadece östradiolde düz tüpe göre farklılık görülmüştür. Östradiolde SST tüplerinde düşme görülürken, DHEA-S'da ise yükselme görülmüştür (11). Yine Banfi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iki farklı tüpte tirotropin, serbest ve total T_3 ve T_4 çalışılmış ve tüpler arasında bir fark bulunmamıştır (12). Bizim çalışmamızda da aynı cihazda aynı yöntemle çalışılan diğer benzer parametrelerde (T_4 ve TSH) bir değişiklik görülmez iken, sadece serbest T_3 'de fark görülmüştür. Başlangıç sT_3 değerleri, SST tüplerde, düz tüplere oranla belirgin şekilde yükseklik göstermiştir. Gruplar arasındaki fark, örneğin jel üzerinde beklemesine paralel olarak artış göstermiştir (tekrarlanmış ölçümler ANOVA ile önemli grup etkisi, zaman etkisi ve grup zaman etkileşimi). Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere, ilaç gibi küçük moleküllü maddeler jel tarafından absorbe edildiği için serum düzeyleri düşmektedir. sT_3 ise küçük molekül yapısında bir analit olmasına rağmen, beklenenin tersine jelli tüplerde artış göstermiştir.

Immulate 2000 cihazında sT_3 ölçümünde kullanılan kitlerde işaretli hormon analogları ve solid faz monoklonal murin anti T_3 antikorlar mevcuttur. Serumda bulunan sT_3 ve kitin içindeki işaretli sT_3 analogu solid faz antikor bağlama bölgesi için birbirleriyle yarışır. Ne kadar çok işaretli hormon analogu solid faz antikora bağlanmışsa örnekte o kadar az sT_3 var demektir. Dolayısıyla, elde edilen sinyal ile analit konsantrasyonu arasında ters bir orantı vardır. Bu tip ölçümlerde, ortamda hormon analogunun bağlanma bölgesini etkileyen endojen antikorlar, esterleşmemiş yağ asitleri veya belli anyonlar varsa, bunlar büyük oranda ölçümü bozarlar (13,14). Eğer serumdaki albumin veya transtiretin (prealbumin) gibi hormon analoguyla bağlanan protein miktarı kalibratördekenden daha fazla ise, endojen antikor ile yarışacak daha az işaretli hormon olacak ve yanlış olarak yüksek sT_3 değerleri saptanacaktır.

Çalışmamızda her iki örnek arasındaki tek farklılık tüpte jel bulunup bulunmamasıdır. Bu jelin hangi mekanizmayla sT_3 düzeylerinde artışa neden olduğunu açıklamak zordur. Şu mekanizmalardan biri veya hepsi birlikte böyle bir etki ortaya çıkarmış olabilir: (1) Jelli tüplerde, bariyer jel tiroksin bağlayan globulin (TBG), albumin

ve transtiretin gibi bağlayıcı proteinlerden sT_3 'ün ayrılmasına neden olabilir; (2) jel işaretli analogun bağlayıcı proteinlere bağlanmasını artırabilir; (3) jel sT_3 benzeri aktivite gösterebilir veya reaksiyon koşullarında indikatör kemiluminesan reaksiyonu interfere edebilir (15).

Jelli tüplerde tüm zamanlardaki serbest T_3 değerlerinin ortalaması, düz tüplerdeki tüm zaman ortalamalarından 1.3 birim daha yüksektir. Bu yükseklik, dar bir referans aralığına sahip serbest T_3 için (laboratuvarımızda kullanılan referans aralığı: 1.8 - 5.1 pg/ml'dir) önemli bir fark oluşturmaktadır. Düz tüp değerleri baz alındığında, 0., 24., 48. ve 72. saat jelli ve düz tüp ortalamaları arasındaki farklar sırasıyla %36, %40, %64, ise %59 gibi yüksek değerlere ulaşmaktadır. Bu yükseklikler özellikle hipotiroidili hastalar ve ötiroid kişiler için yanlış klinik değer-

lendirme ya da en azından test tekrarıyla sonuçlanabilir. Jelli tüplerde serumun bekleme süresi uzadıkça, iki grup arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı görülmüştür (tekrarlanmış ölçümler ANOVA ile anlamlı zaman etkisi). Bu artış, bekleme süresi uzadıkça interferansın arttığını göstermektedir.

