

Klinik Biyokimya'da Yöntem Seçimi ve Ön Hazırlıklar

Asuman H. GÜLER*

ÖZET

Bir yöntem çalışması rastgele yapılamaz. Bu konuda, yöntem seçiminin başlamak üzere, analiz aşamasına gelinceye kadar bir dizi ön hazırlık gereklidir. Laboratuvar koşullarına uygun olarak belirli bir yöntem seçildikten sonra o yöntemin ön hazırlıkları yapılır. Bu amaçla "cihaz(lar), temizlik işlemi, kullanılacak malzemenin seçimi, örnekler, standartlar, kontroller ve kör" konuları incelenip, o yönteme özgün olarak belirlenip hazırlanmalıdır. Ancak bundan sonra o yöntemle deneye güvenilir bir şekilde başlanabilir.

SUMMARY

Method Selection and Pre-Analytical Preparations in Clinical Chemistry

One can not go into an analytical work rashly. It requires a set of pre-analytical preparations, beginning from the selection of the method to the step of analysis. After choosing a method, according to the laboratory conditions, pre-analytical preparations begin. In the aim of this, "apparatus, cleaning process, selection of the materials which will be used in the analysis, samples, standarts, controls and blank" subjects

* Doç. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

must be investigated and established specifically and distinctly for that method and then prepared. Unless then, one can begin to analysis with that method accurately.

Klinik biyokimya laboratuvarlarında bazı yöntemler, biyokimyacı tarafından kurulup çalışılabilir. Burada bir yöntemin seçiminden o yöntemin analiz aşamasına kadar, yapılması gerekli ön hazırlıklardan söz edilmeye çalışılacaktır.

Herhangi bir yöntem çalışması planlanırken, öncelikle belirlenmesi gereken bir, iki nokta vardır. Bunlar:

1- Amaç:

Genellikle klinisyenlerden gelen istekler doğrultusunda veya biyokimyacıların öngördüğü şekilde bir maddenin tayini gündeme gelir.

2- Amaca Yönelik Yöntem Araştırması¹⁻³:

Bir test için çok çeşitli, değişik yöntemler olabilir. Bunu belirlemek amacıyla: a) Önce *kaynak taraması* yapılır. Bu kaynaklardan elde edilen bilgiler toplanıp sıralanır.

b) Kaynaklarda belirtilen yöntemlerin gerektirdiği; -cihaz ve/veya cihazlar, kimyasal maddeler, ayraçlar, laboratuvar malzemeleri, teknik personel vb. belirlenir. Bunlar laboratuvarında var olanlarla kıyaslanır. O laboratuvarında hangi cihaz, kimyasal madde vb. varsa, onların kullanıldığı yöntemler seçilir, diğerleri bırakılır. Bu şekilde bir yerde, zorunlu olarak çalışılacak yöntemler kabaca belirlenmiş olur. Böylece elde var olan değerlerden yararlanılır. Genellikle tek bir yöntem yeterli olmaz. Çünkü, her cihazın kendisine özgün özellikleri vardır. Bir cihazda iyi işleyen yöntem, diğerinde işlemeyebilir. Bu nedenle en azından iki değişik yöntemin çalışılıp, kıyaslanmasında yarar vardır. Zaten biyokimya, yöntem çalışmalarında kullanılması önerilen "referans" yöntemler vardır⁴. Seçilen yöntemle birlikte, bu referans yöntem çalışıldıktan sonra, sonuçları istatistiksel açıdan ve analitik yöntemlerle kıyaslanırlar. Aralarındaki önemlilik farkının az olması halinde; analitik açıdan uygun ve daha kolay, ucuz ve kısa zamanda sonuç veren yöntem tercih edilir.

Yöntem ve/veya yöntemler için madde ve analizde kullanılacak cihazlar laboratuvar koşullarına göre belirlendikten sonra, analiz öncesi yapılması gereken işler sıraya konur. Bunlar yöntem çalışmasının *ön hazırlıklarını* kapsar:

1- Cihaz⁵:

Bizim gibi gelişmekte olan ülkelerde, nadiren amaca yönelik cihaz alımları söz konusu olur. Genellikle o laboratuvarında var olan cihazda çalışılabilecek bir yöntem seçildiği için, o cihaza ait tüm özellikler genel olarak, önce klasik bir kitaptan okunup öğrenilir. Sonra o modelin özellikleri, cihaza ait el kitabından

incelenir. Bunları yaparken başlıca şu noktalara dikkat edilmelidir: a) Cihazın çalıştırılma şekli, b) Kalibrasyonu ve kalibrasyonun kontrolü, c) stabilitesi (özellikle elektrik voltaj ve su ile çalışanlarda su akım hızının değişimlerinde).

