

TANISAL SERUM PROTEİNLERİNİN KANTİTATİF DEĞERLERİ ÜZERİNE ISININ VE BEKLEME SÜRESİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

Aylin ŞENGÖNÜL, Nuran YULUĞ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Kliniklerden sıklıkla yapılması istenen laboratuvar tetkiklerinden olan antistreptolizin-O (ASO), C-reaktif protein (CRP) ve romatoid faktör (RF) ölçümleri; hem tanı ve ayırıcı tanıda, hem de sağaltımın seyrinin takibinde önemli olmaktadır.

Çalışmamızda kantitatif değerleri önemli olan söz konusu serum proteinlerinin nefelometrik ölçümlerinde ısı, zaman, bekleme süresi gibi laboratuvar şartlarının sonuca etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bunun için değişik kliniklerden başvuran hastalardan ASO, CRP ve RF değerlendirilmesi istenen ve nefelometre analizörü ile pozitif değer taşıdığı saptanan toplam 30 hastadan alınmış serum kullanıldı. Her serum ayrı Eppendorf tüplere aktarılarak farklı saklama şartlarına bırakıldı. Gerek saklama süresi (5,24,48 saat, 7,14,60 gün), gerek saklama ısı (oda, +4, -20 °C) farklı olan bu serumların, ASO, CRP ve RF için kantitatif değerleri nefelometre analizörü ile tekrar saptandı.

Test sonuçlarında, oda ısısında daha belirgin olmak üzere, hem oda ısısında hem +4°C'de ve süre bakımından da 48 saat içinde kantitatif değerlerinde düşme gözlemlendi. Serumların ardarda çözülüp dondurulması ile meydana gelen değer düşüşlerinin ise tek bir defa çözülüp çalışılanlara göre daha dramatik olarak seyrettiği saptandı.

Bu sonuçlar, serumların mümkün olduğu kadar çabuk çalışmaya alınmalarını, işleme alınamadıkları durumda ise bir kez çözülüp çalışılmak üzere dondurularak saklanması (daha az değer kaybı nedeni ile) gerekli olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: ASO, CRP, RF, Laboratuvar koşulları,ısı,bekleme zamanı, nefelometre

SUMMARY

Measurement of the ASO, CRP and RF is frequently demanded by the hospital and aids in the diagnosis, differential diagnosis and evaluation of the severity of many diseases processes.

This study aims to evaluate the effect of laboratory conditions such as the waiting period and temperature on the nephelometric measurements of the above serum proteins whose quantitative values are important. We put each serum received from various clinics and from 30 different patients known to be positive for ASO, CRP and FR by nephelometric analysis into a different Eppendorf's tube and kept the tubes waiting under different conditions. The waiting period was 5, 24, 48 hours and 7, 14, 60 days while the temperature was kept at room temperature, +4 °C or -20 °C. The quantitative ASO, CRP and RF values were then determined again by nephelometric analyser.

ASO, CRP and RF tests values decreased both under room temperature and +4 °C in 48 hours. When the sera were constantly thawed and refrozen, the decrease in value was more pronounced than the sera which were just thawed once and analyzed.

These results indicate that the sera should be analyzed as soon as possible or frozen first and thawed just before the study period to decrease the change in values.

Key words: ASO, CRP, RF, Laboratory conditions; temperature, waiting time, nephelometry

Günümüzde; infeksiyon, dahiliye, pediatri kliniklerinden istenen laboratuvar testlerinin başında ASO, CRP ve RF tetkikleri gelmektedir.

Beta hemolitik streptokoklar tarafından oluşturulan streptolizin-O antijenine karşı organizmada meydana gelen ASO antikorunun kantitatif tayini; yeni geçirilmiş streptokoksik infeksiyonların veya akut eklem romatizması, akut glomerulonefrit ve diğer post-

streptokoksik infeksiyonların tanısı ya da izlenmesini olanaklı kılar (1-6).

Akut faz yanıtının gösterilmesinde; yaygın kullanılabilirliği ve göreceli olarak güvenilirliği nedeniyle CRP düzeyi ölçümleri en anlamlı gösterge olmaktadır (7).

