

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ UYGULAMA HASTANESİ BİYOKİMYA  
LABORATUVARINDA MANÜEL SERUM ANALİZ YÖNTEMLERİ  
İÇİN REFERANS DEĞERİ ÇALIŞMALARI

KARAMIZRAK, S.O., TÖRE, İ., FADİLOĞLU, M.,  
ÖNVURAL, B., YENİCE, S.

**ÖZET:** Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında manüel yöntemlerle ölçümleri yapılan serum analizlerine ilişkin referans değerlerinin saptanması amacıyla gerçekleştirildi. Örnekleri altı aylık bir süreyle laboratuara gönderilen deneklerden, ön tanıların etkilemeyeceği parametreleri çalışmaya dahil edildi. Bunlardan, 3SD'luk sınıırın dışında kalanlar değerlendirmeye alınmadı. Kalan değerler için yeniden ortalama ve 2SD'luk referans değer aralıkları %95 güvenlik sınırları içinde hesaplandı. Tüm yöntemler için Perkin-Elmer 35 model bir spektrofotometre kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, cinsiyet farkı da göz önünde bulundurularak, yöntemler için verilen literatür sınırlarıyla karşılaştırıldı.

**ABSTRACT:** S.Oğuz KARAMIZRAK, Ege University Medical Faculty Sports Medicine Department, İ. Ruhi TÖRE, Meral FADİLOĞLU, Banu ÖNVURAL, Sedef YENİCE, D.E.University Medical Faculty Biochemistry Department. Reference interval determinations for manually processed serum analytes in the Biochemistry laboratory of Dokuz Eylül University Hospital.

The present study has been carried out in order to determine the expected range of the serum analytes measured by means of manuel methods, in the Biochemistry Laboratory of the Dokuz Eylül University Hospital. Of the samples processed during a six months period, those not interfering with the preliminary diagnosis have been included in the study. Of these, the ones beyond a 3SD range over the mean have not been considered. Then a new mean and the expected range over 2SD at 95% safety margin have been calculated. A Perkin-Elmer 35 model spectrophotometer has been used in all methods. The results have been compared with those obtained from the literature, bearing in mind the sex differences.

---

Yard.Doç.Dr.S. Oğuz KARAMIZRAK, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Spor Hekimliği Bilim Dalı, Prof.Dr.İ. Ruhi TÖRE, Yard.Doç.Dr.Meral FADİLOĞLU, Doç.Dr.Banu ÖNVURAL, Araşt.Gör.Sedef YENİCE Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

**Anahtar sözcükler:** Referans değerler, normal değerler, serum analizleri  
**Key words:** Reference values, normal range

**GİRİŞ:** Klinik biyokimya laboratuvarlarında, "normal" değer olarak da bildirilen analitlerin referans değer sınırları, değişik yorumlanabilmektedir. Uygulanan yöntem, kullanılan cihazlar ve incelenen popülasyonun özelliklerine göre bu değerler değişebilmektedir. Bu nedenle, her laboratuvarın kendi normal sınırlarını belirlemesi yerinde görünmektedir. "Normal" kavramı daha ziyade istatistiksel anlamda olup örnekleme yapılan popülasyonun %95'ini kapsamaktadır. Buna göre sağlıklı her 20 kişiden birine ait analit değeri bu aralığın dışında kalabilmektedir. Öte yandan, analit değerleri bu aralığın içinde yer alan kişilerin de mutlaka sağlıklı olacakları sonucu çıkarılmamalıdır. Bu değerler ancak tanıya yardımcı olup, daha önemlisi, analizlerin hastadaki değişiklikleri izleyebilmek için, yeterli doğruluk ve hassasiyete gerçekleştirilmesidir(1).

Referans değerlerin elde edilmesinde hastane rutininin(2) yanısıra, poliklinik veya yatan hasta taramaları(3) da kullanılagelmıştır. Referans değerleri karar verme düzeylerinden başka, yeni cihaz-kit sistemleri, yeni analitler ve kalite kontrolü için de gerekmektedir(4). Referans grubu seçilirken cinsiyet, yaş (3,5,6,7,8,9), vücut yağ oranı(3,9), mevsim ve örnekleme zamanı(3,9,10,11); alkol, tütün, kafein ve ilaç kullanımı; örnekleme, depolama ve hazırlama koşulları ve yöntem farklılıkları(3,11) gibi kriterler göz önüne alınabilir. IFCC bunlara ilişkin esasları belirlemiştir(8).