2- Temizlik İşlemi^{6,7}:

Bazı yöntemlerde ana temizlik kurallarının dışında, özel temizlik gerektiren koşullar olabilir. Normalde musluk suyu ve distile su ile iyice yıkandıktan sonra, cam malzemenin asetonla (organik çözücü) geçirilmesi önerilmektedir. Ama daha da duyarlı bir çalışma isteniyorsa, cam malzeme, belli konsantrasyonlarda belli asitlere yatırılarak da temizlenebilir.

3- Kullanılacak Malzemenin Seçimi:

Belli bir yöntemde, kullanılacak malzemenin cinsi önemlidir. Bu nedenle tüp, pipet ve diğer cam malzemenin deneye uygun olarak seçilmesi gerekir. Örneğin cam veya polistiren tüp mü, otomatik/kapiller/cam pipet mi gerekiyor, belirlenmelidir.

4- Örnekler^{9,10}:

a) Cinsi: Önce testin nerede yapılacağı saptanır. Eğer klinikçilerin özellikle istedikleri bir yer söz konusu ise (ör. eklem sıvısı) rutin'in dışında orada analizin yapılma koşulları araştırılmalıdır. Bir yöntemde serum, plazma, idrar, gaita, doku veya doku sıvıları örnek olarak kullanılabilir. Değişik örneklerde değişik işlemlerin (ekstraksiyon, homojenizasyon, dilüsyon vb.) yapılması gerekebilir. Bunlar belirlenmeli ve analiz öncesi gerçekleştirilmelidir.

b) Örneğin Toplanma Şekli:

-*Zamanı*: Örneğin alınma zamanı standardize edilmelidir. Özellikle rutine sokulacak yöntemlerde bu konu önemlidir. Çünkü bazı değerlerde, gün-içi varyasyonlar olabilir (Ör: Kortizol).

-*Açlık-tokluk*: Genel bir kural olarak, rutin çalışılacak kan örnekleri alınmaktadır. Örneğin; sedimentasyon, alkalin fosfataz ve lipid parametreleri gibi değerler mutlaka aç karnına bakılmalıdır. Ama tüm biyokimyasal parametrelerin toklukta etkilediği söylenemez. Acil durumlarda gözönünde bulundurulmalı ve tokluğun değerler üzerindeki etkisi araştırılıp belirlenmelidir. Klinisyenle ortak işbirliği yapılırsa, anormal ve beklenmeyen sonuçlar tartışılıp konu açıklığa kavuşturulabilir.

- Örnek alınırken *hastanın pozisyonu* önemlidir. Özellikle serum proteinlerinde ve proteine bağlı bileşiklerin miktarında stazla ilgili değişiklikler görülebilir.

- Örnek konacak kabın veya tübün özelliği.

- *Hastanın teste hazırlanması*: Bazı testlerde, hastaya test öncesi özel bir diyet uyulanabilir veya bazı yiyecekler kısıtlanabilir. Tüm bu ve benzeri konular belirlendikten sonra örnek alınmalıdır.

c) Örneğin saklanma şekli:

Örnekler alındığı gün hemen çalışılabilir. Eğer örnekler toplandıkça belirli aralıklarla çalışılacaksa, alınan örneğin nerede, kaç derecede, ağzı kapalı mı açık mı saklanacağı belirlenmelidir. *Maksimum bekleme süresi* saptandıktan sonra bu süre içinde test yapılmalıdır.

5- Standartlar^{11,12}:

Biyokimyada kural olarak standartsız çalışma olmaz. Standart; içinde bilinen konsantrasyonda, ölçümü yapılacak maddeden içeren çözelti demektir. Örnekteki madde konsantrasyonu hakkındaki sonuca, mutlaka standartla kıyaslama yapılarak gidilir. Bu amaçla ya standart eğri grafiğinden yararlanılır ya da standartla örnek birlikte çalışılır.

Standartlar belli özellikte, analitik saflıkta madde veya kimyasal maddelerden hazırlanır. Standart hazırlamada ideali, iki değişik firmaya ait, analitik saflıkta, yaklaşık aynı özellikte kimyasal maddelerin kullanılmasıdır. Buna göre, iki değişik standart hazırlanarak, sinanabilir.

