

# Serum Separatör Tüp ile Trombin İçeren Hızlı Serum Tüplerinde Analiz Edilen Parathormon Düzeylerinin Karşılaştırılması

## *Comparison of Parathyroid Hormone Levels Measured with Serum Separator Tubes and Thrombin-Based Rapid Serum Tubes*

Ayfer Çolak\* Hülya Yalçın\* Merve Zeytinli Akşit\*  
Elif Merve Arı\* Anıl Baysoy\* Mustafa Osman Zengin\*\*

\* Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye

\*\* Iğdır Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Iğdır, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 27 Aralık 2016

**Kabul Tarihi:** 17 Nisan 2017

### ÖZET

**Amaç:** Preanalitik değişkenler laboratuvarlar tarafından verilen sonuçları etkileyen en önemli etkenlerdir. Son yıllarda paratiroidektomi operasyonları sırasında ameliyatın etkinliğini değerlendirmek için intraoperatif Parathormon (PTH) seviyesi kullanılmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, serum separatör tüpleri (SST) ve trombin içeren hızlı serum tüpleri (RST) ile çalışılan PTH sonuçları arasında anlamlı fark olup olmadığını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya 20 gönüllü dahil edildi. Pıhtı oluşumu için RST 5 dakika, SST 30 dakika bekletildi ardından santrifüj edildi ve Siemens Immulite 2000 XPI analizöründe PTH düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Katılımcıların 7'si erkek (%35) 13'ü kadındı (%65). SST için PTH ortalama değeri  $58.9 \pm 35.6$  pg/mL, RST için ise  $54.4 \pm 33.6$  pg/mL olarak bulundu. SST ve RST sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0.009$ ). RST ile SST arasında istatistiksel olarak pozitif yönde güçlü bir korelasyon bulundu ( $p<0.001$ ,  $r=0.981$ ).

**Sonuç:** Son yıllarda özellikle intraoperatif test istemleri ve acil servis gibi hızlı sonuç verilmesi gereken durumlar için RST'ler oldukça faydalı olabilmektedir. Çalışmamızda RST ve SST ile ölçülen PTH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ancak bu fark kabul edilebilir düzeydeydi. Daha fazla hasta grubuyla daha detaylı yapılacak bir çalışmanın yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Parathormon, RST, trombin

### ABSTRACT

**Objective:** Preanalytical variables account for most of laboratory errors and there are many factors that affect and contribute to the results from a patient. In recent years surgeons use intraoperative parathormone (PTH) results to evaluate the efficiency of parathyroidectomy operations. In this study our aim was to compare the PTH results measured with serum separator (SST) and rapid serum tubes (RST).

**Material and Methods:** 20 subjects participated in this study. We waited 30 minutes for serum tubes and 5 minutes for rapid tubes to ensure complete clot formations. After clot formation, all tubes were centrifuged. Parathormone levels were quantified on Siemens Immulite 2000 XPI analyzer.

**Results:** The group consisted of 7 males and 13 females. The mean of parathormone levels for tubes were;  $58.9 \pm 35.6$  pg/mL for serum tubes and  $54.4 \pm 33.6$  pg/mL for rapid tubes. There was statistically significant difference between SST and RST results ( $p = 0.009$ ). There was a positive correlation between rapid and serum tubes ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.981$ ).

**Conclusion:** In recent years studies have shown that rapid serum tubes can be useful for emergency test results because of its shorter clotting time. In this study there were significantly different results between tubes. We think it would be more useful with more subjects.

**Keywords:** Parathormone, RST, thrombin

## GİRİŞ

Laboratuvar hizmetlerinin performansı sıklıkla mümkün olan en kısa sürede doğru test sonuçlarını sunması ile değerlendirilir. Laboratuvar uzmanları kaliteli hizmeti sunabilecek en iyi sonuç verme süresi için sürekli çalışmalar yapmaktadır. Kan alımı ile başlayan, analiz ve sonuç raporlamayla devam eden kan numunesinin yolculuğunda sonuç verme süresini ve doğruluğunu etkileyen değişken etmenler vardır. Preanalitik değişkenler laboratuvarlar tarafından verilen sonuçları etkileyen en önemli etkenlerdir. Preanalitik süreç ile ilgili birçok faktör test sonuçlarının doğruluğunu etkileyebilir (1,2,3). Uygun teknikle kanın alınması, taşınması ve analiz öncesi hazırlık aşaması örneğin kalitesini etkileyen önemli faktörlerdir. Uygunsuz bir teknikle kanın alınması hemoliz nedeniyle sonuçları etkilerken tamamlanmamış bir pıhtılaşmanın sonucu olarak örnekte fibrin bulunması da ciddi interferanslara neden olabilmektedir (3). Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal

Komitesi (NCCLS) serumun hücreler ile uzun süreli temasını önlemek amacıyla en fazla 2 saat içinde serumun ayrılmasını önermektedir (4). Standart serum tüplerinde pıhtılaşma için minimum 30 dakika (dk)'lık bir süre gerekmektedir. Klinik laboratuvarlarda yaygın olarak serum örnekleri kullanılmakla beraber, plazma örneği de elde edilebilme süresinin kısalığı nedeni ile alternatif olarak kullanılabilir (5). Ancak plazma numunesinde tüpteki antikoagulan ile kanın yetersiz karışımı veya örneğin daha kısa süre stabil kalması gibi sıkıntılar yaşanabilmektedir (6). Son yıllarda Becton Dickinson (BD) Diagnostics tarafından geliştirilen hızlı serum tüplerinin (RST) pıhtılaşma için beklenen süreyi 5 dk'ya, santrifüj için gereken süreyi de 3 dk'ya kadar düşürdüğü açıklanmıştır. RST tüpler içeriğinde bulunan sığır trombinini sayesinde pıhtı oluşumunu hızlandırmaktadır (Tablo 1). Trombin pıhtılaşmada önemli rol oynayan bir serin proteaz enzimidir (7).

**Tablo 1.** Tüplerin özellikleri (10)

	SST	RST
Dolum hacmi	5 ml	5 ml
Ayırıcı jel	Polimer jel	Polimer jel*
İç kaplama	Silikon	Silikon
Tüp iç duvar materyali	Polietilen teraflat (PET)	Polietilen teraflat (PET)
Pıhtı aktivatörü	Silika	Trombin
Pıhtılaşma zamanı	30 dk	5 dk
Kapak iç yüzey materyali	Silikon	Silikon

\*SST'den farklı polimer jel

İntraoperatif parathormon (PTH) ölçümü, minimal invaziv paratiroidektomide kullanılan önemli bir yöntemdir. İntakt PTH için biyolojik yarılanma ömrü yaklaşık 2-5 dk'dır. Bu nedenle paratiroid bezinin çıkarılmasını takiben PTH düzeyinde görülecek belirli orandaki bir düşme ameliyatın başarılı olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (8). İntraoperatif PTH kullanımı, test sonucunun beklenmesi sırasında ameliyat süresinin uzamasına neden olmaktadır. RST, kısa sürede serum elde edilmesini sağladığı için bu tüplerin kullanımı sonuç verme süresinin kısılmasına neden olacaktır. Bu çalışma intraoperatif PTH ölçümünde kısa sürede doğru sonuç elde edebilmek için önerilen RST ile laboratuvarımızda kullanmakta olduğumuz pıhtı aktivatörlü jelli tüplerden (SST) elde edilen sonuçlar arasında uyum olup olmadığını ve RST kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Aynı gün içerisinde 20 gönüllüden tek seferde eş zamanlı SST ve RST'ye alınan kan örnekleri ile çalışma gerçekleştirildi. İnterferansa yönelik farklı tüp kıyaslamalarının yer aldığı çalışmalarda izlenen yöntemler inceleyerek (8, 9) üreticinin önerdiği şekilde, SST (5.0 ml) Becton Dickinson Vacutainer SST II Advance (lot no: 5159077; BD Diagnostics, Plymouth, UK) 5-6 kez alt-üst edilip pıhtılaşması için oda sıcaklığında 30 dk bekletilirken; RST (5.0 ml) Becton Dickinson Vacutainer RST (lot no: 140513; BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) 5-6 kez alt-üst edildikten sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Tüpler soğutmalı santrifüj kullanılarak 1600 x g'de 10 dk santrifüj edildi. 20 hastadan aynı zamanda alınan, iki farklı tüpten elde edilen serum örnekleri Siemens Immulite 2000 XPI (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Llanberis, United Kingdom) analizöründe katı fazlı, iki bölge, enzim işaretli immünometrik kemilüminesans yöntem ile analiz edildi. PTH referans aralığı 11-67 pg/mL'dir. Tüplerin özellikleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Bu çalışma için her bir katılımcıdan gönüllü onam formu doldurulmuş olup, hastanemiz etik kurulundan onay alınmıştır.

