

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ LABORATUVARLARDA AKREDİTASYONDA YÖNTEM
GEÇERLİLİĞİNİN KANITLANMASI: 25(OH)VİTAMİN D ÖRNEĞİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Berna YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Diler ASLAN

Denizli, 2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Berna YILMAZ tarafından Prof. Dr. Diler ASLAN yönetiminde hazırlanan “**Tıbbi Laboratuvarlarda Akreditasyonda Yöntem Geçerliliğinin Kanıtlanması: 25(OH)Vitamin D Örneği**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Süleyman DEMİR**
Pamukkale Üniversitesi

Danışman: **Prof. Dr. Diler ASLAN**
Pamukkale Üniversitesi

Üye: **Prof. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR**
Dokuz Eylül Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Berna YILMAZ

İmza:

ÖZET

TIBBİ LABORATUVARLARDA AKREDİTASYONDA YÖNTEM GEÇERLİLİĞİNİN KANITLANMASI: 25(OH)VİTAMİN D ÖRNEĞİ

Berna YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Diler ASLAN

Mayıs 2019, 109 Sayfa

Türkiye'de tıbbi laboratuvarlar ISO 15189 standardına göre akredite olurlar. Hasta analizine başlanmadan analiz prosedürlerinin geçerliliğinin ve referans aralıklarının doğrulanması akreditasyon şartlarındandır. Bu çalışmada, bir tıbbi laboratuvarın ölçüm prosedürü geçerliliğinin kanıtlanmasında dünyada yaygın kullanılan CLSI Kılavuzlarının uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi ve buna yönelik Türkçe kılavuzların oluşturulması amaçlandı. Önerilen deneyler 25(OH) VitaminD ölçüm prosedürüne uygulandı. CLSI Kılavuzlarına göre 25(OH)Vitamin D3 HPLC ölçüm prosedürünün performans özelliklerinin (tekrarlanabilirlik, gerçeklik, rapor edilebilir aralık) ve referans aralıklarının doğrulanması deneyleri gerçekleştirildi. Deneylerde kalite kontrol materyali olarak üç farklı düzey (10, 30 ve 73 ng/ml) ikincil referans materyal kullanıldı. Hasta ve sağlıklı bireylerden plazma havuzları oluşturuldu. Gerçeklik değerlendirilmesinde LC-MS/MS yöntemi ile karşılaştırıldı. Referans bireyler 18-45 yaş arasında sağlıklı 40 kadın ve 40 erkekten oluşturuldu. Kesinlik: Her düzey için, sırasıyla çalışma içi ve çalışmalar arası %CV'ler : %8,8, %7,5, %5,2; %6,6, %2,0, %3,0 bulundu. Firmanın tekrarlanabilirlik değerlerinden yüksek bulundu. Güniçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik doğrulandı. Diğer çalışmalardaki %10 CV değerleriyle de uyumluydu. Gerçeklik, KKM sonuçlarına göre firma değerini sağlıyorken, hasta örnekleriyle yapılan karşılaştırmalara göre % bias değerleri yüksek bulundu. LC-MS/MS ile karşılaştırma deneyi regresyon istatistiği ölçüleri: $n=31$, $25\text{OHVitD3(HPLC)}=-1,61+1,39(\text{LC-MS/MS})$, $r=0,976$, $Sy/x=6,03$ idi. Üç KKM için % biaslar 13, 24, 27 olarak hesaplandı. KKMlerdeki geri kazanımlar sırasıyla %104,3, %98,6, %103,3'ü. Yöntem %14 bias hedefine göre 30-135 µg/l arasında doğrusal bulundu. Referans aralıklar (%90GA): $n=80$ 6,77(6,26-10,9)-61,32(48,9-63,6) µg/l olarak belirlendi. Çalışmamızda, diğer araştırma sonuçlarına uyumlu olarak 25(OH)VitD3'ün zorlayıcı bir analit olduğu kanıtlandı. D Vitamini düzeylerinin referans aralıklarına göre değil klinik kılavuzların önerilerine göre değerlendirilmesi uygundur. CLSI Kılavuzları klinik laboratuvarda uygulanabilir. Uygulamalar sonucunda hazırladığımız Türkçe kılavuzlar CLSI kılavuzlarının anlaşılabilirliğini sağlamaktadır. Çalışmamızın en önemli sonucu; laboratuvarlarda bilgisayar, istatistik ve yüksek matematik hesaplamalarında yetkin personel gerekliliği yanında ölçüm prosedürü geçerliliğinin doğrulanması deneyleri için kolaylaştırıcı ulusal politikaların oluşturularak yürürlüğe konması gerektiğidir.

Anahtar Kelimeler: Kesinlik, gerçeklik, doğrusallık, referans aralık, 25-hidroksivitaminD

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2011SBE008).

ABSTRACT**METHOD VERIFICATION FOR MEDICAL LABORATORY ACCREDITATION:
EXAMPLE OF 25(OH) VITAMIN D**

Berna YILMAZ

M. Sc. Thesis in Medical Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Diler ASLAN

May 2019, 109 Pages

Medical laboratories in Turkey is accredited according to "ISO 15189 Standard". Before starting the patient analysis, verification of the analysis validity and reference interval verification are accreditation requirements. The aim of this study was to evaluate the applicability of the widely used CLSI Guidelines in the world to prove the validity of the measurement procedure of a medical laboratory and to create Turkish guidelines for this process. The proposed experiments were applied to the 25(OH)VitaminD measurement procedures. According to the recommendations of the CLSI Guidelines, experiments were performed to verify the performance characteristics (precision, trueness, reportable range) and reference intervals of the HPLC 25(OH)VitaminD3 measurement procedure. Three levels (10,30 ve 73ng/ml) of quality control materials (QMs) secondary materials were analyzed. Plasma pools were created from patients and healthy individuals. For trueness, it is compared with LC-MS/MS method. The reference individuals consisted of healthy 40 women and 40 men between 18-45 Precision, within-run and between-run for %CVs respectively as 8,8%, 7,5%, 5,2%, 6,6%, 2,0%, 3,0% were estimated for each level QMs, higher than claimed value. Within-run and between-run precision was confirmed. It was consistent with the CV values of 10% in other studies. Trueness estimated from the QMs was verified, but the bias% was found higher from the comparisons performed with the patients' samples. LC-MS/MS comparison experiments regression statistic measures: $n=31$, $25\text{OHVitD3(HPLC)}=-1,61+1,39(\text{LC-MS/MS})$, $r=0,976$, $Sy/x=6,03$. For three QMs: bias%13, 24, 27 were estimated. Recovery of the QMs respectively as 104,3%, 98,6%, 103,3% were estimated. The method was linear between 30-135 $\mu\text{g/l}$ according to the 14% bias target. Reference ranges were determined as (90% GA): $n = 80$ 6,77(6.26-10,9)-61.32(48,9-63,6) $\mu\text{g/l}$. In our study, 25 (OH) VitD3 proved that it is a compelling analyte, consistent with other research results. It is appropriate to evaluate vitamin D levels according to the recommendations of the clinical guidelines and not the reference ranges. CLSI Guidelines can be applied in the clinical laboratory. The Turkish manuals that we have prepared ensure the comprehensibility of the CLSI manuals. The most important result of our study. In addition to the necessity of competent personnel in computer, statistics and higher mathematical calculations in laboratories, facilitation national policies should be established and put into force for validation of measurement procedure validation.

Keywords: Precision, trueness, linearity, reference interval, 25-hidroxyvitaminD**This study was supported by Pamukkale University Scientific Resarch Projects
Coordination Unit through (Project Number: 2011SBE008).**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteğini sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Diler ASLAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Süleyman DEMİR olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Deneylerin gerçekleşmesindeki yardımları ve içten dostlukları için Dr. Öğr. Üyesi Esin AVCI, Uzm. Dr. Dilek İREN EMEKLİ ve Teknisyen Abdullah ÖZLÜK'e

Yüksek Lisans tez projemin gerçekleşmesi için gerekli kaynağı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Lisans eğitimimden beri her zaman bana olan desteğini hissettiren ve bilgilerini benimle paylaşan Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden hocam Doç. Dr. Filiz YILMAZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerekli desteği sağlayan Denizli Büyükşehir Belediyesi'ndeki yöneticilerime ve mesai arkadaşlarıma,

Hayatımda yer ederek büyük anlamlar katan, iyi ki tanışmışım dediğim sadece mutlu anlarımda değil zor zamanlarımda da yanımda olan sevgili dostlarıma,

Beni ben yapan her durumda benimle birlikte olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Amaç.....	1
2 KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1 Akreditasyon.....	3
2.2 Ölçüm Prosedürlerinin Performans Özellikleri.....	5
2.3 Ölçüm Prosedürlerinin Geçerli Kılınması (Validasyon).....	7
2.4 Geçerliliğin Doğrulanması (Verifikasyon).....	8
2.4.1 Tekrarlanabilirliğin doğrulanması.....	9
2.4.2 Gerçeklik performansının doğrulanması.....	9
2.4.3 Doğrusallığın (rapor edilebilir aralığın) doğrulanması.....	10
2.4.4 Referans aralığın geçerliliğinin doğrulanması.....	10
2.5 D Vitamininin Ölçüm Prosedürleri ve Performans Özellikleriyle İlgili Araştırmalar.....	11
2.5.1 D vitaminin bulunuşu ve biyolojik aktif formları.....	12
2.6 Hipotez.....	16
3 GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	18
3.1 Gereç.....	18
3.1.1 Çalışmada ölçümü yapılan örnekler.....	18
3.1.2 Doğrulama deneylerinde kullanılan materyaller.....	19
3.1.3 Kılavuzlar.....	20
3.1.4 D vitamini ölçüm prosedürü.....	20
3.2 Yöntem.....	23
3.2.1 Tekrarlanabilirliğin doğrulanması.....	24
3.2.2 Gerçekliğin doğrulanması.....	24
3.2.3 Doğrusallığın (rapor edilebilir aralığın) doğrulanması.....	25
3.2.4 Referans aralığın geçerliliğinin doğrulanması.....	26
3.2.5 Hesaplamalar ve istatistiksel analiz.....	27
4 BULGULAR.....	28
4.1 Tekrarlanabilirliğin Doğrulanması.....	28
4.2 Gerçekliğin Doğrulanması.....	39

4.3 Doğrusallık (Rapor Edilebilir Aralığın) Doğrulanması	44
4.4 Referans Aralığın Geçerliliğinin Doğrulanması.....	55
5 TARTIŞMA.....	61
6 SONUÇ	69
7 KAYNAKLAR	70
8 ÖZGEÇMİŞ.....	75
9 EKLER	76
EK-1 ISO 15189 Yönetim ve Teknik Şartlar ve ISO 15189 Standardının Ölçüm Prosedürünün Doğrulanmasıyla İlgili Maddeleri.....	76
EK-2 Tekrarlanabilirliğin Doğrulanması Süreç Yönetimi	76
EK-3 Gerçekliğin Doğrulanması Süreç Yönetimi	76
EK-4 Rapor Edilebilir Aralığın Doğrulanması Süreç Yönetimi	76
EK-5 Referans Aralığın Doğrulanması Süreç Yönetimi.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Vitamin D3 Kolekalsiferol	12
Şekil 2.2 Vitamin D2 - Ergokalsiferol	12
Şekil 2.3 D vitamininin sentezi	14
Şekil 2.4 D Vitaminin metabolizması	15
Şekil 2.5 D vitamini ve doku homeostazi	15
Şekil 3.1 Chromsystem 25(OH)VitaminD ₃ /D ₂ serum/plazma HPLC kromatogramı	22
Şekil 4.1 Karşılaştırma grafikleri (Regresyon ve Bland-Altman)	44
Şekil 4.2 İlk sekiz konsantrasyonun beklenen ve ölçülen değerlerinin regresyon grafiği	45
Şekil 4.3 Ticari kontrol materyallerden hazırlanan dilüsyonların beklenen ve ölçülen değerlerinin regresyon grafiği.....	49
Şekil 4.4 Doğrusallığın değerlendirme basamakları	52
Şekil 4.5 Çalışma grubunun 25(OH)D3 ölçüm sonuçlarının histogramı.....	57
Şekil 4.6 Erkek grubunun 25(OH)D3 ölçüm sonuçlarının histogramı.....	57
Şekil 4.7 Kadın grubunun 25(OH)D3 ölçüm sonuçlarının histogramı.....	58
Şekil 4.8 D vitamini gruplarının kalsiyum düzeyleri.....	59
Şekil 4.9 D vitamini gruplarının PTH düzeyleri	60
Şekil 4.4 Doğrusallığın değerlendirme basamakları	100