6- Kontroller^{13,14}:

a) **Ticari kontroller**: İnsan serumu içeren ve üzerlerinde yaklaşık içerikleri (konsantrasyonları) belirtilmiş kontrol serumları piyasada mevcuttur.

b) **Kontrol havuzu**: Ticari kontrollerin bulunamadığı zamanlarda sağlıklı insanlardan toplanan örneklerle, bir "örnek havuzu" yapılabilir. Bu havuz daha sonra ufak şişelere bölünerek, deney boyunca "kontrol örnek" olarak kullanılabilir. Serum havuzu dışında, diğer örneklerden havuz oluşturmak oldukça zor olabilir. Ama yöntemin güvenilirliğini göstermesi açısından mutlaka kontrol çalışılmalıdır.

7- Kör¹⁵:

Kör; *ayraç* veya *örnek körü* olarak hazırlanabilir. Örnek körü kullanılırsa, örneğin içinde ölçümü yapılacak madde dışındaki maddelerin yapacağı interferans etkisi böylelikle ortadan kaldırılmış olur. Ama rutin çalışmada her örneğe bir kör hazırlamak oldukça zor ve zaman alıcı bir işlemdir. Ayrıca iki misli örnek harcanmasına yol açar. Bu nedenle ayraç ve örnek körü ile çalışma yapıp sonuçları kıyaslandıktan sonra arada önemli bir fark yoksa, ayraç körü ile çalışma tercih edilir.

Ayrıca kör sıfır değerinden çok fazla sapmaya yol açmamalıdır. Aksi takdirde yöntemin duyarlılığı (sensitivity) azalır.

Bir yöntem seçimi ve bu yöntemin çalışılması için yapılması gerekli on hazırlıklar böylece tamamlandıktan sonra ancak, "analiz" aşamasına geçilmelidir.

KAYNAKLAR

1. GALEN, R.S.: Selection of appropriate tests. In: Clinician and Chemist (eds. D.S. Young, J. Hicks, H. Nipper). Washington D.C., American Association for Clinical Chemistry, 1979, p. 69-105.
2. PETERS, T., WESTGARD, J.O.: Evaluation of methods. In: Textbook of Clinical Chemistry (ed. N.W. Tietz). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, p. 410-23.
3. BARNETT, R.N., YOU DEN, W.J.: A revised scheme for the comparison of quantitative methods. Am. J. Clin. Pathol. (Suppl.), 54: 454-62, 1970.
4. GILBERT, R.K.: Accuracy of clinical laboratories studied by comparison with definitive methods. Am. J. Clin. Pathol., 70: 450-70, 1978.
5. BURTIS, C.A.: Analytical procedures and instrumentation. In: Textbook of Clinical Chemistry (ed. N.W. Tietz). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986; p. 55.
6. EVENSON, M.A.: Measurement of copper in biological samples by flame or electrothermal atomic absorption spectrometry. Methods in Enzymology, 158: 351-7, 1988.
7. BERMES, E.W., YOUNG, D.S.: General laboratory techniques and procedures. In: Textbook of Clinical Chemistry (ed. N.W. Tietz). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, p. 15.
8. BURTIS, C.A.: Factors influencing evaporation from sample cups and assesment of their effect on analytical error. Clin. Chem., 21: 1907-17, 1975.
9. FELDING, P., TRYDING, N., HYLTOFT, P.P.: Effects of posture on concentration of blood constituents in healthy adults: Practical application of blood specimen collection procedures recommended by the Scandinavian Committee on Reference Values. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40: 615-21, 1980.
10. ROSSING, R.G., FOSTER, D.M.: The stability of chemistry specimens during refrigerated storage for 24 hours. Am. J. Clin. Pathol., 73: 91-5, 1980.
11. HENRY, R.J., SEGALOVE, M.: The running of standards in clinical chemistry and the use of the control chart. J. Clin. Pathol., 5: 305-11, 1982.

12. WALTER, B.: Dry reagent chemistries in clinical analysis. *Anal. Chem.*, 55: 498-514, 1983.
13. BOWERS, G.N., BURNETT, R.W., McCOMB, R.B.: Preparation and use of human serum control materials for monitoring precision in clinical chemistry. *Selected Methods for Clin. Chem.*, 8: 21-7, 1977.
14. BEGTRUP, H., LEROY, S., THYREGOD, P.: Average of normals used as control of accuracy and a comparison with other controls. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 27: 247-53, 1971.
15. MACDOUGALL, D., CRUMMETT, W.B.: Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.*, 52: 2242, 1980.

Doç. Dr. Asuman H. GÜLER
U.Ü. Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Görükle / BURSA