Örneklerin dağılımı Gaussian ise gözlenen dağılım hipotetik dağılıma benzetilir ve SD'u hesaplanır. Non-parametrik olarak ise frekans yüzdeleri (fraktiller) hesaplanır. Gaussian dağılımda ortalama  $\pm$  1.96S ile %95 tolerans sınırları belirlenir(3,8). Bu durumda 40-50 aksi takdirde 120-150 örnek gerekir(6). Ya da değişkenin türüne uygun istatistiksel modeller kullanılır(12,13). Bireysel varyasyonun grup varyasyonuna oranı 0.6'dan küçükse referans aralığı kıııdeki değişikliklere yeterince duyarlı olmaz. Oran 1.4 ise oldukça anlamlı şekilde yansıtır. Daha da büyük bir oran varsa kişi sıklıkla bu aralığın dışına çıkacaktır(1,7). Pratikte, analitik varyasyon için düzeltme de yapılırsa, kolay kolay 1.0'lik bir orana ulaşamaz(6,7). Ayrıca sağlıklı ve hasta değerleri sıklıkla çıkarılabilir(6,8). Test değerleri kombine olarak da referans değerlerle karşılaştırılabilir. Ancak birbirinden bağımsız N parametrenin aynı anda %95 sınırına girme şansı  $P = 0.95^N$  olarak zorlaşmakta, burada teker teker anormal olan parametreler global olarak normal de olabilmektedir(6,14).

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında manüel yöntemlerle ölçümleri yapılan serum analitlerine ilişkin referans değerlerinin hesaplanması amaçlandı. Laboratuvara Ocak-Martiran 1986 tarihleri arasında altı aylık bir süreyle örnekleri gönderilen deneklerden, ön tanıların etkilemeyeceği analitleri çalışmaya dahil edildi. İlk aşamada, hesaplanan ortalama değerin 3SD dışında kalan ölçümler değerlendirme dışında bırakıldı. Kalan değerler için yeniden ortalama ve 2SD'luk sınırlar %95'lik güven aralıkları içinde hesaplandı. Tüm yöntemlerde Perkin-Elmer 35 modeli spektrofotometre kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, cinsiyet farkı ile göz önünde bulundurularak, yöntemler için verilen ve literatürdeki sınırlarla karşılaştırıldı.

**MATERYAL VE METOD:** Söz konusu laboratuvara gönderilen serum örneklerinden, hemolizli, lipemik ve ikterik olmayanlar çalışmaya dahil edildi. Ön tanıya göre, etkilenmeyeceği bilinen analitlere ilişkin ölçümler değerlendirilmeye alındı. İlk aşamada, ortalamanın 3SD dışında kalan değerler iptal edilip diğer sonuçlar için yeniden ortalama değer ve 2SD'luk referans değer sınırları saptandı(15). Tüm tetkikler manüel yöntemlerle, Perkin-Elmer 35 modeli spektrofotometre aracılığıyla gerçekleştirildi.

AST(GOT) ve ALT(GPT) enzim etkinliklerinin belirlenmesinde, Reitman ve Frankel'in sırasıyla oksaloasetat ve pirüvatın 2,4-DNPH ile oluşturdukları hidrazonların 540 nm'de değerlendirilmelerine dayanan kolorimetrik yöntemler Boehringer-Mannheim kitleri aracılığıyla gerçekleştirildi(16). ALP enzim etkinliklerinin saptanmasında, PNPP substratının p-nitrofenole değişiminde 405nm'de gözlenen absorbans artışının kinetik olarak izlenmesine dayanan Bessey yöntemini uygulayan Boehringer-Mannheim kitleri kullanıldı(17). ACP ve PAP enzim etkinliklerinin hesaplanmasında, benzer esasla çalışan, ayrıca sodyum tartrat inhibisyonundan faydalanan Andersch et al. ile Fischman et al.'ın yöntemlerini kullanan Boehringer-Mannheim kitlerinden yararlandırıldı(18). Total lipid ölçümleri, Zollner ve Kirsch'in sülfosfovanilin yöntemini kullanan Boehringer-Mannheim kitleri aracılığıyla, 530 nm'de gerçekleştirildi(19). Kolesterol tayinleri, asetik asit ve sülfürik asit tepkimesine (Liebermann-Burchard) dayanan Watson yöntemi ile, 580 nm'de Boehringer-Mannheim kitleri kullanılarak yapıldı(20). Total protein ve albumin belirlemeleri manüel olarak hazırlanan reaktifler, Biüret yöntemi ve eter ekstraksiyonu kullanılarak, 540 nm'de gerçekleştirildi (21). Total ve direkt bilirubin miktarlarının saptanmasında, diazotize sülfanilik asit ve kafein ile bir azo boyasının oluşturulmasına dayanan Jendrassik yöntemini, 580 ve 545 nm'lerde uygulayan Boehringer-Mannheim kitlerinden yararlandırıldı(22). Serum kreatinin ölçümleri, TCA deproteinizasyonu sonrası alkali pikrat kompleksleşmesine dayanan klasik Jaffé yöntemi ile, 520 nm'de, Boehringer-Mannheim kitleri kullanılarak