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Ölçüm prosedürlerinin performans özellikleriyle terimleri, kavramları ve ölçüleri	6
Tablo 2.2 Verifikasyonda değerlendirilen ölçüm prosedürü, performans özellikleri	8
Tablo 2.3 D vitamininin biyolojik aktif formları	13
Tablo 3.1 Plazma havuzları	19
Tablo 3.2 UTAK kontrol materyalleri	19
Tablo 3.3 Kit kılavuzunda sunulan validasyon sonuçları	23
Tablo 3.4 Kit kılavuzunda Vitamin D içi serum konsantrasyonlarıyla ilgili kestirim değerleri (klinik karar değerleri).....	23
Tablo 3.5 Dilüsyonla hazırlanan 8 farklı konsantrasyonda deney örneği	25
Tablo 3.6 Analiz örneklerinin hazırlanması.....	26
Tablo 4.1 Plazma havuzu 25(OH)Vit D3 HH1 tekrarlanabilirlik kayıt formu	28
Tablo 4.2 Plazma havuzu 25(OH)Vit D3 HH2 tekrarlanabilirlik kayıt formu	29
Tablo 4.3 Plazma havuzu 25(OH)Vit D3 HH3 tekrarlanabilirlik kayıt formu	30
Tablo 4.4 Hesaplama sonuçları	31
Tablo 4.5 25(OH)Vitamin D ₃ düşük düzey_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu	31
Tablo 4.6 25(OH)Vitamin D ₂ düşük düzey_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu	32
Tablo 4.7 25(OH)Vitamin D ₃ düzey 1_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu.....	34
Tablo 4.8 25(OH)Vit D ₂ düzey 1_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu	35
Tablo 4.9 25(OH)Vitamin D ₃ düzey 2_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu.....	36
Tablo 4.10 25(OH)Vitamin D ₂ düzey 2_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu.....	37
Tablo 4.11 Gün içi değerlendirme sonuçları.....	38
Tablo 4.12 Günler arası değerlendirme sonuçları	39
Tablo 4.13 Ölçüm sonuçları ve hesaplamalar	40
Tablo 4.14 KKMLerle gerçekliğin hesaplamaları	41
Tablo 4.15 Karşılaştırma çalışması sonuçları.....	42
Tablo 4.16 31 örnek ile karşılaştırma sonuçları.....	43
Tablo 4.17 25(OH)Vitamin D ₃ çift ölçüm değerleri.....	44
Tablo 4.18 Birinci derece polinomial regresyon.....	46
Tablo 4.19 İkinci derece polinomial regresyon	47
Tablo 4.20 Üçüncü derece polinomial regresyon.....	48
Tablo 4.21 Rapor edilebilir aralığın değerlendirilmesi.....	49
Tablo 4.22 Birinci derece polinomial regresyon.....	50
Tablo 4.23 İkinci derece polinomial regresyon	50
Tablo 4.24 Üçüncü derece polinomial regresyon.....	51
Tablo 4.25 Farkların yüzdesi.....	53
Tablo 4.26 SPSS'te general lineer model univariate sonuçları	54
Tablo 4.27 25(OH)Vitamin D3 düzeyleri.....	56
Tablo 4.28 Referans birey gruplarının hesaplanan alt ve üst sınırları.....	59
Tablo 4.29 Çalışma grubunun kalsiyum ve PTH değerleri.....	59
Tablo 4.30 25(OH) gruplarının kalsiyum ve PTH değerleri.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD.....	Amerika Birleşik Devletleri
C.....	Beş gün boyunca kullanılan düzey sayısı
CAP.....	Amerikan Patolojistleri Koleji
CDC.....	ABD Hastalık Kontrol Merkezi
CE.....	Avrupa Uygunluk
CLIA.....	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CLSI.....	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CV.....	Değişkenlik katsayısı
D.....	En uç-yanındaki değer
D.....	Toplam gün sayısı
DKD.....	Dış kalite değerlendirme
DL.....	Doğrusallıktan sapma
EC.....	Avrupa Komisyonu
EDTA.....	Etilendiamin tetraasetik asit
FDA.....	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GA.....	Güven aralığı
HH.....	Hasta havuzu
HPLC.....	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IBM.....	International Business Machines
IQR.....	Çeyrek değerler genişliği
ISO.....	International Standard Organization
KENAS.....	Kenya Akreditasyon Hizmeti
KKM.....	Kalite kontrol materyali
L.....	Farklı konsantrasyonların sayısı
LC.....	Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS....	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LoD.....	Saptama limiti
LOP.....	Çizginin son noktası
LoQ.....	Ölçüm limiti
MS.....	Microsoft
n.....	Her gün için toplam tekrar ölçüm sayısı
N.....	Örneklerin toplam sayısı
PTH.....	Paratiroid hormon
Q ₁ :25.....	%25'lik yüzdeler
Q ₃ :75.....	%75'lik yüzdeler
r.....	Korelasyon katsayısı
R.....	Her örnekte gerçekleştirilen ölçüm sayısı
R.....	Tüm veriler arasındaki aralık
r ₁	Alt sınır
r ₂	Üst sınır
Rdf.....	Regresyon analizinin serbestlik derecesi
RIA.....	Radioimmünassay
rpm.....	Rounds per unit
SANAS.....	Güney Afrika Akreditasyon Sistemi
SD.....	Standart sapma
SPSS.....	Statistical Package for the Social Sciences
SRM.....	Sertifikalı referans materyal
T.....	Etkili serbestlik derecesi
TSE.....	Türk Standartları Enstitüsü
TÜRKAK.....	Türk Akreditasyon Kurumu
U.....	Genişletilmiş belirsizlik
UKAS.....	United Kingdom Accreditation Service

UV.....	Ultraviyole
v.....	Tekrarlanabilir serbestlik derecesi
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
z.....	z-değeri
χ^2	Ki-kare
$\bar{x}_1 ; \bar{x}_2$	İki alt grubun gözlenen ortalamaları
$n_1 ; n_2$	Her bir alt grubun referans değerinin sayısı
$s_1^2 ; s_2^2$	Gözlenen varyans
%.....	Yüzde
\bar{y}_i	Tekrarların ortalaması
\bar{x}_i	Tekrarların ortalaması
\bar{x}	Büyük ortalama
s_l	Çalışmalar arası standart sapma
\bar{x}_1	Günlük ortalama
\bar{x}_d	Ölçüm yapılan günlerin sonuçlarının ortalaması
σ_r	Çalışma içi sigma
σ_l	Günler arası sigma
y_{ij}	i kadar örneğin r tekrarının yorumu
S_k	k grubundaki biasın standart sapması
N_K	k grubundaki veri noktalarının sayısı
x_{di}	Ölçüm yapılan gün sayısı (d) için her tekrarın(i) sonucu
$s_{y,x}$	Regresyon standart hatası
s_r	Standart sapma
B_c	Tahmini bias
X_c	Verilen tıbbi karar düzeyi
sd_r^2	Gün içi standart sapmanın karesinin ortalaması
s_b^2	Günler arası kesinlik değeri için varyans terimi
\bar{B}_K	k grubundaki ortalama bias
B_c	X_c konsantrasyonunda gerçek bias
\bar{DX}	X yönteminin çift ölçümlerinin mutlak farkının ortalaması
\bar{DY}	Y yönteminin çift ölçümlerinin mutlak farkının ortalaması
DY_i'	Y yöntemi için farkların mutlak yakınlığı
DY_i	Y yönteminin mutlak farkı
DX_i'	X yöntemi için farkların mutlak yakınlığı
DX_i	X yönteminin mutlak farkı
$\%CV_r$	Çalışma içi değişkenlik katsayısı

1 GİRİŞ

Tıbbi laboratuvarlar ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar – Kalite ve Yeterlilik için Özel Şartlar Türk Standartına göre akredite olurlar. Validasyon ve verifikasyon ISO 15189 Standartında akreditasyon kapsamındaki her test için şartlardandır. Ölçüm prosedürü laboratuvarda üretildiyse veya satın alındıktan sonra modifiye edildiyse geçerli kılınmalıdır (valide edilmelidir). Validasyonda ölçüm prosedürünün tüm performans özellikleri değerlendirilir ve belirlenmiş hedefleriyle (tıbben geçerli hedefler) karşılaştırılır. Ölçümler satın alınan kitlerle gerçekleştiriliyorsa ölçüm prosedürlerinin belirli özellikleri doğrulanır. Her laboratuvar her test için hasta testlerine uygulamadan önce doğrulama deneylerini yapmalıdır. Yasal mevzuat, kalite yönetim sistem şartları ve akreditasyon standartlarında (European Commission 1998, ISO-15189 2009, WEB_10) validasyon ve verifikasyonun yapılması şartı vardır. Nasıl yapılacağı ile ilgili olarak, her laboratuvar süreçlerini tanımlamalıdır. Bu bağlamda, bilimsel olarak iyi ve sağlık harcamaları açısından verimli tasarruflu uygulamaların sağlanması için ulusal kılavuzlar oluşturulmalıdır. Türkiye’de bilimsel ve meslek derneklerin eğitimlerinde sağlanan kurs kitapları haricinde kılavuz bulunmamaktadır (Aslan vd 2000, Aslan 2007, Aslan 2010, Aslan 2011, Aslan vd 2012). Validasyon ve verifikasyon için Amerika Birleşik Devletleri Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standardization Institute-CLSI) Kılavuzları bulunmaktadır.

Kemik haricinde çeşitli doku, organ ve sistemlerdeki bozukluk ve hastalıklarla alakalı olduğu saptanmakta olan D vitamini ölçüm prosedürünün standardizasyonu çalışmaları dünyada sürmektedir. Pamukkale Üniversitesi Araştırma Hastanesi laboratuvarında D vitamini rutin ölçümleri HPLC yöntemiyle Chromsystem cihazı ile yapılmaktadır.

1.1 Amaç

Çalışmamızda EP15-A2:Kesinlik ve Gerçeklik için Performansın Kullanıcı Doğrulaması (CLSI-EP15A2E 2005), C28-A3c: Klinik Laboratuvarında Referans Aralıkları Belirleme, Oluşturma ve Doğrulama (CLSI-C28A3cE 2008), EP6-AE: Ölçme

Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi (CLSI-EP06AE 2003), EP09-A2-IR: Hasta Örneklerini Kullanarak Yöntem Karşılaştırma ve Bias Hesaplama (CLSI-EP09A2IRE 2010) kılavuzlarının klinik laboratuvarlarda uygulanabilme durumunu değerlendirmeyi amaçladık.

2 KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akreditasyon

Yasal mevzuat, kalite yönetim sistem şartları ve akreditasyon standartlarında (European Commission 1998, ISO- 15189 2009, WEB_10) validasyon ve verifikasyonun yapılması şartı vardır (Rabenau vd 2007). Bu dokümanlarda ne yapılacağı belirtilir. Nasıl yapılacağı bilimsel, meslek dernekleri, akreditasyon kuruluşları ve yasal otorite tarafından yayımlanmış kılavuzlarla anlatılmaktadır (CLSI-EP06AE 2003, CLSI-EP05A2E 2004, CLSI-EP15A2E 2005, CLSI-C28A3cE 2008, CLSI-EP09A2IRE 2010). Bu bağlamda bilimsel olarak iyi uygulamalar ve sağlık harcamaları açısından verimli ve tasarruflu uygulamaların sağlanması için ulusal kılavuzlar oluşturulmaktadır. Türkiye’de bilimsel ve meslek derneklerin eğitimlerinde sağlanan kurs kitapları haricinde kılavuz bulunmamaktadır (Aslan vd 2000, Aslan 2007, Aslan 2010, Aslan 2011, Aslan vd 2012).

Dünyada yaygın olarak kullanılan kılavuzlar, ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsünün yayımladığı kılavuzlardır. Amerika Birleşik Devletleri Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI) 50 yıl önce klinisyen ve laboratuvar bilim insanlarının birlikte kurduğu enstitüdür (WEB_1, Zakowski 2016). Kar amacı gütmeyen kuruluştur. Amacı laboratuvar tıbbında standardizasyon için resmi, uzlaşılan süreçlerle kılavuzlar oluşturarak, laboratuvar testlerinde kalitenin yükseltilmesini ve hasta bakımının güçlendirilmesini sağlamaktır. 60’ın üzerinde ülkeden 1400’ün üzerinde kurum ve kuruluş üyesi vardır. 2000’nin üzerinde gönüllü bilim insanı ve alanında yetkin uzmanlarla bu kılavuzları oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Amerikan Patologları Koleji (CAP), ABD Hastalık Kontrol Merkezi (CDC), Uluslararası Standardizasyon Kuruluşu (ISO), Kenya Akreditasyon Hizmeti (KENAS), Güney Afrika Akreditasyon Sistemi (SANAS) gibi çok sayıda organizasyonla işbirliği içerisinde. CLSI Kılavuzları çok sayıda kurum, kuruluş ve uluslararası laboratuvar topluluğu tarafından kabul görmekte ve kullanılmaktadır.

Yasal mevzuat (WEB_10) ve ISO 15189 Akreditasyon Standardı laboratuvarlara ne yapmaları gerektiğini belirtir (Örn., “ISO 15289:2009 - Madde 5.5.2 maddesine göre

“laboratuvar, analiz prosedürlerinin tasarlanan kullanım için uygun olduğunu doğrulamak amacıyla, sadece geçerli kılınmış prosedürleri kullanmalıdır”). Nasıl yapılacağı ya ulusal kılavuzlarla ya da akreditasyon kuruluşlarının yayımladığı kılavuzlarda belirlenir (WEB_2, WEB_3). Tıbbi laboratuvarlardan sorumlu sağlık bakanlıklarının veya ilgili bakanlıkların da kılavuzları bulunmaktadır (WEB_4, WEB_5). Türkiye’de yasal mevzuata göre ruhsat veren Sağlık Bakanlığı; ISO 9001 Kalite Yönetimi Sistem Şartları Standardına göre Kalite Sistemi Belgesi vermeye yetkili Türk Standartları Enstitüsü (TSE) ve tıbbi laboratuvar akreditasyonundan sorumlu Türkiye Akreditasyon Kurumu tarafından hazırlanmış, tıbbi laboratuvarlara yönelik kılavuz vb. dokümana rastlanmamıştır. Bunlardan dolayı çalışmamızda, dünyadaki yetkin bilim ve meslek uzmanları tarafından oluşturulan ve uluslararası yararlanılan CLSI Kılavuzlarından yararlanıldı (WEB_1).

Bilimsel yayınlar, ölçüm yöntemi performans özelliklerinden tekrarlanabilirlik (kesinlik, SD, %CV), gerçeklik (bias), rapor edilebilir aralık (doğrusallık) ve referans aralık doğrulama deneylerini geçerliliğin kanıtlanmasında önermektedir (Rabenau vd 2007).

Doğrulama deneyleri ve hesaplamalarında aşağıda listelenen ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) Kılavuzlarından yararlanılmaktadır:

- Kesinlik ve gerçeklik doğrulanmasında “EP15-A2 Kesinlik ve Gerçeklik Performansının Kullanıcı Tarafından Doğrulanması (User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline)”
- Gerçeklik doğrulanmasında ek olarak “EP09-A2-IR Hasta Örnekleriyle Yöntem Karşılaştırılması ve Bias Hesaplanması (Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples)”
- Doğrusallığın doğrulanmasında “EP6-A Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi: İstatistiksel Yaklaşım (Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach)”
- Referans aralığının doğrulanmasında veya transferinde “C28-A3c Klinik Laboratuvarda Referans Aralıkları Belirleme, Oluşturma ve Doğrulama (Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory)”

Klinik laboratuvarlar ölçüm prosedürlerinin teknik olarak güvenilir olduğunu kanıtlamak için akredite olurlar (Bakır ve Laleli 2006, Aslan 2010, Burnett vd 2010 Aslan 2011). Avrupa Birliği önerileri doğrultusunda her ülke kendi ulusal akreditasyon kuruluşuna başvurmak durumundadır (European Commission 1998). Türkiye’de tıbbi laboratuvar akreditasyonundan ulusal sorumlu Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK)’dur (WEB_3).