Otoimmün etiyolojiye bağlı oldukları sanılan pek çok hastalıkta konağın kendi vücut antijenlerine karşı

* 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde (3-8 Ekim 1999, Antalya) sunulmuştur.

antikor yaptığı gösterilmiştir. Romatoid artrit olgularında kanda insan IgG globulini ile reaksiyona girmesi bakımından antikora benzeyen bir IgM (romatoid faktör) titrasyonunda yükselme görülmektedir. Tek başına belirleyici olmasa da RF testinin pozitif olması tanı ve ayırıcı tanı açısından yararlıdır. Bu nedenle RF'ler sıklıkla immün kompleks hastalıklarının in vivo göstergesi olabilmektedir (8,9).

Bütün bu söz konusu testler için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Gelişen teknoloji; nefelometre gibi ışık saçılımını ölçen sensitivitesi yüksek teknikleri de sunmuştur. Ancak ışık saçılımının ölçümlerinin de mevcut sınırlamaları vardır.

Hastanemiz laboratuvarlarında, plazma proteinleri nefelometrik ve turbidimetrik yöntemlerle kısa sürede incelenmektedir. Ancak bazı serumlar, yoğun laboratuvar yükünün getirdiği bazı kısıtlamalardan dolayı tekrar çalışılmak üzere bekletilmekte ya da dondurulup çözülmektedir. Çalışmamızda; tanı ve hastalık takibinde kantitatif değerleri önemli olan söz konusu serum proteinlerinin ölçümlerinde ısı, bekleme zamanı gibi laboratuvar şartlarının sonuçlara etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada kullanılan serumlar, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Seroloji Laboratuvarı'na başvuran ve nefelometre analizörü ile ASO, CRP ve RF titresi yüksek bulunmuş 30 hastadan toplanmıştır. Araştırma için, test sayısının fazla olması nedeni ile çok miktarda kan alabilmek için özellikle yetişkin hastalar seçilmiştir. Bunun için hastalardan 20 cc düz kan alınmış, ortalama yarım saat bekletildikten sonra 1500 devirde 10 dakika kadar santrifüje edilerek kanların serumları ayrılmıştır.

Serumlar her bir test için gerekli olan 11 ayrı endorf tüpe aktarılıp, bir grubu (4 tüp) oda ısısında, bir grubu (3 tüp) +4°C'de buzdolabında, bir diğeri ise (4 tüp), -20°C'de dondurucuda saklanmıştır. Dondurucuda saklananlardan bir grup (1 tüp) çözülüp çalışılmış

tekrar dondurulmuş, diğer grup ise (3 tüp) bir kez çözülüp çalışılmış daha sonraki deneylerde kullanılmamıştır.

Çalışmaya alınmadan önce +4 ve -20 °C'deki serumların erimesi ve oda sıcaklığına gelmesi için bir süre (ortalama 5 dakika) beklenmiştir.

Kantitatif ASO, CRP ve RF ölçümleri için, immünonefelometri prensibine uygulanmış ve buna uygun tanısal malzemeler (BEHRING™ ALMANYA; N Lateks ASL, N Lateks CRP mono, N Lateks RF test kiti ve N/T Rheumatology Controls SL/1 veya SL/2 kontrol kiti) kullanılarak, nefelometrik işlemeye göre ışık saçılımını ölçen Behring Nefelometre Analizöründe çalışılmıştır. Kullandığımız nefelometre analizöründe 840±25 nm. dalga boylu infrared kaynaklı ışık bulunmaktadır. Örnekte analiz edilen antijen yada antikorun konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi kullanılarak, ışık saçılımının yoğunluğuna bağlı olarak nefelometrik prosedüre göre analizör tarafından otomatik olarak hesaplanmaktadır (N Lateks ASL testi antistreptolizin-O için, N Lateks RF testi romatoid faktör için, N Lateks CRP mono testi C-Reaktif protein için spesifiktir).

ASO konsantrasyonlarının, hastanın yaşına, coğrafik yerleşimine ve streptokokkal infeksiyonların bölgesel sıklığına göre değişebilmekte olduğu dikkate alınarak çalışmamızda ASO için uluslararası üst normal sınır 200 IU/ml olarak kabul edilmiştir. Normal serumda RF konsantrasyonuna ait referans değeri <20 IU/ml, CRP konsantrasyonuna ait referans değerinin üst limiti 5 mg/l olarak kabul edilmektedir. Fakat hem CRP hem de RF için kabul edilen referans aralığı çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu faktörler gözönünde bulundurularak; her laboratuvarın kendi hasta popülasyonuna ait referans aralığı değerlerini saptaması gerektiği bildirilmektedir (10).