İstatistiksel analizler; SPSS Statistics 20.0 (Statistical Package for Social Sciences version 20.0, USA), Excel 2007 (Microsoft Corp., USA) ve MedCalc (MedCalc version 8.1.0.0, Mariaekerke, Belgium) programlarıyla yapıldı. Bias(%): $[(RST \text{ ortalaması} - SST \text{ ortalaması}) / SST \text{ ortalaması}] \times 100$  formülü ile % bias hesaplandı. Westgard'a göre PTH için hedeflenen % bias ile hesaplanan % bias karşılaştırıldı. Tüpler arasındaki farkın anlamlılığı için Wilcoxon Signed Ranks testi; ilişki analizi için spearman korelasyon testi; tüpler arasındaki uyum için ise Bland-Altman analizi yapıldı. Bland Altman grafiklerinde "x" eksenine her iki tüpün ortalaması, "y" eksenine ise SST ve RST farkı konuldu.

## BULGULAR

Çalışmaya yaş ortalaması  $46 \pm 14$  yıl olan 13 kadın, 7 erkek olmak üzere toplam 20 gönüllü dahil edildi. PTH düzeyleri ortalama  $\pm$  standart sapma SST'de  $58.9 \pm 35.6$  pg/mL, RST'de  $54.4 \pm 33.6$  pg/mL olarak bulundu. Kolmogorov Smirnov testinde her iki tüpten elde edilen PTH düzeylerinin dağılımı normal olmadığı için Wilcoxon Signed Ranks testi uygulandı. SST ve RST sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0.009$ ) (Tablo 2). SST ve RST sonuçları arasında güçlü pozitif korelasyon saptandı ( $p<0.001$ ;  $r=0.981$ ).

SST ve RST ile elde edilen PTH düzeyleri arasındaki ortalama %bias Tablo 2'de verilmiştir. Ortalama %bias =  $[(RST \text{ Mean} - SST \text{ Mean}) / SST \text{ Mean}] \times 100$  formülü kullanılarak hesaplandı. Çalışmamızda elde ettiğimiz ortalama %bias (-7.6) Westgard'dan alınan hedef % bias'a (8.8) göre kabul edilebilir sınırlar içerisindeydi.

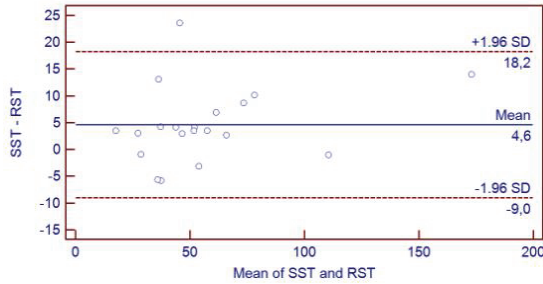
PTH için yapılan Bland-Altman ortalamalar farklar grafiğinde  $\pm 1.96$  SD aralığının dışında sadece 1 nokta olduğu, SST-RST farklar ortalamasının 4.6 olduğu ve farkların -9 ile 18.2 arasında dağıldığı görülmektedir (Şekil 1).

**Tablo 2.** SST ve RST PTH sonuçlarının karşılaştırılması

	RST (n:20)	SST (n:20)	Bias (%)	Hedef Bias (%)	Wilcoxon Signed Ranks testi	Spearman korelasyon analizi
<b>PTH (pg/mL)</b>	54.4 ± 33.6 47.5(15.8-166)*	58.9 ± 35.6 52.9(19.3-180)*	-7.6	8.8 **	p = 0.009	p < 0.001 r = 0.981

Ortalama ± SD

\* Medyan (min-max)

\*\* Westgard QC. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from biologic variation. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. (Erişim: 2016).**Şekil 1.** SST ve RST PTH sonuçları Bland-Altman grafiği

## TARTIŞMA

İntraoperatif PTH ölçümü, minimal invaziv paratiroidektomide kullanılan önemli bir yöntemdir. İntakt PTH için biyolojik yarılanma ömrü yaklaşık 2-5 dk'dır. Bu nedenle paratiroid bezinin çıkarılmasını takiben PTH düzeyinde görülecek belirli orandaki bir düşme ameliyatın başarılı olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (8). Eksizyon öncesi PTH düzeyi ile karşılaştırıldığında, eksizyon sonrası PTH düzeyinde görülecek %50'den fazla düşüşün ameliyat başarısının göstergesi olduğu ve bu durumda ameliyatın sonlandırılabilirliği belirtilmektedir (9). Ameliyat süresinde uzamaya neden olmamak için PTH düzeylerinin hızlı ve güvenilir şekilde ölçülmesi önemlidir. Serumdan çalışılan örneklerde santrifüj için yaklaşık 30 dk beklemek gerekliliği göz önüne alındığında sonuç verme süresini kısaltmak için bu tip vakalarda RST kullanımı daha uygun olabilir.