Sonuç olarak, SST tüplere örnek alınmışsa ve serbest T_3 düzeyleri Immulite 2000 analizörlerinde çalışılıyorsa, gerçek değer üzerinde serbest T_3 değerleriyle karşılaştırılabileceği bilinmelidir. Daha da önemlisi, SST tüplere alınan örneklerden elde edilen serum, jel üzerinde uzun süre bekletilmemelidir. En doğrusu, Immulite 2000 analizöründe çalışılacak sT_3 testi için örnek SST tüpe alınmamalıdır.

References

1. Laessig, R.H., Hassemer D.J., Westgard J.O.(1976) Assessment of the serum separator tube as an intermediate stage device within the laboratory. *Am.J.Clin. Pathol.* 66, 653-657.
2. Laessig, R.H., Carey R.N., Westgard J.O. (1976) Field evaluation of the Becton-Dickinson SST. *Healt Lab. Sci.* 13, 209-217.
3. Koch, T.R, Platoff, G. (1990) Suitability of collection tubes with separator gels for therapeutic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.* 12, 277-280.
4. Dasgupta, A., Blackwell, W., Bard, D. (1996) Stability of therapeutic drug measurement in specimens collected in vacutainer plastic blood collection tubes. *Ther Drug Monit.* 18, 306-309.
5. Orsula, P.J., Sinh, M., Wedd, J. (1984) Blood collection tubes for tricyclic antidepressant drugs:a reevaluation *Ther Drug Monit.* 6, 444-448.
6. Dasgupta, A.,Yared M.A., Wells, A. (2000) Time – dependent absorbtion of therapeutic drugs by the jel of the Greiner Vacuette blood collection tube. *Ther. Drug Monit.* 22,427-31.
7. Dasgupta, A., Dean, R., Saldand, S., Kinnaman, G., Mclawhan, R.W. (1994) Absorbtion of therapeutic drugs by barrier gels in serum separator blood collection tubes. Volume and time dependent reduction in total and free drug. *Am. J. Clin. Pathol.* 101, 456-61.
8. Bush, V., Blennerhasset, J., Wells, A., Dasgupta, A. (2001) Stability of therapeutic drugs in serum collected in Vacutainer serum separator tubes containing a new gel (SST II). *Ther. Drug Monit.* 23, 259-262.
9. Bush, V.J., Janu, M.R., Bathur, F., Wells, A., Dasgupta, A. (2001) Comparison of BD Vacutainer SST Plus tubes with BD SST II Plus tubes for common analytes. *Clin. Chim. Acta.* 306,139-143.
10. Ferry, D.J., Collins, S., Syhes E. (1999) Effect of serum volume and time of exposure to gel barrier tubes on results for progesterone by Roche Diagnostic Elecsys 2010. *Clin. Chem.* 45, 1574-1575.
11. Reinartz, J., Ramey, M.I., Fowler, M.C., Kilen AA. (1993) Plastic vs glass SST evacuated serum separator blood drawing tubes for endocrinologic analytes. *Clin. Chem.* 39, 2535-2536.
12. Banfi, G, Paima, P, Pontilo, M. (1997) Stability of tumor Markers CA 19-9, CA 125 and CA 15-3 in serum obtained from plain tubes and tubes containing thixotropic gel separator. *Clin. Chem.* 43, 2430-2431.
13. Ekins, R. (1992) The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clin. Chem.* 38, 1289-93.
14. Midgley, J.E.M. (2001) Direct and indirect free thyroxine assay methods: Theory and practice. *Clin. Chem.* 47, 1353-1363.
15. Kılınç, A.Ş., Düzyolum, A., Uncugil, C. F., Yücel, D. (2002) Falsely increased free triiodothyronine in sera stored in serum separator tubes. *Clin. Chem.* 48, 2296-2297.