ISO 15189 Standardı maddeleri ve konumuz ile ilişkili şartlar Ek-1'de açıklanmaktadır.

Standardın 5.5 Maddesinde gözlendiği gibi "Geçerli kılma ve/veya doğrulama verileri saklanmalı" şartı bulunmaktadır. Madde 5.5.3a' da performans özellikleri "Performans özellikleri (örneğin; doğrusalılık, kesinlik, ölçme belirsizliği olarak ifade edilen doğruluk, tespit sınırı, ölçme aralığı, ölçümün doğruluğu, analitik duyarlılık ve analitik özgüllük)" olarak açıklanmaktadır.

2.2 Ölçüm Prosedürlerinin Performans Özellikleri

Gerek geçerli kılma (validasyon) gerekse geçerliliğin doğrulanması (verifikasyon) deneyleriyle ölçüm prosedürünün performans özelliklerinin ölçütlerinin (kriterleri) değerlendirilmesi amaçlanır. Performans ölçütlerinin tanımlanmış ölçüleri deneylerle saptanır. Hedef değerlere göre geçerlilik kararı verilir.

Kit üreticileri üretmeyi amaçladıkları ölçüm prosedürünün ilkesine göre uluslararası düzeyde tanımlanmış olan performans özelliklerini değerlendirmek ve yasal mevzuata göre onay almak zorundadırlar (WEB_10).

Aday ölçüm prosedürünün kesinlik, gerçeklik, doğruluk, analitik aralık, saptama sınırı ve analitik özgüllüğü öncelikle değerlendirilen başlıca performans özellikleridir. Tablo 2.1'de başlıca ölçütlerle ilgili terimler, açıklamalar ve ölçüler belirtilmektedir.

Tablo 2.1 Ölçüm prosedürlerinin performans özellikleriyle terimleri, kavramları ve ölçüleri

Ölçüt ve ilgili terimler	Açıklama	Ölçüsü
Kesinlik (precision)		Kesinsizlik (SD)
Tekrarlanabilirlik (çalışma içi)	Rastgele hataların dağılımının ölçüsü	
Ara kesinlik (uzun dönem, günler arası, laboratuvar içi)		
Tekrarüretilebilirlik (laboratuvarlar arası)		
Gerçeklik		Bias
	Ortalama değer in “gerçek değere” yakınlığı	Sistematik hatanın ölçüsü
Doğruluk (accuracy)	Tek ölçümün “gerçek değere” yakınlığı	Hem rastgele hem de sistematik etkileri gösterir
	Ölçüm prosedürünün analitik ölçüm aralığındaki ölçülen ve beklenen değerler arasındaki ilişki	
Doğrusallık (linearite)	Saptanabilen en küçük ve en büyük değer aralığı	
Analitik aralık ve nicel olarak saptama sınırı	Ölçülen değerler arasında saptanabilen en küçük değer	
Analitik duyarlılık (sensitivity)	Ölçüm prosedürünün örnek içerisindeki diğer bileşenlerden etkilenme derecesi	
Analitik özgüllük (specificity), girişim		
Kararlılık (stability)		
Tanısal duyarlılık		
Tanısal özgüllük	Tıbbi karar	
Referans aralık		

2.3 Ölçüm Prosedürlerinin Geçerli Kılınması (Validasyon)

Yöntemlerin geçerliliği, yöntemlerin analitik performans karakteristiklerinin tıbben geçerli sınırlarda olduğunun belirlenmesi ile kanıtlanır (WEB_6). Tıbben geçerlilik sınırları belirli yaklaşımlara göre bilimsel olarak belirlenir (Fraser 2001, WEB_8, Ehrmeyer 2013). Yöntemlerin analitik geçerliliklerinin kanıtlanması deneyleri üretim aşamasında yapılan bir işlemdir. Tablo 2.1’de gözlenen tüm performans özelliklerinin geçerliliği kanıtlanmalıdır.

Laboratuvar test reaktiflerini ya kendi hazırlar ya da üretici firmalardan veya temsilci firmalardan satın alınan ticari kitleri kullanır. Ticari kitlerin modifiye edilerek kullanıldığı durumlar da olabilir. Her üç durumda yöntem geçerliliği için kanıtlanacak analitik özelliklerin sayısı farklıdır. Bu bağlamda geçerlilik deneyleri sayısı da değişir.

Ticari olarak satışa sunulacak ölçüm kitleri için kanıtlanması gereken özellikler/ölçütler yasal mevzuatta belirtilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde ölçüm kitlerinin satışa sunulması için FDA onayı gerekirken (WEB_5), Avrupa Birliği’nde CE etiketi gereklidir (European Commission 1998). Türkiye’de ise 98/79/EC Direktifi’nin uyarlanmış şekli olan “Vücut Dışında Kullanılan in vitro Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği” bulunmaktadır (WEB_10).

Bir metodun yeterliliği için klinik laboratuvar da o teste ait analitik yeterlilik ve tanısal yeterliliğin tanımlanmış olması gereklidir. Her ikisi de aynı anda bulunmazsa klinik laboratuvar da testin kullanımı sınırlı kalır (Bakır ve Laleli 2006).

Yöntem geçerliliğinin kanıtlanması için yapılacak deneyler bilimsel olarak onaylanmış ve uzlaşmış kılavuz ve yayınlarda açıklanmaktadır (CLSI-EP06AE 2003, CLSI-EP05A2E 2004, CLSI-EP15A2E 2005, CLSI-C28A3cE 2008, CLSI-EP09A2IRE 2010, Westgard 2008).

Geçerliliğin kanıtlanması ya da kit içinde üretici firma tarafından belirtilmiş olan değerlerin doğrulanması için gereken analitik özellikler şunlardır (European Commission 1998, WEB_7, WEB_10): Duyarlılık, özgüllük, doğruluk, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, saptama sınırları, ölçüm aralığı ve girişim, referans aralık veya sağlıklı bireylerden beklenen değerler. Temel olarak, bir referans ölçüm sisteminde daha yüksek (referans) ve düşük değer (rutin) ölçümler için analitik özellikler arasında bir ilişki bulunmalıdır (Stöckl vd 2009).

2.4 Geçerliliğin Doğrulanması (Verifikasyon)

Bir yöntemin geçerliliğinin doğrulanması daha önce de belirtildiği gibi performans özelliklerinin ölçülerinin hesaplanması için deneyler tasarlanarak gerçekleştirilir. Ölçüm yöntemleri, performans özellikleri, ölçütleri ve ölçüleri Tablo 2.2'de gözlenmektedir.

Tablo 2.2 Verifikasyonda değerlendirilen ölçüm prosedürü, performans özellikleri

Ölçüt	Ölçü	Deney
Tekrarlanabilirlik / Kesinlik	Standart sapma (SD)	Tekrarlanabilirlik deneyleri
	Değişkenlik Katsayısı (%CV)	
Gerçeklik (trueness)	Bias	Yöntem karşılaştırma /KKMler
Doğrusallık		Dilüsyon ile geri kazanım deneyleri
Referans aralık		Referans aralığın doğrulanması deneyleri

Laboratuvar ölçüm reaktiflerini kendi koşullarında Tablo 2.2'de gösterilen tüm özelliklerinin geçerliliğini kanıtlamalıdır. Geçerliliği üretici firma tarafından kanıtlanmış yetkili kurum ya da kuruluşlar tarafından da onaylanarak satışa sunulmakta olan ticari kitlerin kullanımında da üretici firmanın belirttiği performans ölçülerini kendi laboratuvar koşullarında doğrulamalıdır (Rabenau vd 2007). Ticari kitlerin kullanılması durumunda hasta testlerine başlamadan önce doğrulanması gereken analitik özellikler de şunlardır: Doğruluk, gerçeklik, tekrarlanabilirlik (kesinlik), rapor edilebilir aralık, referans aralığın doğrulanması (Ehrmeyer 2013). Ölçüm yöntemlerinin geçerliliğini kanıtlanırken ölçüm yönteminin performans karakteristiklerinin ölçüleri hesaplanır ve elde edilen hedef değerlerle karşılaştırılır.

Doğrulama deneyleri:

1. Tekrarlanabilirliğin doğrulanması
2. Ölçüm yöntemleri karşılaştırma deneyleri (Doğruluk: Gerçek değerden uzaklaşma değeri veya biasın doğrulanması)
3. Rapor edilebilir aralığın doğrulanması
4. Referans aralığın doğrulanması deneyleri

2.4.1 Tekrarlanabilirliğin doğrulanması

Kesinlik genel olarak tekrarlanabilirlik olarak ifade edilir. Çalışma-içi kesinlik, laboratuvar-içi kesinlik (ara kesinlik) olarak belirtilir. Tekrarüretilebilirlik de laboratuvarlar arasındaki kesinliktir. Tekrarlanabilirlik, benzer koşullarda yapılan tekrarlı ölçümler arasındaki uyumdur ve nicel ölçüsü, standart sapma ve değişkenlik katsayısıdır.

Laboratuvar-içi kesinlik veya ara kesinlik laboratuvar içerisinden kaynaklanan temel hata kaynaklarını içine alan (temel bakım, tekrar kalibrasyon, veya reaktif üretim no değişiklikleri yanında) uzun dönemdeki tekrarlı ölçümler arasındaki uyumun göstergesidir. Ölçüsü standart sapma veya değişkenlik katsayısıdır. Laboratuvar içi kesinlik çeşitli hata kaynaklarının etkilerini gösterir. Bunlara tekrarlanabilirlik de dahildir.

Kesinlik (precision), bireysel ölçümlerin birbirine ne kadar yakın olduğuyla ilgili ölçümlerdir (Betz vd. 2011). Firmanın kit kılavuzunda belirttiği tekrarlanabilirlik ölçülerinin (SD, %CV, aralık vb.) değerlerinin her laboratuvarın kendi koşullarında sağladığını kanıtlamalıdır (ISO-15189 2009, WEB_10).

ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün yayınladığı "CLSI EP15-A2 Doğruluk ve Gerçeklik için Performansın Doğrulanması Kılavuzu" uluslararası boyutta yaygın kullanılmaktadır (CLSI-EP15A2E 2005). Kılavuzdan yararlanılarak oluşturulan tekrarlanabilirliğin doğrulanması süreç yönetimi Ek-2'de açıklanmaktadır.

2.4.2 Gerçeklik performansının doğrulanması

Gerçeklik, gerçek değer ölçüldüğünün kanıtlanmasıdır. Gerçek değer, kabul edilmiş olan bir standart veya beklenen değer olarak tanımlanabilir. Test sonucu için "bias" gerçekliğin ölçüsüdür. "Bias", analitin test sonucunun beklenen referans değerinden farkıdır. Spesifik koşullarda yapılan ölçüm prosedürü için, ölçüm sonuçlarının ortalamasıyla beklenen referans değeri karşılaştırılır. Bu referans değer, karşılaştırma prosedürünün sonuçlarının ortalaması ya da sertifikalı referans materyalin değeridir.

Gerçeklik değerlendirilmesi deneyleri iki farklı yaklaşımla gerçekleştirilebilir. Birisi veya her ikisi de kullanılabilir.

1) Karşılaştırma ile: Aynı vücut materyalinin paralel olarak iki ölçüm prosedürüyle (aday prosedür ve karşılaştırma ölçüm prosedürü) ölçülmesidir (split-sample comparison experiment). Tüm ölçüm aralığına uygun şekilde dağıtılmış konsantrasyonlardaki 20 hasta örneği iki parçaya ayrılır. Analit, aynı zamanda hem aday hem de karşılaştırma ölçüm prosedürüyle ölçülür. Her iki prosedür sonuçları

anlamli farklılık olup olmadığının saptanması için karşılaştırılırlar (CLSI-EP09A2IRE 2010).

2) Sertifikalı referans materyali ile: Yeterlilik test (dış kalite kontrol programı) materyalleri ve diğer konsantrasyonu ölçülmüş referans materyalleri aday prosedür ile analiz edilir, beklenen referans değerleriyle karşılaştırılır (CLSI-EP15A2E 2005). Kılavuzdan yararlanılarak oluşturulan gerçekliğin doğrulanması süreç yönetimi Ek-3'te açıklanmaktadır.

2.4.3 Doğrusallığın (rapor edilebilir aralığın) doğrulanması

Rapor edilebilir aralık, cihazın doğruluğunun (accuracy) veya test sisteminin ölçüm yanıtının yapılandırıldığı veya doğrulandığı test sonuç değerlerinin yayıldığı aralıktır (WEB_7). Analitik ölçüm aralığı cihaz ve test sisteminin ölçebildiği aralıktır. Test materyalleri konsantre veya dilüe edilerek yapılan ölçümlerin doğrusal olduğu aralık ise rapor edilebilir aralıktır. Her laboratuvar satın aldığı kitlerdeki ölçüm prosedürlerinin doğrusallığını kendi koşullarında kanıtlamalıdır. Kılavuzdan yararlanılarak oluşturulan rapor edilebilir aralığın doğrulanması süreç yönetimi EK-4'te açıklanmaktadır

2.4.4 Referans aralığın geçerliliğinin doğrulanması

Laboratuvarlarda ölçülen değerler referans değerlerle karşılaştırılarak tıbbi karar verilir. Her laboratuvar hastaya uygulamadan önce kendi popülasyonunun referans aralığını saptamalıdır (ISO-15189 2009). Satın alınan kitler için yaklaşım, üretici tarafından kit kılavuzunda belirtilen referans aralıkların veya sağlıklı popülasyon için beklenen değer aralığının laboratuvara başvuran popülasyon için geçerliliğinin doğrulanmasıdır. Her kit kılavuzunda bu uyarı yazılır (European Commission 1998, WEB_5, WEB_10).