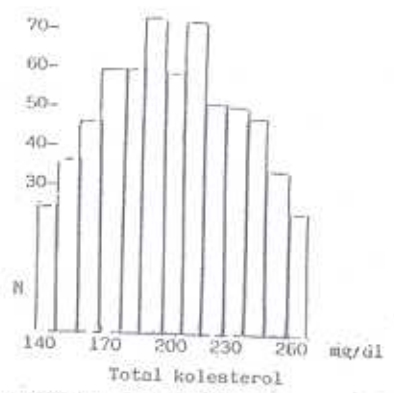
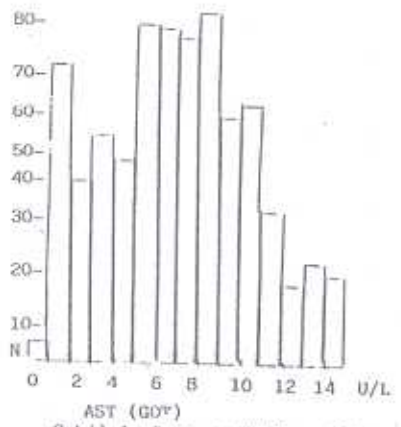
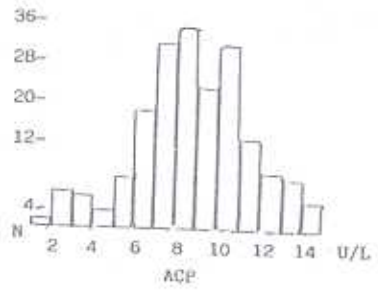
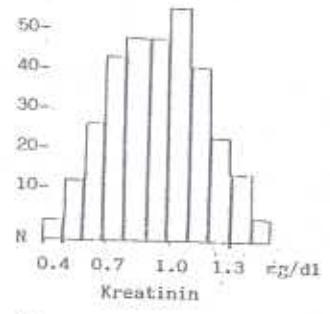
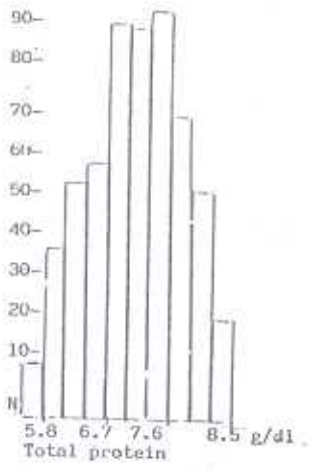
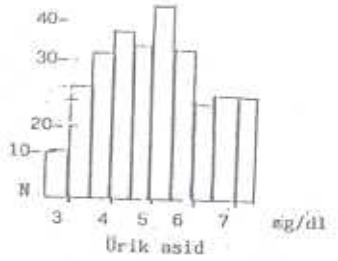
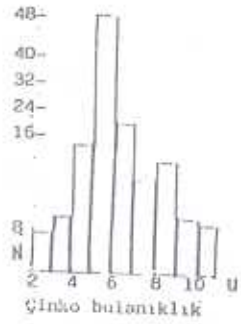
gerçekleştirildi(23). Ürik asid miktarlarının belirlenmesinde, alkali ortamda fosfotungstik asid reaktifiyle elde edilen mavî rengin 660 nm'de ölçümüne dayanan Laudat yöntemi, manüel reaktifler hazırlanarak kullanıldı(24). Timol bulanıklık testinin uygulanmasında, barbitüratlı timol tampon çözeltisinin (pH 7.8) kullanıldığı Mc Lagan yönteminden, 650 nm'de BaSO<sub>4</sub> bulanıklık standart eğrisi aracılığıyla yararlanıldı (25). Çinko sülfat bulanıklık miktarının ölçümü ise, barbitüratlı çinko sülfat tampon çözeltisi (Ph 7.5) kullanılarak Kunkel yöntemi ile, gene 650 nm'de, aynı standard eğrisiyle gerçekleştirildi(26). Bu s. iki yöntemin reaktifleri de manüel olarak hazırlandı. Beklenen ve hesapla bulunan ortalama değerler için SD'lar hesaplandı ve eşleşmiş Student-t testi ile karşılaştırmaları yapıldı.