Farklı tüp kullanılarak elde edilen serum örneklerinin PTH sonuçları üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bu çalışmada; RST ile ölçülen PTH düzeylerinin SST'ye göre daha düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak

anlamli olduğu bulundu. Bunun yanı sıra RST ile elde edilen sonuçların SST'ye göre ortalama 4.6 daha düşük olduğu ve bunun -7.6 % bias karşılık geldiği hesaplandı. Westgard'ın önerdiği bias göre çalışmamızda elde ettiğimiz bias kabul edilebilir sınırlar içinde idi.

Yan ve ark. yapmış oldukları çalışmada Abbott Architect analizöründe RST ve SST tüpleri ile elde edilen PTH sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlardır. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde PTH seviyesinin RST'de SST'ye göre daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Fakat bizim çalışmamızdaki sonuçlardan farklı olarak hesaplanan % bias'ın (-15.3) klinik olarak da anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır (11).

Uçar ve arkadaşları 2015 yılında 97 sağlıklı gönüllünün katılımı ile rutin kimya ve immunoassay parametrelerini incelemiş oldukları çalışmada diğer çalışmaların aksine PTH düzeylerini RST'de SST'e göre anlamlı yüksek bulmuş ve iki tüp arasındaki %1.95'lik farkın kabul edilebilir aralıkta olduğunu söylemişlerdir. Aynı çalışmada numune stabilitesi incelendiğinde +4°C'de PTH stabilitesinin her iki tüp içinde 4 saat olduğu belirtilmiş ve 4.saatte her iki tüpte de PTH seviyelerinde kabul edilebilir düzeyde azalma olduğu, hatta SST'de ki azalmanın RST'ye göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (12).

Paratiroid hormon paratiroid bezlerde sentez edilerek salgılanan 84 aminoasitten oluşan bir polipeptiddir. Paratiroid bezden salgılanan 1-84 aminoasitlik bu hormon "İntakt parathormon" olarak da isimlendirilir. İntakt

form dolaşımında süratle N-terminal ve C-terminal peptit fragmanlarına bölünür (13). Bu formlar, PTH immunoassay cihazlarında kullanılan çeşitli antikorlar tarafından farklı şekilde tanınabilir. Bu durum PTH ölçümünde varyasyonlara neden olduğundan yeni jenerasyon yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır (14). İmmunoassay yöntemlerde yöntem kurulumu (antikor seçimi ve immunoassay yöntemin nasıl oluşturulduğu) dışında başka faktörlerinde ölçümler arasında değişkenliğe neden olduğu açıklanmıştır. Preanalitik (numune türü, stabilitesi, vb) faktörler de bunlardan biridir (15). Bu nedenle yöntemin kurulumu ve numune türünün seçiminde ölçüm farklılıklarının klinik olarak ne kadar anlamlı olduğu büyük önem taşımaktadır.

La'ulu ve ark.'nın PTH sonuçlarının RST'de SST'den daha düşük olmasının nedenini araştırdıkları çalışmada serum örnekleri eksojen sığır trombini, direk trombin inhibitörü hirudin ve ikisi ile birlikte inkübe edilmiş. RST'de görülen PTH düşüklüğünün sığır trombininden kaynaklandığı ve PTH'da parçalanmaya neden olarak daha düşük düzeylere neden olduğu bildirilmiş. Ancak yine aynı çalışmada SST'de de PTH seviyesinde minimal azalmalar görülmüş ve bunu nedeninin aktif pıhtılaşma süresindeki endojen trombinden kaynaklanabileceği söylenmiştir. İlginç olarak bu çalışmada hirudin ilavesine rağmen PTH seviyelerinde azalma görülmüştür. Bu durum PTH yıkımında trombin dışı proteolitik enzimler gibi ek mekanizmaların da sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (16).

Trombin içeriği dışında tüpler arasında başka farklılıklar da göz önünde bulundurulabilir; bunlardan biri içerdikleri jelin kimyasal yapısının ayrı oluşudur. Bütün bunlar PTH düzeylerinde gözlediğimiz farklılıkla ilişkili olabilir ancak bunu açıklayabilecek verimiz yetersizdir.