BULGULAR

Çalışmamızı ASO, CRP ve RF değerleri normalin üstünde olumlu olan kişilerin serumlarında uyguladık.

Her grupta 10 hasta olacak şekilde toplam 30 hasta üzerinde yaptık. Her hasta örneğinin belirli ısılarda saklanması ve belirli süreler sonunda bulunan değerleri az çok farklı idi. Her gruptaki 10 hastanın aynı koşullarda saklanan titre ortalamaları alınmış ve bu ortalama değerler kullanılarak grafiklendirilmiştir.

Örneklerin laboratuvara gelir gelmez yapılan test sonuçlarında ilk değerlerin ortalaması, ASO için 377 IU/ml, CRP için 106 mg/l, RF için 51 IU/ml bulunmuştur. Serumların oda ısısı ya da buzdolabında tutulmasına göre 5,24 ve 48 saat sonundaki değerleri; ASO için Tablo I ve Şekil 1'de, CRP için Tablo II ve Şekil 2'de, RF için Tablo III ve Şekil 3'te gösterilmektedir.

Dondurulan örneklerden belirli zamanlarda (48 saat, 7.gün, 14.gün ve 60.gün) serumu çözüp işlemden sonra tekrar dondurma uygulamasında ilk değer

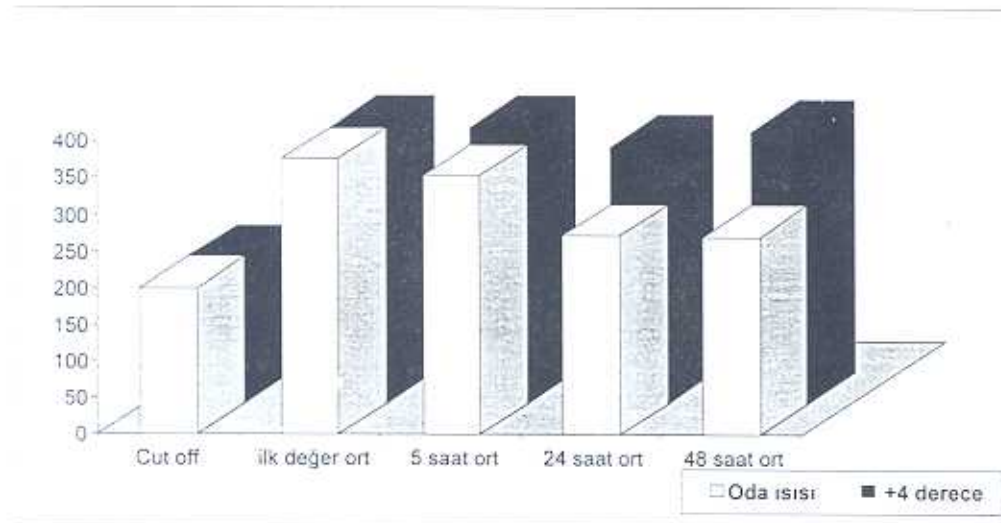
ortalamalarının sapmaları; ASO için Şekil 4'te, CRP için Şekil 5'te, RF için Şekil 6'da gösterilmiştir.

Yine dondurularak ve aynı sürelerde (48 saat, 7.gün, 14.gün ve 60.gün) saklanmış, ancak bir kez çözülüp çalışılmış ve sonra kullanılmamış örneklerin ortalama değerleri; ASO için Şekil 7'de, CRP için Şekil 8'de ve RF için Şekil 9'da gösterilmiştir.

Bulgularımızın istatistiksel analizinde önce grupların aritmetik ortalama ve standart deviasyonları saptandı. Veriler SPSS (Statistics Package for Social Science) programına kaydedildi. Gruplar arasındaki fark 9 serbestlik derecesinde, çift yönlü teste, tablo t değerleri ile karşılaştırıldı. Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı (11,12). Her grubun t değeri, tablo t değerinden küçük bulunduğu için; ısı ve süreye bağlı olarak serum protein değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düşme gösterdiği kabul edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo I. ASO değerlerinin ilk 48 saatte ısı ve süreye bağlı sapmaları