Bilimsel olarak her ölçüm prosedürü için geçerli olan bu yaklaşım ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar – Kalite ve Yeterlilik için Özel Şartlar Standardı akreditasyonunda ve yasal mevzuatta şart koşulmaktadır (Aslan vd 2012, WEB_10).

Avrupa Birliği in Vitro Tanısal Tıbbi Ürünler (kit, cihaz, vb.) 98/79 Direktifine göre ve T.C. Sağlık Bakanlığı in vitro (vücut dışında kullanılan) Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği Temel Gereklere başlığındaki Madde 8.7'nin i bendine göre "Uygun bir referans popülasyonu tanımı dahil, ölçülen miktarlar için referans aralıkları" kit kılavuzunda bulunmalıdır.

ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar – Kalite ve Yeterlilik için Özel Şartlar Standardının 5.5.5. Maddesi referans aralıklarla ilgilidir. "Biyolojik referans aralıkları belirli aralıklarla

gözden geçirilmelidir. Laboratuvar, belirli bir aralığın referans gruba artık uymadığı kanısındaysa, düzeltici faaliyeti takiben, gerekliyse bir araştırma yapmalıdır.”

Ancak her kit için belirlenmesi gerekli olan bu durum oldukça fazla sayıda test için zorlayıcı olmaktadır. Yeni üretilen ölçüm yöntemi için referans aralık belirlenmesinde her alt gruptan (cinsiyet yaş, vb.) en az 120 referans bireyin bulunması gerekir (CLSI-C28A3cE 2008). Satın alınan ticari ölçüm prosedürleri için bu sayı, 20 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda referans aralıkların belirlenmesinde, klinik laboratuvarların yararlandığı “CLSI C28-A3c Klinik Laboratuvarlarda Referans Aralığının Belirlenmesi, Hesaplanması ve Doğrulanması” Kılavuzunu temel aldık. Kılavuzdan yararlanılarak oluşturulan referans aralığının doğrulanması süreç yönetimi Ek 5'te açıklanmaktadır.

Referans aralıklar, sağlıklı görünen popülasyon örneklerinde gerçekleştirilen ölçüm sonuçlarının dağılımının %95 merkezi alanındaki değerlerden hesaplanır. İlk hesaplamalarda yaygın olan yaş aralığı 18 – 65'tir. Yapılandırılmış süreçte hesaplanır. Daha önce belirlenmiş referans aralık yeni yöntem veya yeni bir lokasyona uyarlanabilir. Hesaplanmış referans aralık daha az sayıda (örn., 20) referans birey seçilerek değerlendirilebilir veya lokal olarak gerçekleştirilmiş başka bir çalışmanın sonuçlarından yararlanılabilir.

Çalışmamızda hedeflenen CLSI Kılavuzlarının laboratuvarlarda uygulanma durumunun değerlendirilmesinin başarılı olarak kanıtlanması için hesaplamaların gerçek hayatta uygulanması gerektiği düşüncesiyle bir analit seçildi. D vitaminin kemikle ilgili bozukluk ve hastalıklar dışında kalp hastalıkları ile alzheimer ve kanserde rol oynadığı bulguları da (Harrison vd 2016) dikkate alınarak standardizasyon çalışmaları devam eden D Vitamini ölçüm prosedüründe uygulamaya karar verildi. Dünyada hem D vitamini ölçüm sonuçlarının standardizasyonu çalışmaları sürmekteydi, hem de insanlarda düşük ölçülme durumu araştırılmaktaydı. D vitaminin kemik bozukluk ve hastalıkları yanında kalp, kanser ve alzheimer hastalıklarında rolü bulunduğunu gösteren araştırmalar da yaygın devam etmekteydi ve etmektedir (Hollis 2004, Fraser 2009, Holick 2009, Medical Advisory Secretariat 2010, Holick vd 2011, Carter 2012, Arneson ve Arneson 2013).

2.5 D Vitamininin Ölçüm Prosedürleri ve Performans Özellikleri ile İlgili Araştırmalar

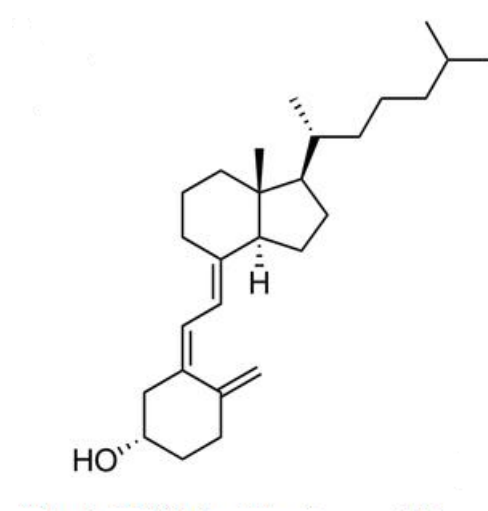
D Vitamininde güncel olarak kullanılan testlerin teknikleri immün ölçüm (RIA ve CLIA) ile HPLC ve LC-MS/MS teknikleridir (Holick 2009). Bu yöntemlerin özgüllükleri ve

doğrulukları değişkendir. İlk otomatize yöntem, yarışmalı protein bağlayıcı ölçümlerdir (Nicholis Advantage analizörü). Pahalı değildir ancak düşük düzeylerde 25(OH)D'yi düşük, yüksek düzeyleri de daha yüksek ölçmektedir. Radyoimmün ölçüm yöntemlerinin az sayıda test kapasitesi vardır ve radyolojik materyal gerektirmektedir. HPLC çok kararlı ve tekrarlanabilir ancak yüksek miktarda örnek gerektirir, örnek hazırlığından ve UV ölçümlerden kaynaklanan interferanslar olabilmektedir. Yüksek düzeyde yetkinlikte eleman gerektirir. LC-MS/MS altın standart olarak belirtiliyor olsa da hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir. Yetkin teknik eleman gerektirmekte aynı zamanda C₃ epimeri nedeniyle D₂/D₃ değerleri yüksek bulunmaktadır (Lensmeyer vd 2012, Atef 2018)

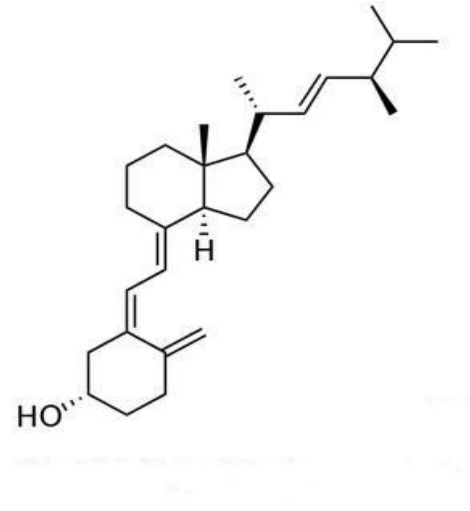
D Vitamini ölçüm prosedürlerinin performanslarıyla ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Çoğu, D vitamini ölçüm prosedürlerinin analitik performanslarının net klinik karar verme açısından zorlayıcı olduklarını ileri sürmektedir (Cavalier vd 2010, Carter 2012, Heijboer vd 2012, Lai vd 2012).

2.5.1 D vitamini bulunuşu ve biyolojik aktif formları

Kolekalsiferol (D₃ vitamini, insan ve hayvanlarda) ve ergokalsiferol (D₂ vitamini, bitki ve mantarlarda) olmak üzere D Vitamini doğada temel 2 şekilde bulunur (Şekil 2.1 ve 2.2).



Şekil 2.1 Vitamin D3 Kolekalsiferol



Şekil 2.2 Vitamin D2 - Ergokalsiferol

Vitamin D₃ (kolekalsiferol) 27 karbonlu bir moleküldür. Vitamin D₂ (ergokalsiferol) da 28 karbon içerir ve ilave bir metil grubu içerir, 22. ve 23. karbonlar arasında çift bağ olması sebebiyle D₃ vitamininden farklıdır. D₃ ve D₂ vitaminlerinin 25(OH)D'yi arttırmada eşit derecede etkili olup olmadıkları ve eşit fizyolojik etkilerinin bulunup bulunmadığı

henüz net değildir. Şu anda, bu iki form eşit ve değişebilir olarak kabul edilmektedir (Champe ve Harvey 1997, Yalçın 2006, Gören vd 2007, Holick 2009, Binkley vd 2012, Galior vd 2018).

Vücuttaki D Vitamini durumunun değerlendirilmesinde çeşitli formları arasından 25(OH)D3 vitamini ölçülmesi önerilmektedir (Holick vd 2011). Ancak Tablo 2.3'te gözlenen diğer formlarının biyolojik aktif olma ve 25(OH)D3'ün ölçümü etkileme durumları net olarak açıklanamamıştır (Lensmeyer vd 2012, Binkley ve Sempos 2017).

Tablo 2.3 D vitamininin biyolojik aktif formları

25(OH)D3 'ün 3 epimeri
24,25(OH)2D3
Vitamin D ₃ (Kolekalsiferol)
Vitamin D ₂ (Ergokalsiferol)
Serbest/biyo yararlı 25(OH)D (D vitamini bağlayıcı proteini (VDBP) ölçülmesini gerektiren madde)

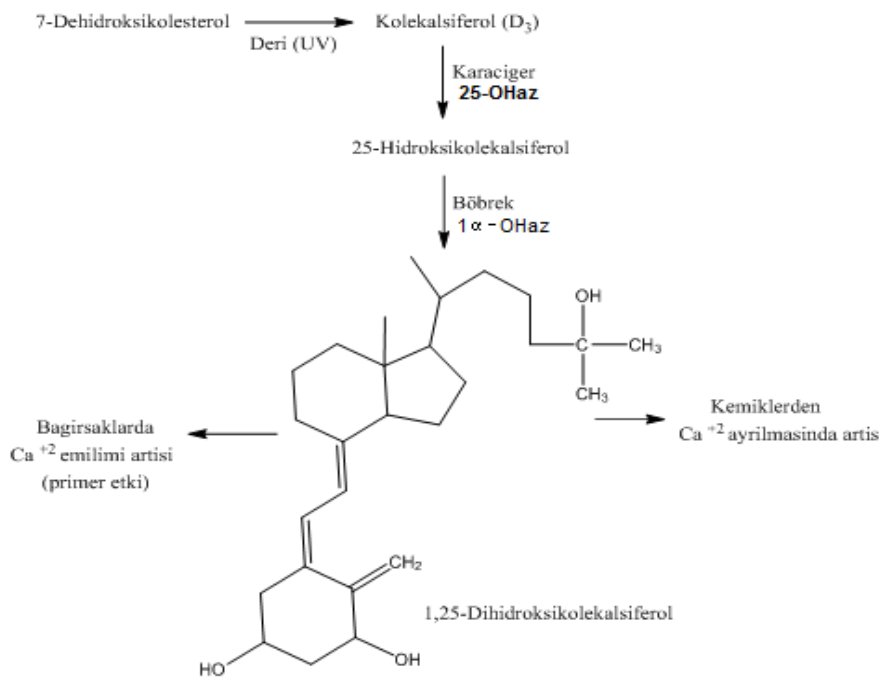
D Vitaminin sentezi, fizyolojik ve biyolojik işlevleri:

D3 vitamini deride sentezlenir ve somon, uskumru ve ringa balığı gibi yağ bakımından zengin balıklarda bulunur. Piyasada satılan Vitamin D₃ deride doğal olarak bulunan kolesterol öncüsü 7-dehidrokolesterolden sentezlenir. Hem D2 hem de D3 vitamini besin takviyesi ve D vitamini takviyelerinde kullanılır. Mideye alınan D vitamini (D, D2,D3 veya her ikisini temsil eder) şilomikronlara (venöz kana girenler ve lenfatik sistemde absorbe olanlar) dahildir. Deriden veya diyetle gelen D vitamini biyolojik olarak etkisizdir ve D-25-hidroksilaz (25-OH_{az}) ile 25(OH)D vitamini ile karaciğerde ilk hidroksilasyonu gerçekleştirir. Bununla birlikte, 25(OH)D böbreklerde, 25(OH)D-1 α -OH_{az} (CYP27B1) tarafından, biyolojik olarak aktif olan D vitamini 1,25(OH)2D formunu oluşturmak için de bir hidroksilasyon yapar. 1,25(OH)2D ince bağırsakta, böbreklerde ve diğer dokularda bulunan D vitamini çekirdeği reseptörü ile etkileşir. 1,25(OH)2D bağırsakta kalsiyum Emilimini uyarır. D vitamini olmadan, diyet kalsiyumun sadece %10-15'i ve fosforun da yaklaşık %60'ı emilir. D vitamini yeterliliği, kalsiyum Emilimini %30-40 ve fosfor Emilimi %80 arttırır.