Bu çalışmada karşılaştırma çalışmalarının istatistiksel analizinde altın standart kabul edilen Bland-Altman analizinin yapılmış olması çalışmanın güçlü yönüdür. Bu istatis-

teksel analiz yöntemine göre iki yöntemeye ait ölçüm farklılıkları objektif olarak ortaya koyulmakta ve farklılıkların kabul edilebilirlik düzeyinin yorumu laboratuvar uzmanının görüşüne bırakılmaktadır. Bu çalışmanın zayıf yönleri PTH ölçümünün Siemens Immulite 2000 XPI analizörü kullanılarak tek cihaz ile yapılmış olması, cihazın sadece serum örneğinde ölçüm yapması nedeni ile plazma örneklerinde PTH seviyelerinin değerlendirilememiş olması ve ölçülen PTH seviyelerinin genellikle referans aralık içinde olmasıdır. Çalışmamızdaki diğer bir kısıtlılık ise RST kullanılarak belirlenmiş referans aralık değerlerinin mevcut olmamasıdır.

## SONUÇ

Çalışmamızda; RST kullanılarak elde ettiğimiz serumda ölçülen PTH sonuçlarının SST'ye göre ortalama 4.6 daha düşük ölçüldüğünü bulduk. Bu farklılığın karşılık geldiği %bias Westgard - tarafından öngörülen sınırlar içindedir. RST sayesinde kısa sürede sonuç elde edilebilmesi ameliyat süresi ve maliyetini azaltmaya katkıda bulunacaktır. Ancak PTH ölçümünde yaşanan varyasyonlar nedeni ile farklı cihazlar ve daha geniş örneklem sayısı ile doğrulama çalışmalarının yapılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Manor PG. Turnaround times in the laboratory: a review of the literature. *Clinical Laboratory Science* 1999;12(2):85-89.
2. Chung HJ, Lee W, Chun S, Park HI, Min WK. Analysis of turnaround time by subdividing three phases for outpatient chemistry specimens. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2009;39(2):144-149.
3. Reichstein E. The importance of preanalytical factors in immunodiagnostic testing. *eJIFCC* 2003;14:3.
4. Wayne PA. National Committee for Clinical Laboratories Standards(NCCLS) document H18-A2. Procedures of the handling and processing of blood specimens. NCCLS, 1999.
5. Miles RR, Roberts RF, Putnam AR, Roberts WL. Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. *Clinical Chemistry* 2004;50(9):1704-1706.
6. Er TK, Tsai LY, Jong YJ, Chen BH. Selected analyte values in serum versus heparinized plasma using the SYNCHRON LX PRO assay methods/instrument. *Laboratory Medicine* 2006;37(12):731-732.

7. Becton Dickinson Vacutainer Blood Collection Tube Product Ordering Information. [http://www.bd.com/vacutainer/products/venous/ordering\\_info\\_tubes.asp#specialty\\_other\\_plastic](http://www.bd.com/vacutainer/products/venous/ordering_info_tubes.asp#specialty_other_plastic). (Accessed October 2016).
8. Irvin GL, Deriso GT. A new, practical intraoperative parathyroid hormone assay. *Am J Surg* 1994; 168:466-468.
9. Irvin GL, Solorzano CC, Carneiro DM. Quick Intraoperative Parathyroid Hormone Assay: Surgical Adjunct to Allow Limited Parathyroidectomy, Improve Success Rate, and Predict Outcome *World J Surg* 2004;28:1287-1292.
10. Yan R, Colantonio D, Wong P-Y, Chen Y. Suitability of Becton Dickinson Vacutainer rapid serum tube for collecting and storing blood samples for antibiotic and anticonvulsant drug monitoring. *J Clin Pathol* 2014;67:807-810.
11. Yan R, Lou A, Watts G, Tarr H, Smith H, Kinney L, et al. Comparison of Becton Dickinson Vacutainer rapid serum tube with the serum separator tube for routine chemistry and immunoassay tests. *J Clin Pathol* 2014;67(7):599-604.
12. Ucar F, Erden G, Arzuhal AE, Özdemir S, Öztürk A, Özcan N. Do rapid serum tubes provide comparable test results or improved stability when compared with serum separator tubes? *Acta Medica* 2015;4:23-27.
13. Sturgeon CM, Seth J. Why do immunoassays for tumour markers give differing results?-A view from the UK National External Quality Assessment Schemes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:755-759.
14. Cole DE, Webb S, Chan PC. Update on parathyroid hormone: new tests and new challenges for external quality assessment. *Clin Biochem* 2007;40:585-590.
15. Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringhurst FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxylterminalligands. *Endocr Rev* 2005;26:78-113.
16. La'ulu SL, Straseski JA, Schmidt RL, Genzen JR. Thrombin-mediated degradation of parathyroid hormone in serumtubes. *Clinica Chimica Acta* 2014;437:191- 196.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Hülya Yalçın  
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Tıbbi Biyokimya  
İzmir, Türkiye  
e-mail: hzaferyalcin@gmail.com

---