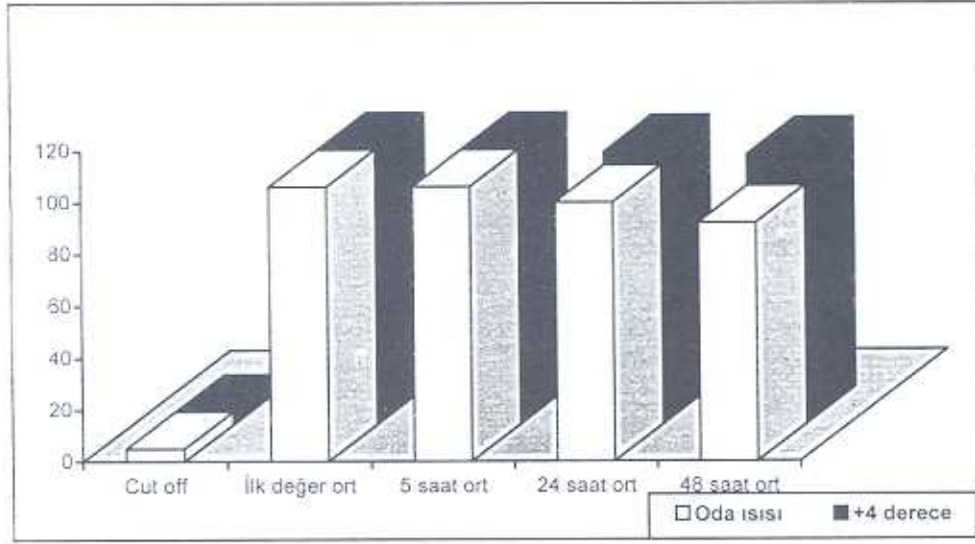
	Cut IU/ml	İlk Değer ort. IU/ml	5 saat ort. IU/ml	24 saat ort. IU/ml	48 saat ort. IU/ml
Oda ısısı	200	377	353	272	270
+4 derece	200	377	377	350	371



Şekil 1. ASO değerlerinin ilk 48 saatte ısı ve süreye bağlı değer sapmaları

Tablo II. CRP değerlerinin ilk 48 saatte ısı ve süreye bağlı sapmaları

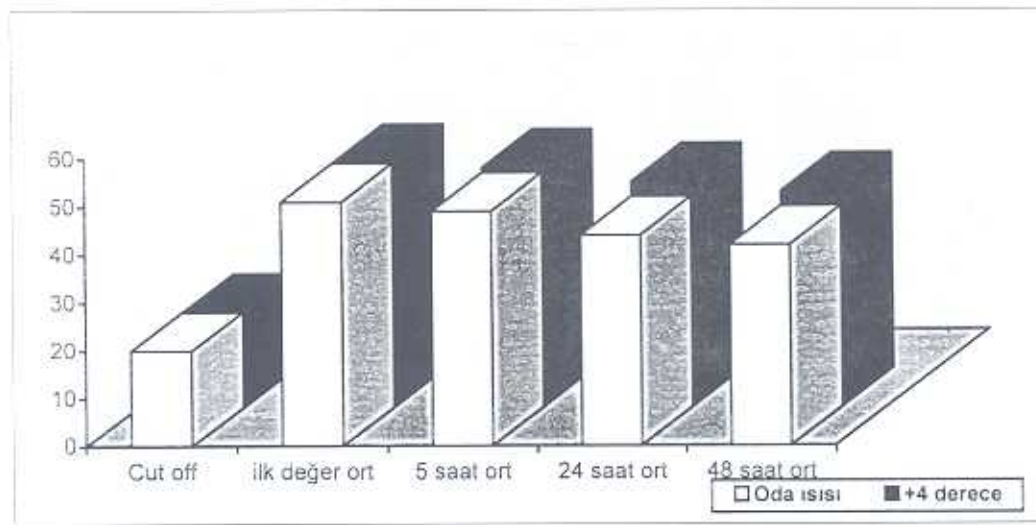
	Cut off mg/l	İlk Değer ort. mg/l	5 saat ort. mg/l	24 saat ort. mg/l	48 saat ort. mg/l
Oda Isısı	5	106	106	100	92
+4 derece	5	106	106	105	104