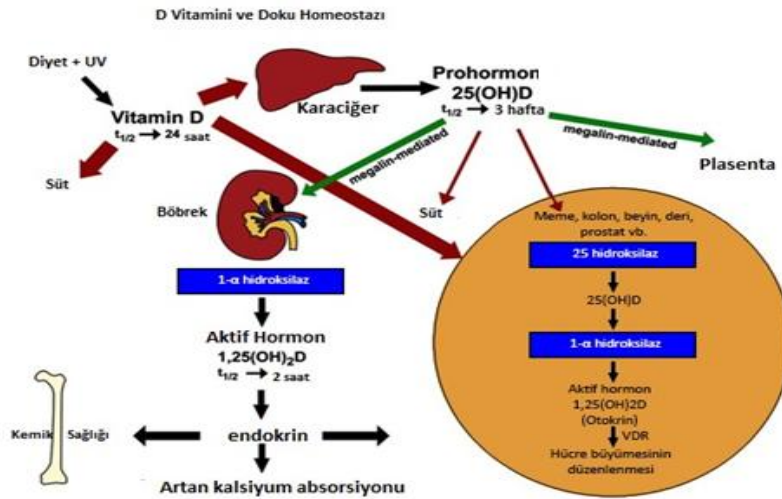
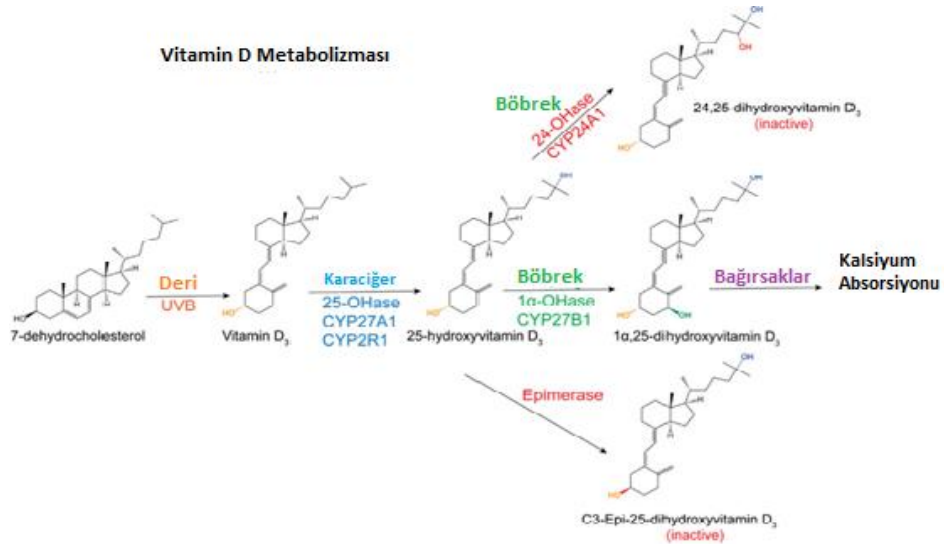
1,25(OH)2D, çekirdek faktör α B ligandının reseptör aktivatörünün ekspresyonunu uyarmak için osteoblasttaki D vitamini reseptörü ile etkileşime geçer; bu da matriksi çözen ve iskeleti kalsiyum ve diğer mineralleri harekete geçiren olgun osteoklastlar olmak üzere olgunlaşmamış monositleri uyarmak için çekirdek faktör α B'nin reseptör aktivatörü ile etkileşime girer.

Böbrekte, 1,25(OH)2D glomerüler filtrattan kalsiyum Emilimini uyarır.

D vitamini reseptörü vücuttaki çoğu doku ve hücrede bulunur. 1,25(OH)2D, hücresel proliferasyon inhibe edilmesi ve terminal farklılaşmasının indüklenmesi, anjiyogenezin inhibe edilmesi, insülin üretiminin uyarılması, renin üretiminin inhibe edilmesi ve makrofaj kateter üretiminin uyarılması dahil olmak üzere geniş bir aktiviteye sahiptir. Ayrıca, 1,25(OH)2D, 25(OH)D ve 1,25(OH)2D'yi suda çözünmeyen inaktif hale getirip metabolize etmek için 25-hidroksivitaminD-24-OHaz (CYP24R) ekspresyonunu arttırarak kendi yıkımını uyarır. 1-OHaz aktivitesine sahip birkaç doku ve hücre vardır. Yerel 1,25(OH)2D üretimi için bildirilmiş olan pek çok pleiotropik sağlık yararını kolaylaştırabilen 200'e yakın kadar genin düzenlenmesinden sorumlu olabilir (Öngen vd 2008, Poduje vd 2008, Holick vd 2011).



Şekil 2.3 D vitamininin sentezi



D vitamininin referans aralıkları, eksiklik ve toksisite durumları:

D Vitaminin klinik kullanımı eksikliğine odaklanmaktadır (Vurgun vd 2016). Serum 25(OH)D vitamin düzeyinin <20 ng/ml olması eksiklik, 21-29 ng/ml olması yetersizlik, 32 ng/ml'den yüksek ise yeterli (tercih edilen aralık 40-60 ng/ml) ve ≥ 150 ng/ml olması da toksik düzey kabul edilmiştir (Holick 2009, Stöckl vd 2009, Fidan vd 2014). Çok fazla Vitamin D desteği almak toksik etkilere neden olabilir (böbrek taşı oluşumu ile kalp ve akciğerler ve kan damarları dahil olmak üzere yumuşak dokuların kalsifikasyonu) (Chouiali vd 2017, Galior vd 2018). 25(OH)vitamin D (25(OH)D)'nin klinik olarak doğru ölçülmesi çok büyük önem arz etmektedir (Sahillioğlu vd 2011).

Farklı güneşe maruz kalma miktarı 25(OH)D konsantrasyonunun değişkenliğine neden olabilir (Li vd 2016). Son yıllarda, 25(OH)D dolaşımının değerlendirilmesi akut ve kronik hastalıklarda önemli bir araç olmuştur (Horst 2010).

D Vitamini ölçülerinin klinik yararlılığı:

D vitaminin ölçümü iki ana nedenden dolayı yapılmaktadır: D vitamininin; vücuttaki durumunun saptanması ve teröpatik izlenmesidir. D Vitamini metabolizmasının kardiyovasküler hastalıklar, obezite, kanser ve otoimmün hastalıklarına ilişkilerini açıklayan çok sayıda çalışma bulunsa da klinik yararlılık açısından en önemli alan kemik sağlığıyla ilişkilidir (Holick vd 2011, Galior vd 2018). İlişkili bozukluk veya hastalık şüphesi bulunmadıkça tarama testi olarak kullanılması önerilmemektedir. Son yıllarda fazla istenmesinin yararı olmasa da D vitamini desteklerinin yararlarını gösteren çalışmalara göre 20 mg/l ve altı mutlaka destek görmelidir. Optimum düzey de 50 mg/l olmalıdır sonucu çıkarılmıştır (Galior vd 2018).

D vitamini, parathormon, kalsiyum:

1,25(OH)2D'nin renal sentezi serum kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarıyla birlikte paratiroid hormonu tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Serum PTH ile 25(OH)D düzeyleri arasında zayıf negatif korelasyon gözlenmektedir (Atef 2018, Saliba vd 2011) 18,5 µg/l 'nin üzerindeki 25(OH)D düzeyi paratiroid hormon baskılanması için yeterli görünmektedir. Böylece hiperparatiroidizmin engellenmesinde yeterlidir. 30 µg/l üzerindeki değerler paratiroid hormon düzeylerinde ek bir değişiklik yapmamaktadır.

2.6 Hipotez

Çalışmamızın hipotezleri aşağıda listelenmektedir:

1. Tıbbi (klinik) laboratuvarlarda satın alınan ölçüm (kitlerinin) prosedürlerinin performans özelliklerinin kendi laboratuvar koşullarında geçerliliği doğrulanmalıdır. Bu doğrulama prosedürlerinin nasıl yapılacağını gösteren ulusal bir kılavuz bulunmamaktadır. Dünyada yaygın kullanılan ABD CLSI Kılavuzları laboratuvarımızda uygulanabilir.
2. Kılavuzların uygulanma durumu belirli bir analitin ölçüm prosedürü üzerinden yapılırsa uygulanma durumu kanıta dayalı olarak belirlenebilir.
3. Türkiye'de tüm klinik laboratuvarlara uygulanabilecek Türkçe kılavuz ve geçerliliğin doğrulanması sürecinin yönetimi dokümanı hazırlanabilir.
4. Dünyadaki araştırma sonuçları, üretilen D Vitamini ölçüm prosedürlerinin sağlıklı popülasyonda beklenenden düşük düzeyde olduğunu göstermektedir. Yöntem

geçerliliğinin doğrulanması çalışmalarında referans aralık saptama deneyleriyle bu durum değerlendirilebilir.

5. Standardizasyonu sağlanmamış ölçüm prosedürlerinin performanslarının doğrulanmasında zorluklar bulunmaktadır.

3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Biriminde gerçekleştirilmiştir. 13/09/2011 tarih ve 16 sayılı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu raporu bulunmaktadır. 2011SBE008 proje numarası ile Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Kurulu tarafından desteklenmiştir.

3.1 Gereç

3.1.1 Çalışmada ölçümü yapılan örnekler

3.1.1.1 Sağlıklı popülasyondan toplanan örnekler

Çalışma grubu klinik şikayet ve bulgusu olmayan, sağlıklı 40 kadın ve 40 erkek olmak üzere 18-45 yaşları arasındaki toplam 80 gönüllü bireyden oluşturuldu. Tüm çalışma grubu için Ek 5'teki referans birey belirleme formları ile bilgi toplandı ve her katılımcıya EK 5'teki "referans birey belirleme belgesi" imzalatıldı. Çalışma grubunun PTH ve kalsiyum düzeyleri de ölçüldü.

3.1.1.2 Plazma havuzları

Çalışma için laboratuvarında ölçümü yapılmış olan hasta 25(OH)Vitamin D₃ test sonuçlarından 3 farklı düzeyde plazma havuzu oluşturuldu (Tablo 3.1). Daha önceden Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine herhangi bir sağlık sorunu ile başvuran ve analiz için laboratuvarında 25(OH)Vitamin D₃ ölçümü yapılmış olan hasta serumlarından hazırlanmış plazma havuzları kullanıldı. Hasta havuzu düşük düzey, 8,2-10,52 ng/ml ($\mu\text{g/l}$) aralığındaki plazma havuzununun 1:3 oranında dilüe edilip, 433 g

(3000 rpm) 10 dk santrifüj edilmesiyle oluşturuldu. Hasta havuzu orta düzey, 13,11-19,76 ng/ml aralığındaki plazma havuzunun 433 g (3000 rpm) 10 dk santrifüj edilmesi ile oluşturuldu. Hasta havuzu yüksek düzey, 38,5-183 ng/ml ($\mu\text{g/l}$) aralığındaki plazma havuzunun 433 g (3000 rpm) 10 dk santrifüj edilmesi ile oluşturuldu.

Tablo 3.1 Plazma havuzları

Hasta Havuzu	Analit	Birim	Ortalama	Beklenen aralık
HH1	25(OH)D ₃	$\mu\text{g/l}$	9,6	8,2-10,51
HH2	25(OH)D ₃	$\mu\text{g/l}$	16,59	13,1-19,76
HH3	25(OH)D ₃	$\mu\text{g/l}$	69,87	38,5-183

1 ng/ml = 1 $\mu\text{g/l}$

3.1.2 Doğrulama deneylerinde kullanılan materyaller

UTAK Laboratuvarından alınan 3 farklı düzey kontrol materyali (UTAK, ABD).

Tablo 3.2 UTAK kontrol materyalleri

UTAK-Vitamin D Plus Düşük düzey					Lot Numarası: 7038				
Ürün Numarası: 10060					Son kullanma tarihi: 02/14				
DÜŞÜK	Analit	Birim	Hedef Değer	Doğrulan Değer	Beklenen Aralık	Birim	Hedef Değer	Doğrulan Değer	Beklenen Aralık
	25(OH)D ₂	ng/ml	10	12	10-14	nmol/l	24,2	29,1	25-33
	25(OH)D ₃	ng/ml	10	10	9-12	nmol/l	25	25,0	21-29
UTAK-Vitamin D Plus L1 düzey					Lot Numarası: 7039				
Ürün Numarası: 10061					Son kullanma tarihi: 02/14				
DÜZEY 1	Analit	Birim	Hedef Değer	Doğrulan Değer	Beklenen Aralık	Birim	Hedef Değer	Doğrulan Değer	Beklenen Aralık
	25(OH)D ₂	ng/ml	30	36	31-41	nmol/l	77,5	87,2	74-100
	25(OH)D ₃	ng/ml	30	29	25-33	nmol/l	74,9	72,4	62-83
UTAK-Vitamin D Plus L2 düzey					Lot Numarası: 7040				
Ürün Numarası: 10062					Son kullanma tarihi: 02/14				
DÜZEY 2	Analit	Birim	Hedef Değer	Doğrulan Değer	Beklenen Aralık	Birim	Hedef Değer	Doğrulan Değer	Beklenen Aralık
	25(OH)D ₂	ng/ml	73	69	59-79	nmol/l	177	167,2	142-192
	25(OH)D ₃	ng/ml	73	73	62-84	nmol/l	182	182,2	155-210

Kalite kontrol materyalinin hazırlanması:

- Kullanılacak her şişeden volümetrik pipet ile 5 ml alındı, tam 5 ml damıtılmış su ekleyerek kalite kontrol materyali sulandırıldı.
- 10-15 dakika bekletildi.
- Homojen bir karışım sağlamak için yavaşça 3-4 dakika çalkalandı.
- Homojen bir karışım elde etmek için her örnek alındıktan sonra hafifçe çalkalandı.
- Çalışma gününe kadar 2-8 °C'de saklandı.

3.1.3 Kılavuzlar

Doğrulama deneyleri ve hesaplamalarında aşağıda listelenen ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) Kılavuzlarından yararlanıldı:

- Kesinlik ve gerçeklik doğrulanmasında “EP15-A2 Kesinlik ve Gerçeklik Performansının Kullanıcı Tarafından Doğrulanması (User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline)”
- Gerçeklik doğrulanmasında ek olarak “EP09-A2-IR Hasta Örnekleriyle Yöntem Karşılaştırılması ve Bias Hesaplanması (Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples)”
- Doğrusallığın doğrulanmasında “EP6-A Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi: İstatistiksel Yaklaşım (Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach)”
- Referans aralığının doğrulanmasında veya transferinde “C28-A3c Klinik Laboratuvarında Referans Aralıkları Belirleme, Oluşturma ve Doğrulama (Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory)”

3.1.4 D vitamini ölçüm prosedürü

D Vitamini ultraviyole detektörlü izokratik yüksek performanslı sıvı kromatografi tekniği ile ölçüldü (Chromosystems. Instruction Manual for the HPLC Analysis of 25-OH-Vitamin D₃/D₂ in serum/plasma. Order Number 38038).