**BULGULAR:** Laboratuara gönderilen serum örneklerine ilişkin analizlerin beklenen normal aralığa göre altı aylık ortalamaları(X) ve dağılımları, yapılan istatistiksel çalışmaya göre elde edilen genel(Y) ve cinsiyete göre ortalamaları, buna göre hesaplanan normal aralıklar (Y<sub>±</sub>2SD), normal, alçak ve yüksek değerlerin dağılımı, ortalama değerlerin farklılığının t (Student) testine göre değerlendirilmesi ve literatür değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bazı analizlere ilişkin frekans dağılım histogramları ise Şekil 1'de verilmiştir.

**TARTIŞMA:** ALT(GPT) enzim etkinlikleri için beklenen ve saptanan normal aralık değerleri farklı bulunmazken AST(GOT) enzim etkinlikleri için beklenen 0-12 U/L'lik normal sınırlara karşılık 0-14 U/L'lik değerler bulundu. Her iki cinse ilişkin referans değerler AST(GOT) enzimi için p < 0.05 düzeyinde; ALT (GPT) enzimi içinse p < 0.001 düzeyinde fark gösterdi. Boehringer-Mannheim firmasının bu enzimlere ilişkin olarak UV alanda çalışılan başka yöntemleri için nitelik cinsiyete göre farklı sınırlar verilmiştir(27,28). ALP ve ACP enzim etkinlikleri için üst sınırlar biraz daha yüksek tesbit edilirken PAP için bir değişiklik gözlenmedi; ilk iki enzim açısından cinsiyet faktörünün anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi. Beklenen lipid değerlerinin sınırları daha yüksek düzeylere çıkarken, kolesterolün özellikle alt sınırının daha düşük olduğu belirlendi. Amerikan toplumu için verilmiş referans değerlerde de alt sınırın daha düşük olduğu bildirilmiştir(15). Her iki analiz açısından cinsiyete göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Total protein ve albümin değerlerinin alt sınırları daha düşük bulunurken cinsiyete göre ortalama değerler bir fark göstermedi. Kaplan(15) da albümin için bu açıdan farklı sınırlar vermektedir. Total bilirubin için elde edilen referans değer sınırları farklı bulunmazken direkt bilirubin için üst sınır artmış olarak belirlendi ve gene her iki analiz için cinsiyet açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Kreatinin için referans değerlerin üst sınırı daha yüksek bulundu. Her iki cins arasındaki fark (p < 0.05) literatürde bildirileni(15) destekler nitelikteydi. Ürik asid için elde edilen üst sınır, yöntem için verilenden daha yüksek olarak saptanmasına rağmen Kaplan(15)'ın bildirdiğine koşuttu, ancak cinsiyete

Tablo 1. Analizlere ilişkin beklenen normal aralık, ölçü sayısı, ortalaması ve dağılımları, istatistiksel ortalaması (Y) ve hesaplanan normal aralık (Y-2SD), dağılımları, cinsiyete göre ortalamaları, normal aralıkları, t-testi farkları ve referans aralıkları