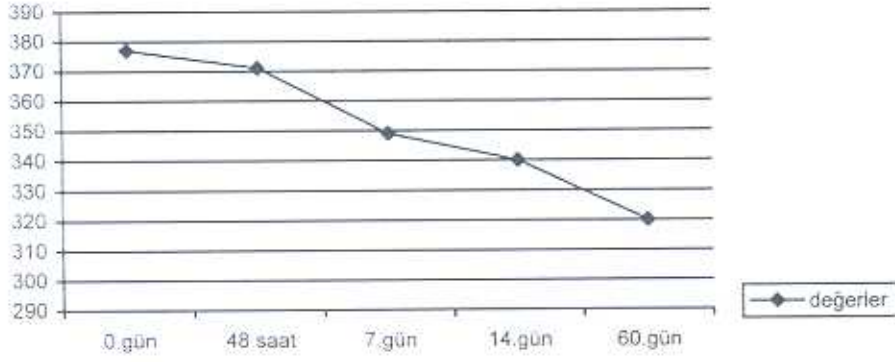
Şekil 2. CRP değerlerinin ilk 48 saatte ısı ve süreye bağlı değer sapmaları

Tablo III. RF değerlerinin ilk 48 saatte ısı ve süreye bağlı sapmaları

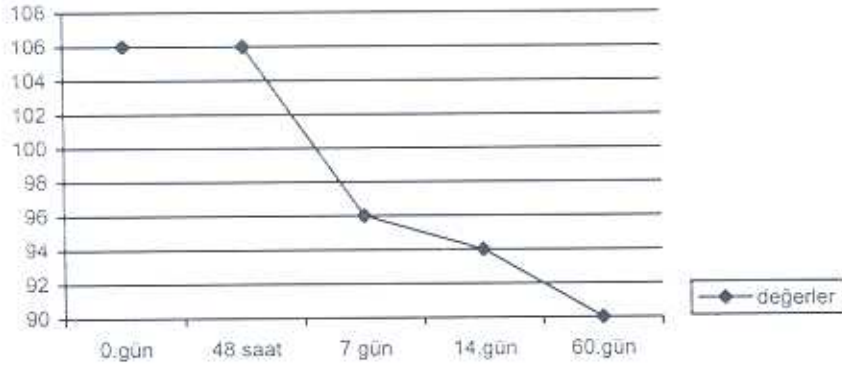
	Cut off IU/ml	İlk Değer ort. IU/ml	5 saat ort. IU/ml	24 saat ort. IU/ml	48 saat ort. IU/ml
Oda Isısı	20	51	49	44	42
+4 derece	20	51	50	47	45



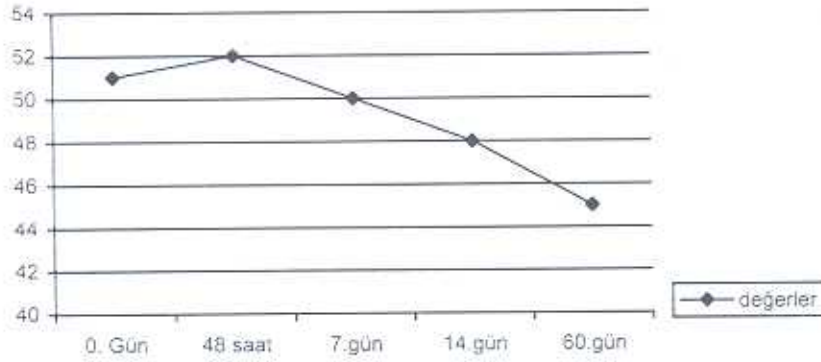
Şekil 3. RF değerlerinin ilk 48 saatte ısı ve süreye bağlı değer sapmaları



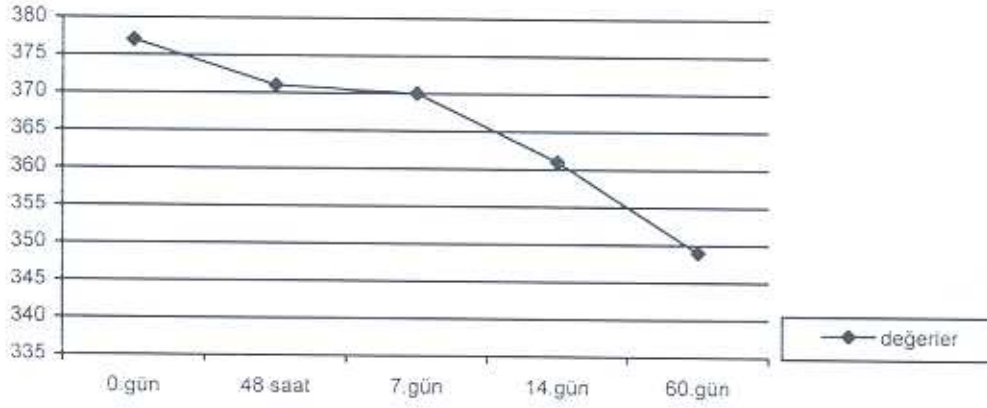
Şekil 4. Belirli aralıklarla dondurulup çözülen serumlarda ASO değerleri (IU/ml)