D Vitamini ölçüm prosedüründe kullanılan gereç:

Ölçüm Kiti: 25-OH Vitamin D₂-D₃ HPLC Analiz Kiti (Chromsystem 25-OH-Vitamin D₃/D₂ in Serum/Plasma – HPLC, REF 38038, Almanya)

Ölçüm kolonu (Sample Clean Up Column, REF 38008, Almanya)

Ölçüm cihazı: HPLC cihazı (Chromsystem, Almanya)

Kimyasal malzemeler:

Mobil faz 1000 ml*3 (LOT3411, REF38031) (Chromsystem, Almanya)

Serum calibration standart (lyoph) 2 ml*5 (LOT2011, REF38033) (Chromsystem, Almanya)

Internal standart 5 ml*3 (LOT3211, REF38004) (Chromsystem, Almanya)

Çöktürme reaktifi 50 ml*3 (LOT1811, REF38005) (Chromsystem, Almanya)

Wash buffer 1 200 ml*3 (LOT1911, REF38006) (Chromsystem, Almanya)

Wash buffer 2 7,5 ml*3 (LOT1811, REF38007) (Chromsystem, Almanya)

Elüsyon buffer 20 ml*3 (LOT1811, REF38009) (Chromsystem, Almanya)

Serum kontrol (lyoph) Level I 2 ml*5 (LOT5110, REF0029) (Chromsystem, Almanya)

Serum kontrol (lyoph) Level II 2 ml*5 (LOT5010, REF0030) (Chromsystem, Almanya)

Distile su 1000 ml'lik irigasyon solüsyonu (LOTG1202011) (Eczacıbaşı, Türkiye)

Cihazlar:

Otomatik pipet seti (0-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf, Almanya)

Derin dondurucu özellikli buzdolabı (Bosch, Türkiye)

Buzdolabı (Bosch, Türkiye)

Masaüstü santrifüj NF 1200 R (Nüve, Türkiye)

24 hazneli masaüstü santrifüj NF 048 (Nüve, Türkiye)

Vortex 40 Hz (Velp Scientifica, İtalya)

Kullanılan sarf malzemeler:

1,5 ml'lik ışık korumalı vial tüpler (LOT2711, REF33005) (Chromsystem, Almanya)

Ekstraksiyon kolonu (LOT3211-1, REF38008) (Chromsystem, Almanya)

0,3 ml'lik HPLC insert tüpleri (Chromsystem, Almanya)

100*16 ml'lik cam tüpler (sodalı lime camlı) (Isolab, Almanya)

K₃ EDTA'lı 2 ml'lik tüp (Vacutest, İtalya)

D vitamini ölçüm basamakları:

Hasta örneği: Plazma

- 2 ml'lik EDTA K₃ tüpe alınır. Tüpler santrifüj edilene kadar karanlıkta bekletilir.
- Santrifüj ile serum ve plazma birbirinden ayrılır.
- Plazma 500 µl 1,5 ml'lik vial tüpe alınır.
- Plazmadan 500 µl'de 1,5 ml kapaklı şeffaf vial tüpe de yedekleme yapılır ve -

20 °C'de bekletilir.

Çalışma öncesi hazırlık:

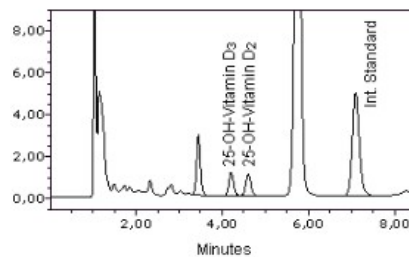
- Reaktifler anında kullanıma hazır olduğu için çalışma öncesi hazırlık yapılmadan çalışmaya başlanabilir.

İşlem:

- 1,5 ml'lik vial tüp alınır.

- 500 µl plazma konur.
- 50 µl internal standart 1,5 ml'lik tüpe eklenir.
- 500 µl çöktürme reaktifi eklenir
- 30 sn 433 g (3000 rpm) vortex uygulanır.
- 10 dakika +4 °C'de bekletilir.
- 5 dakika 15710 g'de (13000 rpm) santrifüj edilir.
- Ekstraksiyon kolonları numaralandırılır.
- Süpernatant ekstraksiyon kolonuna konur ve cam tüpe yerleştirilir.
- 249 g'de (1500 rpm) 2 dakika santrifüj edilir.
- 1 ml wash buffer 1 ilave edilir.
- 249 g'de (1500 rpm) 2 dakika santrifüj edilir.
- 1 ml wash buffer 1 tekrar ilave edilir.
- 249 g'de (1500 rpm) 2 dakika santrifüj edilir.
- 75 µl wash buffer 1 ilave edilir.
- 249 g'de (1500 rpm) 2 dakika santrifüj uygulanır.
- Cam tüpe akan elüent atılır.
- Ekstraksiyon kolonları yeni cam tüpe oturtulur.
- 200 µl elüsyon buffer kolonlara ilave edilir.
- 249 g'de (1500 rpm) 2 dakika santrifüj edilir.
- Kolon atılır.
- Cam tüpte yaklaşık 200 µl kalan elüente 20 µl distile su ilave edilir.
- 5 sn 433 g (3000 rpm) vortex uygulanır.
- HPLC insert tüplerine elüent 200 µl konur ve cihaza verilir.

$$(g=1,118 \cdot 10^{-5})R \cdot S^2 \quad (R: \text{Çap S: Hız})$$



Şekil 3.1 Chromsystem 25(OH)VitaminD₃/D₂ serum/plazma HPLC kromatogramı

HPLC analiz prosedürü:

Akış hızı	0,7 ml/dk
İnjesiyon miktarı:	25 µl
Kolon sıcaklığı	ortam (≈ 25 °C)
Dedektör:	Dalga boyu: 265 nm

Kit kılavuzundaki ölçüm prosedürü validasyon sonuçları Tablo 3.3'te listelenmektedir. Klinik yararlılık açısından 25(OH)D kestirim değerleri Tablo 3.4'te gözlenmektedir. Üretici kendi ölçüm prosedürü için hesaplamamıştır.

Tablo 3.3 Kit kılavuzunda sunulan validasyon sonuçları

Tekrarlanabilirlik	%CV (konsantrasyon µg/l)	
	Çalışma içi (n=10)	Günler arası (n=100)
25(OH)Vitamin D ₃	3,0 (24,9)	3,3 (25,2)
	0,9 (58,9)	
	1,9 (89,9)	2,3 (90,4)
25(OH)Vitamin D ₂	1,8 (22,6)	4,6 (23,2)
	0,8 (57,5)	
	1,9 (84,3)	1,9 (84,5)
	25(OH)Vitamin D₂	25(OH)Vitamin D₃
Geri kazanım	87 %	86 %
Doğrusallık üst sınırı	250 µg/l	250 µg/l
Saptama limiti (LoD)	2 µg/l	2 µg/l
Ölçüm Limiti (LoQ)	1,1 µg/l	1,4 µg/l

Tablo 3.4 Kit kılavuzunda Vitamin D içi serum konsantrasyonlarıyla ilgili kestirim değerleri (klinik karar değerleri)

Optimal	20-70 µg/l (50-175 nmol/l)
Yetersiz	10-20 µg/l (25-50 nmol/l)
Eksik	< 10 µg/l (25 nmol/l)

3.2 Yöntem

Ölçüm prosedürü performansının geçerliliğinin doğrulanması deneyleri: ABD CLSI Kılavuzları (EP15-A2, C28-A3c, EP6-AE, EP09-A2-IR) önerilerine göre yöntemin (HPLC, 25(OH)Vitamin D₃/D₂, Chromsystems, Almanya) performans özelliklerinin (tekrarlanabilirlik, doğruluk, rapor edilebilir aralıkların-doğrusallık ve referans aralık) doğrulanması deneyleri gerçekleştirildi.

3.2.1 Tekrarlanabilirliğin doğrulanması

Deney materyalleri olarak UTAK kalite kontrol materyalleri ve plazma havuzları kullanıldı. EP15-A2 Kesinlik ve Gerçeklik Performansının Doğrulanması Kılavuzu uygulandı. Normal ve patolojik düzeylerdeki kalite kontrol materyalleri ve hasta plazma havuzlarında 5 gün süreyle her gün 3'lü ölçümler yapıldı. Ek-2'deki tekrarlanabilirlik deneyi doğrulama kayıt formuna göre hesaplamalar yapıldı. Firmanın yayımladığı sonuçlara göre tekrarlanabilirlik değerlendirildi.

Doğrulama basamakları firmanın %CV değerleri hedef alınarak hesaplandı. Hedef değerler Tablo 3.5'te görülmektedir. CLSI EP15-A2'ye göre Microsoft Excel'de hazırlanan formüllerle gerçekleştirildi. Ölçülen verilerin standart sapmaları karşılaştırıldı. Günler arası ve gün içi değerlendirme yapıldı.

3.2.2 Gerçekliğin doğrulanması

3.2.2.1 Sertifikalı referans materyaliyle

Tıbbi karar seviyeleri aralığında UTAK kalite kontrol materyalleri kullanıldı. EP15-A2 Kesinlik ve Gerçeklik Performansının Doğrulanması Kılavuzu ve EP09-A2-IR Yöntem Karşılaştırma ve Bias Hesaplanması Kılavuzu basamakları uygulandı (Bkz. Ek-3). UTAK KKM'lerle: KKM'lerin tekrarlanabilirlik deney sonuçlarından t-istatistiği ile doğrulama aralığı (GA:%99) hesaplandı. KKM düzeyi doğrulama aralığında ise gerçeklik doğrulandı. Hesaplanan % bias hedeflenen % bias değerlerine göre değerlendirildi.

3.2.2.2 Yöntem karşılaştırmayla

UTAK kalite kontrol materyalleri ve birey örnekleri kullanıldı.

- Pamukkale Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi (Hastanesi) Merkez Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nde Chromsystem HPLC yöntemi ile Ankara Düzen Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nde Waters Quattro Premier XE marka LC-MS/MS yöntemi karşılaştırılarak gerçekleştirildi.

- 40 örnek ile çalışıldı.
- Tüm analizler iki farklı günde tamamlandı.
- Sonuçları alınan birey örneklerin ve UTAK KKM'lerin 25(OH)Vitamin D₃ ve 25(OH)Vitamin D₂ değerleri hesaplandı.

- Örnek veri kayıt formu dolduruldu (Bkz. Ek-3).
- Aşırı uçlar değerlendirildi.
- Veriler grafikte gösterildi.
- Eğim (b), y-ekseni kesişim noktası(a) ve $S_{y,x}$ hesaplandı.
- Bias hesaplandı.
- Korelasyon katsayısı (r) incelenerek regresyon istatistiğinin uygulanabilme derecesi değerlendirildi.
- Veri analizi yapılarak, yorum yapıldı.

3.2.3 Doğrusallığın (rapor edilebilir aralığın) doğrulanması

Rapor edilebilir aralık için hedefler ve tıbbi karar düzeyleri:

Üreticinin hedef olarak belirttiği Vitamin D₃ için geri kazanım % 86'dır (nonlinearite için %14). Tekrarlanabilirlik değerleri Tablo 3.3' te gözlenmektedir.

Yöntem:

1.Yol: Analit içeriği $2 \cdot 10^6$ µg/l konsantrasyon olan stok standarttan seri dilüsyonla 8 farklı noktada örnek hazırlandı. Dilüsyon işlemi için steril su kullanıldı.

CLSI EP06A Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi Kılavuzuna (CLSI-EP06AE 2003) göre Ek-4 6f basamağındaki "Konsantre veya dilüe edilmiş ticari kontrol materyali" kullanıldı. 8 farklı dilüsyonda örnek hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5 Dilüsyonla hazırlanan 8 farklı konsantrasyonda deney örneği

Konsantrasyon ve dilüsyon fraksiyonları	Beklenen değer µg/l	Dilüsyon oranları (%)
6,25 µg/l (2+4)	3,125	0,78
12,5 µg/l (2+4)	6,25	1,56
25 µg/l (2+4)	12,5	3,13
50 µg/l (2+4)	25	6,25
100 µg/l (2+4)	50	12,5
200 µg/l (2+4)	100	25
400 µg/l (2+4)	200	50
$2 \cdot 10^6$ µg/l (1+5)	400	100

2.Yol: UTAK marka üç farklı seviyedeki kalite kontrol materyalleri ile 6 farklı konsantrasyon hazırlandı (Tablo 3.6).

UTAK Düşük = 10 µg/l (ng/ml)

UTAK Orta = 30 µg/l (ng/ml)

UTAK Yüksek = 73 µg/l (ng/ml)

Tablo 3.6 Analiz örneklerinin hazırlanması

Karıştırılmış materyaller	Hazırlanışı	Beklenen değer
UTAK Low	UTAK Low aynen alındı	10 µg/l
2.	10 µg/l 'den 600 ml, 73 µg/l 'den 200 ml alınarak hazırlanan konsantrasyon	25,75 µg/l
3.	UTAK L1 aynen alındı	30 µg/l
4.	10 µg/l 'den 400 ml, 73 µg/l 'den 400 ml alınarak hazırlanan konsantrasyon	41,5 µg/l
5.	10 µg/l 'den 200 ml, 73 µg/l 'den 600 ml alınarak hazırlanan konsantrasyon	57,25 µg/l
6.	UTAK Yüksek aynen alındı	73 µg/l

Tablo 4.17, 4.18 ve 4.19'deki hesaplamalar polinomial modellerle Microsoft Excel hesaplama tablosunda ilgili formüllerle gerçekleştirildi. Varyans analizi SPSS İstatistik Programıyla yapıldı.

3.2.4 Referans aralığın geçerliliğinin doğrulanması

CLSI C28-A3c Klinik Laboratuvarda Referans Aralıkları Belirleme Kılavuzunun önerileri uygulandı. Referans bireyler kılavuza göre seçildi. Tüm bireylerde kalsiyum ve PTH ölçüldü. Kılavuza göre seçilen bireylerin sonuçlarına bootstrapping ve robust hesaplama yöntemleri de uygulandı.

Çalışma Grubu: 18-45 yaşları arasında 40 kadın, 40 erkek sağlıklı gönüllü

Referans bireylerin seçilmesi ve dışlanması

D Vitamini supplementi alan, 18-45 yaş aralığı dışında kalanlar, hamileler, kronik hastalık durumu, tokluk hali ve diyet yapıyor olması dışlama kriteri olarak belirlendi. Hazırlanmış olan anket formu tüm bireyler için dolduruldu.