Analiz	Beklenen	N	X	Nor	YBk	Alg	Y	Y-2SD	Nor	YBk	Alg	Erkek	Erkek	Kadın	Kadın	Student	Kaplan
	Normal aralık											X	X+2SD	X	X+2SD	(t)test	(15)
AST(GOT)	0-12 U/L	912	8.1	693	219	-	6.7	0-14	743	169	-	6.9	0-14.4	8.4	0-13.1	p< 0.05	
ALT(GPT)	0-12 U/L	895	4.4	736	159	-	4.8	0-11	718	177	-	5.2	0-12.0	4.4	0-10.3	p< 0.001	
ALP	20-48 U/L	801	33.3	371	383	47	35.9	13-55	460	332	9	33.9	13-55	34.0	12-56		
ACP	0-11 U/L	244	8.0	193	51	-	8.5	2.8-14.3	212	32	-	8.7	3.2-14.3	8.0	1.8-14.1		
PAP	0-4 U/L	63	1.8	51	12	-	2.0	0-4.4	51	12	-	2.0	0-4.4				
Lipid	400-1000mg/dl	828	762	645	179	4	771	480-1060	661	130	17	765	474-1056	775	467-1063		125-285
Kolesterol	180-250 mg/dl	825	213	419	172	234	202	140-265	672	107	46	200	139-263	204	138-270		6.7-8.1
Protein	6.3-8.2 g/dl	686	7.2	498	53	135	7.3	5.8-8.5	573	33	60	7.1	5.8-8.5	7.3	5.7-8.5		3.3-6.1
Albumin	4.0-5.7 g/dl	686	4.6	485	19	182	4.5	3.5-5.6	552	23	111	4.5	3.5-5.6	4.5	3.5-5.5		0.5-1.5
Total Bil.	0-1.00mg/dl	319	0.48	189	130	-	0.48	0-0.93	182	137	-	0.50	0-1.00	0.46	0.1-0.84		0-0.2
Direkt Bil	0-0.25mg/dl	317	0.13	165	152	-	0.15	0-0.32	169	148	-	0.15	0-0.32	0.14	0-0.30		0.6-1.1
Kreatinin	0.6-1.1 mg/dl	451	0.83	251	192	8	0.90	0.5-1.4	322	121	6	0.90	0.4-1.4	0.88	0.5-1.3	p< 0.05	3.6-7.7
Ürik asid	3.0-6.0 mg/dl	364	4.5	232	119	13	5.0	2.4-7.5	311	37	16	5.1	2.3-8.0	4.6	2.4-7.3	p< 0.01	
Timol B.	0-1.0 U	439	1.8	358	81	-	1.9	0-4.0	350	89	-	1.8	0-3.9	1.9	0-4.0		
ZnSO <sub>4</sub> B.	1.0-8.0 U	217	5.4	144	70	3	6.0	1.6-10.4	165	45	7	5.8	1.3-10.3	6.3	2.0-10.5		



Şekil 1. Bazı anamnezlere ilişkin frekans dağılım histogramları

göre gözlenen fark ( $p < 0.1$ ), burada verilen düzeyi bulmadı. Timol bulanıklık yöntemi için elde edilen referans değer aralığı bir değişiklik göstermeyip, cinsiyete göre de anlamlı bir fark saptanmazken; çinko sülfat bulanıklık yönteminin üst sınırının arttığı gözlemlendi, ancak burada da cinsiyetin anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi.

Tıbbi çalışmalarda cinsiyet gibi fizyolojik, mevsim, sosyal çevre ve günün saati gibi çevresel faktörlere, ilaç, sigara, alkol ve kahve kullanımı gibi kriterlere göre daha homojen subgruplar(3) seçilerek kişilerarası varyasyon azaltılabilir(1), ancak kriterlerin seçimi her analite ve koşullara özgü olmalıdır(9).

#### KAYNAKLAR:

1. Harris, EK.: Effect of intra- and inter-individual variation on the appropriate use of normal ranges. Clin Chem 1974; 20(12): 1535-1542.
2. Neumann, GJ.: The determination of normal ranges from routine laboratory data. Clin Chem 1968; 14(10): 979-988.
3. Dybkaer, R.: Production and presentation of reference values. p2-12 in Proc. 2nd int. Colloquium "Automatisation and Prospective Biology" Pont-à-Mousson 1972. Karger, Basel, 1973.
4. Statland, BE: Establishing decision levels in clinical chemistry. p 207-221 in Reference Values in Laboratory Medicine. Eds R Gröbeck, Alström, T. John, Wiley and Sons Ltd. 1981.
5. Leonard, PJ.: The effect of age and sex on biochemical parameters in blood of healthy human subjects. p 134-140 in Proc. 2nd int. Colloquium "Automatisation and Prospective Biology" Pont-à-Mousson 1972. Karger Basel 1973.
6. Werner, M. Marsh, WL.: Normal values: Theoretical and practical aspects. p 51-100 CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Science 1975.
7. Williams, GZ. Wittowson, GM. Fenton, J.: Individual character of variation in time-series studies of healthy people II. Differences in values for clinical chemical analytes in serum among demographic groups, by age and sex. Clin Chem 1978; 24(2): 313-320.
8. Dybkaer, R.: The theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. Clin Chim Acta 1983; 127: 441F-445F.
9. Lellouch, J. Claude, JR.: A study of several biological parameters measured in a large population of a single profession. II. Factors which affect the normal values. p 100-108 in Proc. 2nd int. Colloquium "Automatisation and Prospective Biology" Pont-à-Mousson 1972. Karger, Basel 1973.
10. Winkel, P. Statland, BE. Bokelund, H.: The effects of time of venipuncture on variation of serum constituents. Consideration of within-day and day-to-day changes in a group of healthy young men. Am J Clin Pathol 1975 Oct; 64: 433-447.