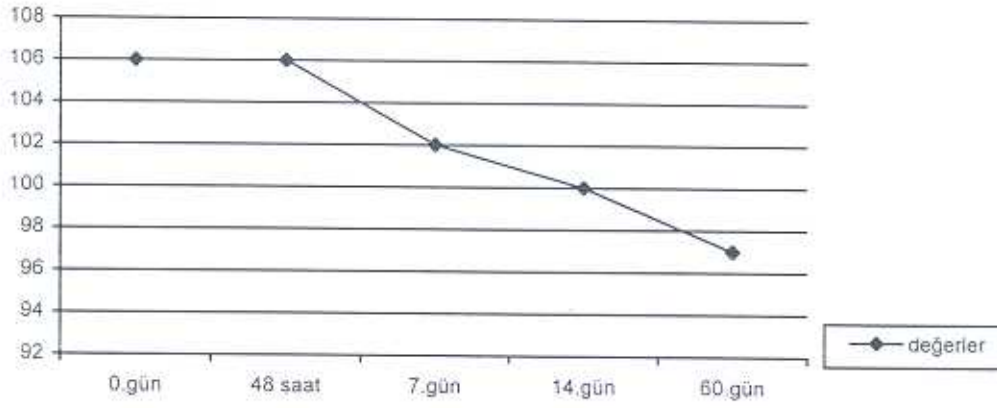
Şekil 5. Belirli aralıklarla dondurulup çözülen serumlarda CRP değerleri (mg/l)



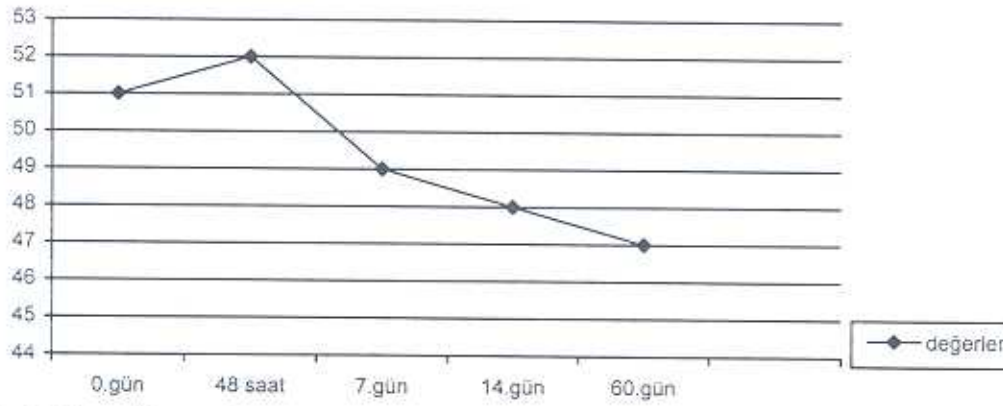
Şekil 6. Belirli aralıklarla dondurulup çözülen serumlarda RF değerleri (IU/ml)



Şekil 7. -20 °C'de saklanan ve belirli sürelerde bir kez çözölen serumlarda ASO değerleri (IU/ml)



Şekil 8. -20 °C'de saklanan ve belirli sürelerde bir kez çözölen serumlarda CRP değerleri (mg/l)



Şekil 9. -20 °C'de saklanan ve belirli sürelerde bir kez çözölen serumlarda RF değerleri (IU/ml)

TARTIŞMA

Gelişen teknoloji, duyarlılığı yüksek teknikleri, çok yönlü laboratuvarların hizmetine sunmuştur. Bu tekniklerin temelinde seroloji ilkeleri geçerli olmaktadır.