- 18-45 yaş aralığındaki 40 kadın ve 40 erkekte kan örnekleri 8-12 saat açlık sonrası sabah 08:00-11:00 arasında oturur pozisyonda EDTA'lı tüplere alındı. EK-5'teki Referans birey belirleme formu (CLSI-C28A3cE 2008) imzalandı.

- Her birey için referans belirleme formu dolduruldu.
- Tüpler karanlık ortamda laboratuvara gönderildi.
- Tüm örnekler 7 dakika 2772 g'de (5000 rpm) santrifüj edildi ve analiz gününe kadar -20°C'de saklandı.

Vitamin D ölçümünün iç kalite kontrol sonuçları toplanarak değerlendirildi.

- Pamukkale Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi (Hastanesi) Merkez Laboratuvarı Biyokimya Birimi'nde Chromosystems HPLC cihazında analizler gerçekleştirildi.

- Ölçüm sonuçlarının histogramı çizildi. Dağılım görsel değerlendirildi.
- Uç değerler görsel olarak belirlendi.
- Dixon Reed kuralına göre aşırı uç değerler test edildi.
- Dağılım normal dağılım olma durumu değerlendirildi.
- Dağılım durumuna göre referans aralıkları ve %90 güven aralıkları hesaplandı.

Cinsiyet grupları arasında fark olup olmadığı değerlendirildi.

3.2.5 Hesaplamalar ve istatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Microsoft Office Excel (Seattle, Washington, ABD), SPSS 21 (Chicago, Illinois, ABD), MedCalc 16.1.2 (Ostend, Belçika) programları kullanılarak yapıldı. Yöntem karşılaştırma için Regresyon analizi ve Bland-Altman analizi kullanıldı. Doğrusallık için, polinomial analizler gerçekleştirildi, ANOVA testi yapıldı. Referans aralık için, Dixon ve Reed kuralı ile aşırı uç incelemesi yapıldı. Kolmogorov Smirnov analizi kullanıldı. Student t-test ile hesaplamalar gerçekleştirildi. Kılavuza göre seçilen bireylerin sonuçlarına bootstrapping ve robust hesaplama yöntemleri de uygulandı. Ölçüm sonuçlarının histogramı çizildi.

4 BULGULAR

4.1 Tekrarlanabilirliğin Doğrulanması

Hasta materyalleriyle tekrarlanabilirliğin doğrulanması

Üç farklı seviyedeki plazma havuzlarında 25(OH)Vitamin D₃ değerinin kesinlik değerlerinin hesaplamaları tablo 4.1, tablo 4.2 ve tablo 4.3'te gözlenmektedir.

Tablo 4.1 Plazma havuzu 25(OH)Vit D3 HH1 tekrarlanabilirlik kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25(OH)Vit D ₃ (8,2 - 10,51 µg/l aralığı)
Konsantrasyon	3,202 µg/l HH1
Kontrol materyali Ref no/Lot no	
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25(OH)Vit D3/D2 /4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012	29.06.2012	02.07.2012
Tekrar 1	Pik yok	Pik yok	Pik yok	Pik yok	Pik yok
Tekrar 2	Pik yok	Pik yok	Pik yok	Pik yok	Pik yok
Tekrar 3	Pik yok	Pik yok	Pik yok	Pik yok	Pik yok

Tablo 4.2 Plazma havuzu 25(OH)Vit D3 HH2 tekrarlanabilirlik kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25(OH)Vit D ₃
Konsantrasyon	16,59 µg/l HH2 (13,1-19,76 µg/l aralığı)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25(OH)Vit D3/D2 /4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012	29.06.2012
Tekrar 1	13,75	22,64	10,23		7,41
Tekrar 2	15,35	20,00	10,98		
Tekrar 3	16,77	17,00	10,40		
$\sum_{i=1}^3 x_i$	45,87	59,64	31,6		7,41
\bar{x}_d	15,29	19,88	10,5		2,47
\bar{x}	9,6				
$x_1 - \bar{x}_d$	-1,54	2,76	-0,307		4,94
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	2,37	7,618	0,094		24,4
$x_2 - \bar{x}_d$	0,06	0,12	0,443		-2,47
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	0,004	0,014	0,197		6,1
$x_3 - \bar{x}_d$	1,48	-2,88	-0,137		-2,470
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	2,19	8,294	0,019		6,1
$\sum_1^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	4,5	15,9	0,309		36,6
sd_r^2	2,28	7,9	0,15		18,3
s_r	2,679				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	5,655	10,245	0,901		-7,165
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	31,9	104,953	0,812		51,342
s_b^2	47,3				
s_l	7,215				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$	1,431	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$		-	
T	17,00				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{F}}$	-	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$		-	

Tablo 4.3 Plazma havuzu 25(OH)Vit D3 HH3 tekrarlanabilirlik kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25(OH)Vit D ₃
Konsantrasyon	69,87 µg/l HH3 (38,3-183 µg/l aralığı)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25(OH)Vit D3/D2 /4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	16.07.2012	18.07.2012	20.07.2012	26.07.2012	27.07.2012
Tekrar 1	35,23	53,31	43,19	30,37	60,70
Tekrar 2	49,83	54,46	57,34	48,71	36,65
Tekrar 3	34,10	42,12	48,66	48,84	41,52
$\sum_{i=1}^3 x_i$	119,2	149,9	149,2	127,9	138,8
\bar{x}_d	39,72	49,96	49,73	42,64	46,29
\bar{x}	45,67				
$x_1 - \bar{x}_d$	-4,492	3,343	-6,544	-12,267	14,41
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	20,18	11,18	42,828	150,4	207,6
$x_2 - \bar{x}_d$	10,110	4,499	7,612	6,072	-9,640
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	102,21	20,24	57,937	36,86	92,92
$x_3 - \bar{x}_d$	-5,618	-7,843	-1,067	6,196	-4,771
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	31,56	61,51	1,139	38,39	22,76
$\sum_1^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	153,95	92,92	101,90	225,74	323,3
sd_r^2	76,97	46,46	50,95	112,87	161,6
s_r	9,476				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	-5,948	4,293	4,064	-3,028	0,62
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	35,376	18,42	16,51	9,172	0,384
s_b^2	19,97				
s_l	8,935				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{V}}$	0,606		$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$		0,411
T	253215				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{F}}$	0,023		$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$		2,1

Tablo 4.4 Hesaplama sonuçları

EK-1 Madde 4'e göre gün içi değerlendirmeler yapıldı.

		Hesaplanan tekrarlanabilirlik s_r	Gün doğrulama değeri	İçerik
Vitamin	HH1	-	-	Doğrulanmadı
D ₃	HH2	-	-	Doğrulanmadı
	HH3	9,476	0,606	Doğrulanmadı

EK-1 Madde 5'e göre günler arası değerlendirmeler yapıldı.

		Hesaplanan tekrarlanabilirlik s_l	Günler arası doğrulama değeri	İçerik
Vitamin	HH1	-	-	Doğrulanmadı
D ₃	HH2	-	-	Doğrulanmadı
	HH3	8,935	0,023	Doğrulanmadı

Kalite kontrol materyalleriyle:

Üç farklı seviyedeki kontrol serumlarında 25(OH)Vitamin D₃ ve 25(OH)Vitamin D₂ değerlerinin kesinlik değerlerinin ayrı ayrı doğrulandığı düşük düzey hesaplamalar Tablo 4.5 ve 4.6'da orta düzey (düzey 1) hesaplamalar Tablo 4.7 ve 4.8'de, yüksek düzey (düzey 2) hesaplamalar Tablo 4.9 ve 4.10'da gözlenmektedir.

Tablo 4.5 25(OH)Vitamin D₃ düşük düzey_tekrarlanabilirlik veri kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25-OH-Vit D ₃
Konsantrasyon	10 ng/ml (25 nmol/l)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	UTAK Vit D Plus Düşük 10060/7038
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25-OH-Vit D ₃ /D ₂ / 4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	14.06.2012	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012
Tekrar 1	11,2	10,2	10,3	8,4	11,7
Tekrar 2	8,7	10,9	10,4	8,8	9,7
Tekrar 3	11,2	10,0	11,5	6,5	10,1
$\sum_{i=1}^3 x_i$	31,10	31,10	32,21	23,73	31,60
\bar{x}_d	10,37	10,37	10,74	7,91	10,53
\bar{x}	9,983				
$x_1 - \bar{x}_d$	0,873	-0,207	-0,417	0,510	1,188

$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	0,763	0,043	0,174	0,260	1,411
$x_2 - \bar{x}_d$	-1,657	0,543	-0,377	0,930	-0,814
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	2,745	0,295	0,142	0,865	0,663
$x_3 - \bar{x}_d$	0,783	-0,337	0,793	-1,440	-0,374
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	0,614	0,113	0,629	2,074	0,140
$\sum_1^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	4,121	0,451	0,945	3,199	2,214
sd_r^2	2,060	0,226	0,472	1,599	1,107
s_r	1,045				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	0,384	0,384	0,754	-2,073	0,551
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	0,147	0,147	0,568	4,296	0,304
s_b^2	1,366				
s_l	1,447				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$	44,13	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$			29,95
T	16,00				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$	45,31	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$			32,94

UTAK Vit D Plus düşük düzey için, 25-OH-Vit D₃ değerinde:

$$s_r (1,045) \leq \text{gün içi doğrulama değeri (44,13)}$$

$$s_l (1,447) \leq \text{günler arası doğrulama değeri (45,31) olduğundan}$$

tekrarlanabilirlik tutarlı doğrulandı.

Tekrarlanabilirliğin doğrulanması deneylerinde tüm analiz sonuçları alındıktan sonra hesaplamalar yapıldı ve ardından doğrulama basamakları uygulandı ve değerlendirmeler yapıldı.

Tablo 4.6 25(OH)Vitamin D₂ düşük düzey_tekrarlanabilirlik veri kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25-OH-Vit D ₂
Konsantrasyon	10 ng/ml (24,2 nmol/l)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	UTAK Vit D Plus Düşük 10060/7038
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25-OH-Vit D ₃ /D ₂ / 4111

Kalibratör /Lot

CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	14.06.2012	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012
Tekrar 1	13,25	9,22	9,97	10,39	8,002
Tekrar 2	11,23	9,79	10,05	10,78	9,23
Tekrar 3	12,78	9,87	14,01	8,47	8,78
$\sum_{i=1}^3 x_i$	37,26	28,88	34,03	29,64	26,01
\bar{x}_d	12,42	9,63	11,34	9,880	8,671
\bar{x}	10,39				
$x_1 - \bar{x}_d$	0,830	-0,407	-1,373	0,510	-0,669
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	0,689	0,165	1,886	0,260	0,447
$x_2 - \bar{x}_d$	-1,190	0,163	-1,293	0,900	0,559
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	1,416	0,027	1,673	0,810	0,313
$x_3 - \bar{x}_d$	0,360	0,243	2,667	-1,410	0,109
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	0,130	0,059	7,111	1,988	0,012
$\sum_{i=1}^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	2,235	0,251	10,67	3,058	0,772
sd_r^2	1,117	0,126	5,335	1,529	0,386
s_r	1,303				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	2,032	-0,761	0,955	-0,508	-1,717
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	4,128	0,580	0,912	0,258	2,950
s_b^2	2,207				
s_l	1,827				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{V}}$	27,55	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$			18,69
T	27,00				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{F}}$	50,59	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$			47,78

UTAK Vit D Plus düşük düzey için, 25(OH)Vit D₂ değerinde:

$$s_r(1,303) \leq \text{gün içi doğrulama değeri (27,55)}$$

$$s_l(1,827) \leq \text{günler arası doğrulama değeri (50,59) olduğundan}$$

tekrarlanabilirlik tutarlı biçimde doğrulandı.

Tablo 4.7 25(OH)Vitamin D₃ düzeyi 1_tekrarlanabilirlik veri kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25-OH-Vit D ₃
Konsantrasyon	30 ng/ml (74 nmol/l)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	UTAK Vit D Plus Düzey 1 10061/7039
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25-OH-Vit D ₃ /D ₂ / 4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	14.06.2012	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012
Tekrar 1	30,03	32,22	25,76	20,64	28,40
Tekrar 2	33,64	29,90	29,95	22,22	29,20
Tekrar 3	30,69	30,76	29,17	24,03	29,02
$\sum_{i=1}^3 x_i$	94,36	92,88	84,88	66,88	86,62
\bar{x}_d	31,45	30,96	28,29	22,29	28,87
\bar{x}	28,38				
$x_1 - \bar{x}_d$	-1,423	1,260	-2,533	-1,655	-0,473
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	2,026	1,588	6,418	2,739	0,224
$x_2 - \bar{x}_d$	2,187	-1,060	1,657	-0,075	0,327
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	4,782	1,124	2,745	0,006	0,107
$x_3 - \bar{x}_d$	-0,763	-0,200	0,877	1,730	0,147
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	0,583	0,040	0,769	2,993	0,022
$\sum_{i=1}^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	7,390	2,751	9,931	5,738	0,352
sd_r^2	3,695	1,376	4,965	2,869	0,176
s_r	1,617				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	3,078	2,585	-0,082	-6,080	0,498
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	9,476	6,682	0,007	36,966	0,248
s_b^2	13,34				
s_l	3,884				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$	125,42	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$		85,12	
T	11,00				

Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$	155,33	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$	93,64
--	--------	------------------------------------	-------

UTAK Vit D Plus Düzey 1 için, 25(OH)Vit D₃ değerinde:

$$s_r (1,617) \leq \text{gün içi doğrulama değeri (125,4)}$$

$s_l (3,884) \leq \text{günler arası doğrulama değeri (155,3)}$ olduğundan tekrarlanabilirlik tutarlı biçimde doğrulandı.