Otomatize sistemler hızlı ve çok sayıda serumla çalışma olanağının yanında, çok sayıda serumun saklanması da gündeme getirmektedir. Bu yöndeki dikkat ve özeni de laboratuvar çalışanlarına yüklenmektedir. Laboratuvar çalışanları plazma proteinlerini fizyolojik ya da patolojik olarak değerlendirirken sonuçları etkileyecek pek çok biyolojik faktörü ve teknik yönden sorunları göz önüne almak durumundadır. Bu nedenle çalışmaların değerlendirilmesinde, hasta popülasyonu ve buna bağlı serum özellikleri, kit özellikleri, kullanılan teknik ve analiz edilen madde miktarı olarak bakılan proteinlerin genel özellikleri dikkatle ele alınmaktadır.

Serumun yüksek lipidli olması, hastaların yaş ortalaması, irksal ve genetik özellikleri, iyi santrüfj edilmiş ya da hemolizli serumlar sonuçları saptırabilir. Değişik lotlarda kitleri kullanmak başta standart olmak üzere bütün miyaları ve dolayısı ile de sonuçları etkileyebilecek ve değiştirecektir. Hatta bir kaç sefer kullanılan kitlerde farklı bir zemin etkisi yaratmasını önlemek için kit malzemesinin filtre edilerek kullanılması önerilmektedir. Bu arada serumların ya da çözücülerin ısıya maruz kalmaları da önemlidir (13).

Serumdaki protein analizleri için dünya çapında ortak bir kalibratörün kullanılması ile laboratuvarlar ve kitlerin performansları arasında uyum sağlanabileceği düşünülmüş (14) ise de proteinlerin moleküler heterojenlikleri ve hastalıklarda meydana gelen değişiklikler nedeniyle, bu düşüncenin de protein ölçüm sonucunu tam olarak doğru çözümlenemeyeceği belirtilmektedir (15). Biz çalışmamızda Dünya Sağlık Örgütü tarafından kabul edilen standartları kullandık.

Bilindiği gibi, ısı, yüksek pH, UV radyasyon, basınç, deterjanlar, organik çözücüler ve ağır metal iyonları proteinleri denatüre ederler. Denatürasyon sonucu olarak viskozite, çökme sabitesi, absorpsiyon ve saçılımda değişimler olmaktadır (16). Değerlendirmeler nefelometre analizöründe yapılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda serumlar inaktive edilmeden kullanılmıştır.

Nefelometre, ışık saçılımının aynı dalga boyunda kalması nedeni ile teknik olarak düz bir flourometreden daha üstündür. Burada saçılan ışık; erimez kompleks oluşumların miktarı ile doğrudan orantısaldır (17).

Işın enerjisinin bir çözelti içindeki moleküller ile çarpışması sonucu ışın saçılımı olur. Saçılımı etkileyen bir çok faktör vardır. Bunlar; parçacıkların büyüklüğü, konsantrasyonu, molekül ağırlıkları, dalga boyu, gözlem uzaklığı ve ışığın polarizasyonudur. Reaksiyon hızı, karıştırma hızı, bekleme süresi, çözelti pH'ı ve sıcaklık da saçılımı etkilemektedir. Yüksek antikor varlığında presipitai oluşumlarının miktarı hatalı düşük değer biçiminde kaydedilecektir. Bu nedenle; antikorun hem yüksek titrede hem de yüksek affinite de olması durumunda, nefelometrede kullanılan reaktiflerin, mikrofiltrasyonla saflaştırılmaları gerekir. Yine, eşdeğer partiküllerin oluşabilmesi sabit bir şallama gereksinimi gösterir (13-18). Çalışmamızdaki üç ayrı proteinimizde ısıya bağlı farklı değer düşüşü saptamamızı sözkonusu olan nedenlere bağlamaktayız.

Literatür taramasında, nefelometre ile yapılan çalışmalarda hem saklama süresinin hem de saklama ısısının sonuçlar üzerinde etkisini konu alan yayına rastlanmadığından çalışmamızda sadece kendi gözlemlerimizi tartışabilmekteyiz.

Isının, gerek protein yapısındaki analiz edilen maddelere, gerek kitin hem monoklonal hem de lateks yapısına etki ettiğini ve de arka plan etkisini bozduğunu özetleyebiliriz. Bunun dışında bütün

biyolojik ürünler zamanla yıkıma uğrar ve metabolize olurlar. Isı etkisi bu yıkımı arttırmaktadır.

Bizim incelediğimiz serum proteinleri saflaştırılıp tek başına ısı etkisi ayrı ayrı incelenmiş değildir. Normal çalışma koşulları içinde ısı etkisi değerlendirilmiştir. Hepsinde ortak olan ısının değer düşüklüğüne neden olmasıdır.

Saklama şartlarının ilk değerlere göre sonucu değiştirdiğini saptadık. Örneğin oda ısısında saklamanın, buzdolabında saklamaya göre daha fazla düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Bunun gibi çözerek işlemeyip tekrar dondurmanın, dondurulduktan sonra

bir kez çözme ile yapılan işlemlerdeki sonuçlara göre daha fazla değer düşürdüğünü saptadık. Bu nedenlerle, nefelometrik çalışmalarda hemen işlem yapmamızı eğer imkan yoksa saklamanın dondurularak yapılmasının nispeten az değer kaybı nedeni ile uygun olacağı görüşündeyiz.

Çalışmamızda gerek ASO, CRP gerekse RF için pozitif değer taşıyan serumlar işlemienmiştir. Ancak şartların değişmesinde hiç bir pozitif değer negatife düşmemiştir. Bu nedenle de nefelometrik yöntemin, plazma proteinlerinin saptanmasında oldukça güvenilir olduğu kararındayız.

KAYNAKLAR

1. Bilgehan H, Senter F. Streptococcus. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 6. Baskı, İzmir: Şafak Matbaası, 1994; 214-244.
2. SonnenWirth AC. Serologic Tests in Infectious Diseases II. In: SonnenWirth AC, ed. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, eighth edition. St.Louis: CV. Mosby Company, 1980; 1837-54, 2319-2327.
3. Çetin ET. Genel ve Pratik Mikrobiyoloji. 3 Baskı, Sermal Matbaası, 1973; 528-529.
4. Cengiz, T ve ark. Günümüz toplumlarında antistreptolizin-O (ASO)'nun değeri. Mik. Bül. 1983;17: 13-27.
5. French GL, Lam CW. Post-streptococcal glomerulonephritis in Hong Kong. Arch Dis Child. 1987; 62: 1075-1076.
6. Özsan M. Normal kimselerde ve nefrotik sendromlu hastalarda antistreptolizin-O titreleri. Türk Hijyen ve Tec. Biyoloji Dergisi 1964; 14: 327-332.
7. Silverman M, Christensen RH, Grant GH. Aminoacids and Proteins. In: Tietz NW, ed. Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. Philadelphia: WB. Saunders Company 1986: 598-599.
8. Buke M. Romatoid artrit tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri ve tanı değerleri. Ed. Cüreklibatir F. Romatoid Artrit. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 1977.
9. Mannik M. Rheumatoid Factors. Arthritis. In: Hollande JL, Mecarty DJ, ed. A Textbook and Allred Conditions of Rheumatology, 10th edition. Lea and Febiger,1985; 660-667.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, 1993. HHS Publication No. (CDC) 93-8395.
11. Sumbuloğlu K, Sumbuloğlu V. Biyoistatistik. 6.Baskı, Ankara: Özdemir Yayıncılık, 1995; 45-58, 149.
12. Hayran M, Özdemir O. Bilgisayar, İstatistik ve Tıp Hekimler Yayın Birliği, Medar, 1995;85-286.
13. Fring CS, Gaudie J. Spectral Techniques. In: Kaplan LA, Pesce AJ, ed. Clinical Chemistry, 2nd edition. Philadelphia: C.V. Mosby Company, 1989; 66-72.
14. Whicher JT. Calibration is the key to immnoassays but the ideal calibrator is unattainable. Scand J Clin Lab Invest 1991;51(suppl 205):21-32.
15. Whicher JT, Rihcie RF, Johnson AM et al. New International References Preparation for Proteins in Human Serum (RPPHS). Clin Chem 1994;40:934-936.
16. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. 2nd Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990; 166-167, 492.
17. Tiffany TO. Fluorometry, Nephelometry and Turbidimetry. In: Tietz NW, Burtis CA, Ashwood ER, ed. Fundamental of Clinical Chemistry, 4th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996; 70-81.
18. Stenberg J. A rate nephelometer for measuring ty immunoprecipitin reactions. Clin Chem 1977; 25: 1456-1464.