Tablo 4.8 25(OH)Vit D₂ düzey 1_ tekrarlanabilirlik veri kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsytem
Analit	25-OH-Vit D ₂
Konsantrasyon	30 ng/ml (72,7 nmol/l)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	UTAK Vit D Plus Düzey 1 10061/7039
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25-OH-Vit D ₃ /D ₂ / 4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	14.06.2012	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012
Tekrar 1	29,16	28,99	31,43	22,05	26,55
Tekrar 2	31,16	25,99	33,65	24,61	25,62
Tekrar 3	29,74	28,14	35,54	22,84	24,49
$\sum_{i=1}^3 x_i$	90,06	83,12	100,62	69,50	76,66
\bar{x}_d	30	27,7	33,5	23,2	25,5
\bar{x}	27,997				
$x_1 - \bar{x}_d$	-0,860	1,283	-2,110	-1,117	0,995
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	0,740	1,647	4,452	1,247	0,990
$x_2 - \bar{x}_d$	1,140	-1,717	0,110	1,443	0,071
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	1,300	2,947	0,012	2,083	0,005
$x_3 - \bar{x}_d$	-0,280	0,433	2,000	-0,327	-1,066
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	0,078	0,188	4,000	0,107	1,136
$\sum_{i=1}^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	2,118	4,782	8,464	3,437	2,131
sd_r^2	1,059	2,391	4,232	1,718	1,066
s_r	1,447				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	2,023	-0,290	5,543	-4,830	-2,445

$\left(\bar{x}_i - \bar{x}\right)^2$	4,092	0,084	30,724	23,33	5,988
s_b^2	16,053				
s_l	4,177				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{V}}$	74,25	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$			50,39
T	7,000				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$	267,8	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$			128,8

UTAK Vit D Plus Düzey 1 için, 25(OH)Vit D₂ değerinde:

$$s_r (1,447) \leq \text{gün içi doğrulama değeri (74,25)}$$

$$s_l (4,177) \leq \text{günler arası doğrulama değeri (267,8) olduğundan}$$

tekrarlanabilirlik tutarlı biçimde doğrulandı.

Tablo 4.9 25(OH)Vitamin D₃ düzey 2_tekrarlanabilirlik veri kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsytem
Analit	25-OH-Vit D ₃
Konsantrasyon	73 ng/ml (182 nmol/l)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	UTAK Vit D Plus Düzey 2 10062/7040
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25-OH-Vit D ₃ /D ₂ / 4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	14.06.2012	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012
Tekrar 1	74,97	74,63	75,10	51,97	75,85
Tekrar 2	77,89	71,09	75,45	53,20	77,86
Tekrar 3	77,47	72,22	76,39	51,25	78,33
$\sum_{i=1}^3 x_i$	230,3	217,9	226,9	156,4	232,03
\bar{x}_d	76,8	72,6	75,6	52,1	77,3
\bar{x}	70,91				
$x_1 - \bar{x}_d$	-1,807	1,983	-0,547	-0,170	-1,495
$\left(x_1 - \bar{x}_d\right)^2$	3,264	3,934	0,299	0,029	2,234
$x_2 - \bar{x}_d$	1,113	-1,557	-0,197	1,060	0,512
$\left(x_2 - \bar{x}_d\right)^2$	1,240	2,423	0,039	1,124	0,262
$x_3 - \bar{x}_d$	0,693	-0,427	0,743	-0,890	0,982
$\left(x_3 - \bar{x}_d\right)^2$	0,481	0,182	0,553	0,792	0,965

$\sum_1^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	4,984	6,539	0,890	1,945	3,461
sd_r^2	2,492	3,269	0,445	0,972	1,731
s_r	1,335				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	5,866	1,736	4,736	-18,77	6,433
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	34,409	3,013	22,429	352,340	41,383
s_b^2	113,4				
s_l	10,70				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$	94,03	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$			63,82
T	4,00				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$	448,7	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$			163,1

UTAK Vit D Plus Düzey 2 için, 25(OH)Vit D₃ değerinde:

$$s_r (1,335) \leq \text{gün içi doğrulama değeri (94,03)}$$

$$s_l (10,704) \leq \text{günler arası doğrulama değeri (448,7) olduğundan}$$

tekrarlanabilirlik tutarlı biçimde doğrulandı.

Tablo 4.10 25(OH)Vitamin D₂ düzey 2_tekrarlanabilirlik veri kayıt formu

Cihaz	HPLC Chromsystem
Analit	25-OH-Vit D ₂
Konsantrasyon	73 ng/ml (177 nmol/l)
Kontrol materyali Ref no/Lot no	UTAK Vit D Plus Düzey 2 10062/7040
Reaktif materyali Ref no/Lot no	HPLC Column 25-OH-Vit D ₃ /D ₂ / 4111
Kalibratör /Lot	CS Serum Kal. St. Iyo. /2011

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör	14.06.2012	15.06.2012	18.06.2012	20.06.2012	21.06.2012
Tekrar 1	77,80	66,14	79,54	52,96	65,29
Tekrar 2	73,52	65,73	75,49	56,29	72,26
Tekrar 3	73,20	68,18	79,27	53,34	79,24
$\sum_{i=1}^3 x_i$	224,5	200,0	234,3	162,6	216,8
\bar{x}_d	74,8	66,7	78,1	54,2	72,3
\bar{x}	69,22				
$x_1 - \bar{x}_d$	2,960	-0,543	1,440	-1,237	-6,969
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$	8,762	0,295	2,074	1,529	48,567
$x_2 - \bar{x}_d$	-1,320	-0,953	-2,610	2,093	-0,001

$(x_2 - \bar{x}_d)^2$	1,742	0,909	6,812	4,382	0,000
$x_3 - \bar{x}_d$	-1,640	1,497	1,170	-0,857	6,970
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$	2,690	2,240	1,369	0,734	48,581
$\sum_1^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$	13,194	3,444	10,255	6,645	97,148
sd_r^2	6,597	1,722	5,127	3,323	48,574
s_r	3,615				
$\bar{x}_d - \bar{x}$	5,623	-2,534	8,883	-15,021	3,049
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$	31,616	6,420	78,904	225,616	9,295
s_b^2	87,97				
s_l	9,832				
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$	193,8	$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$			131,5
T	51,00				
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$	101,3	$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$			131,5

UTAK Vit D Plus Düzey 2 için, 25(OH)Vit D₂ değerinde:

$$s_r (3,615) \leq \text{gün içi doğrulama değeri (193,8)}$$

$$s_l (9,832) \leq \text{günler arası doğrulama değeri (101,3) olduğundan}$$

tekrarlanabilirlik tutarlı biçimde doğrulandı.

Hesaplama sonuçlarının değerlendirilmesi:

EK-1 madde 4'e göre gün içi değerlendirmeler yapıldı.

Tablo 4.11 Gün içi değerlendirme sonuçları

		Hesaplanan tekrarlanabilirlik s_r	Gün içi doğrulama değeri	
Vitamin D₂	Düşük	1,303	27,55	Doğrulandı
	Orta (Düzey_1)	1,447	74,25	Doğrulandı
	Yüksek (Düzey_2)	3,615	193,8	Doğrulandı
Vitamin D₃	Düşük	1,045	44,13	Doğrulandı
	Orta (Düzey_1)	1,617	125,4	Doğrulandı
	Yüksek (Düzey_2)	1,335	94,03	Doğrulandı

EK-1 madde 5'e göre günler arası değerlendirmeler yapıldı.

Tablo 4.12 Günler arası değerlendirme sonuçları

		Hesaplanan tekrarlanabilirlik s_l	Günler arası doğrulama değeri	
Vitamin D₂	Düşük	1,827	50,59	Doğrulandı
	Orta (Düzyey_1)	4,177	267,8	Doğrulandı
	Yüksek (Düzyey_2)	9,832	101,3	Doğrulandı
Vitamin D₃	Düşük	1,447	45,31	Doğrulandı
	Orta (Düzyey_1)	3,884	155,3	Doğrulandı
	Yüksek (Düzyey_2)	10,70	448,7	Doğrulandı

4.2 Gerçekliğin Doğrulanması

Gerçeklik (KKM düzeylerine göre): Kalite kontrol materyalleri ile gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre gerçeklik doğrulandı. Doğrulama aralıkları; düşük düzey UTAK için 4,44-16,41 ng/ml, L1 UTAK için 14,6-44,5 ng/ml ve L2 UTAK için de 42,65-108,2 ng/ml bulundu. Doğrulama sınırlarına göre değerlendirme Tablo 4.13'te gösterilmektedir. Üç düzey için hesaplanan %biaslar (%4,3; %1,4; %3,34) her KKM için üç hedef biastan da küçük bulundu.

Kalite kontrol materyalleriyle gerçekliğin doğrulanması:

Analiz Sistemi:

Analit: 25(OH)Vit D₃

Cihaz: Chromsystems, HPLC-izoktarik UV Detektör

Reaktif materyali ref no/Lot no: HPLC Column 25(OH)Vit D₃/D₂/4111

Kalibratör/Lot: CS Serum Kal, St, Iyo, /2011

Kontrol Materyalleri:

Kontrol materyali ref no/ Lot No	KM, Konsantrasyon ng/ml (nmol/l)
UTAK Vit D Plus Low 10060/7038	10 (25)
UTAK Vit D Plus Level 1 10061/7039	30 (74)
UTAK Vit D Plus Level 2 10062/7040	73 (182)

Hedef değerler (Bias):

	Firma	Stökl_2009	Viljonen_2011
%Bias	14*	10	5

*Firmanın geri kazanım değeri %86'dan hesaplandı.

Tablo 4.13 Ölçüm sonuçları ve hesaplamalar

Gün	Sıra	UTAK- Low (ng/ml)	UTAK-L1 (ng/ml)	UTAK-L2 (ng/ml)
	1	11,24	30,03	75,0
1. gün	2	8,71	33,64	77,9
	3	11,15	30,69	77,5
	4	10,16	32,22	74,6
2. gün	5	10,91	29,90	71,1
	6	10,03	30,76	72,2
	7	10,32	25,76	75,1
3. gün	8	10,36	29,95	75,5
	9	11,53	29,17	76,4
	10	10,15	26,64	75,0
4 .gün	11	10,12	29,22	73,2
	12	10,14	29,03	76,3
	13	11,72	28,40	75,8
5. gün	14	9,72	29,20	77,9
	15	10,16	29,02	78,3
Ortalama		10,43	29,58	75,44
SE		0,199	0,498	0,541
Doğrulama aralığı (ng/ml)		4,44 - 16,41	14,6 – 44,5	42,65 – 108,2
Hedef (ng/ml)		10	30	73
Fark ng/ml 		0,43	-0,42	2,44
%bias		4,3	1,4	3,34
		Geçerli	Geçerli	Geçerli

Ek-3 madde 1.4.5.5' e göre hesaplamalar yapıldı(Tablo 4.14).

Tablo 4.14 KKMLerle gerçekliğin hesaplamaları

	UTAK Low	UTAK L1	UTAK L2
$S_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$	0,594	3,729	4,395
$s_x = \sqrt{\frac{s_x^2}{n}}$	0,199	0,498	0,541
s_a	4	5	11
Serbestlik derecesi= 2n-1 (5 çalışma için 3 tekrar ölüm)	14	14	14
α 0,01 çift taraflı t için	2,977	2,977	2,977
Doğrulama aralığı $\bar{x} \pm t_{1-\alpha/2, 2n-1} \cdot \sqrt{(s_x^2 + s_a^2)}$	4,44-16,41	14,61-44,53	42,65-108,23
Firmanın değeri (ng/ml)	10	30	73
Değerlendirme sonucu	Geçerli	Geçerli	Geçerli

Her seviye için lmlmüş değer, verifikasyon sınırlarının içerisinde kaldığından, firmanın belirttiği gerçeklik performansı doğrulandı.

Yöntem karşılaştırma ile gerçekliğin doğrulanması: Karşılaştırma sonuçları kaydedildi (Tablo 4.15). Ek-3 madde 2.4'e göre hesaplamalar yapıldı.

Tablo 4.15 Karşılaştırma çalışması sonuçları (HPLC ve LC-MS/MS)

Gün(ler):		Analit:25-OH-Vitamin D3				
Test Yöntemi: HPLC						
Karşılaştırılan Yöntem: LC-MS/MS						
Örnek #	Test Yöntemi		Karşılaştırılan Yöntem		Test Yöntemi (Y)	Karşılaştırılan Yöntem (X)
	1.ölçüm	2. ölçüm	1.ölçüm	2. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	11,24		9,00		11,24	9,00
2	10,16		9,30		10,16	9,30
3	10,32		9,10		10,32	9,10
4	9,97		9,60		9,97	9,60
5	10,39		9,60		10,39	9,60
6	9,22		9,50		9,22	9,50
7	13,25		12,90		13,25	12,90
8	11,23		27,50		11,23	27,50
9	30,03		25,40		30,03	25,40
10	32,22		26,10		32,22	26,10
11	25,76		25,70		25,76	25,70
12	33,64		30,50		33,64	30,50
13	35,54		36,30		35,54	36,30
14	74,87		26,00		74,87	26,00
15	74,63		48,50		74,63	48,50
16	75,10		56,50		75,10	56,50
17	72,20		55,90		72,20	55,90
18	51,97		50,00		51,97	50,00
19	51,25		51,30		51,25	51,30
20	53,20		57,10		53,20	57,10
21	6,00		13,30		6,00	13,30
22	9,00		9,90		9,00	9,90
23	9,40		6,00		9,40	6,00
24	9,50		7,40		9,50	7,40
25	21,00		9,40		21,00	9,40
26	21,50		13,20		21,50	13,20
27	22,00		13,60		22,00	13,60
28	23,00		15,20		23,00	15,20
29	24,00		13,80		24,00	13,80
30	27,00		18,60		27,00	18,60
31	28,00		19,70		28,00	19,70
32	35,68		11,60		35,68	11,60
33	37,00		17,00		37,00	17,00
34	102,00		74,60		102,00	74,60
35	101,00		16,90		101,00	16,90
36	87,00		24,00		87,00	24,00
37	73,00		25,60		73,00	25,60
38	60,00		10,00		60,00	10,00
39	56,67		16,60		56,67	16,60
40	51,00		20,20		51,00	20,20

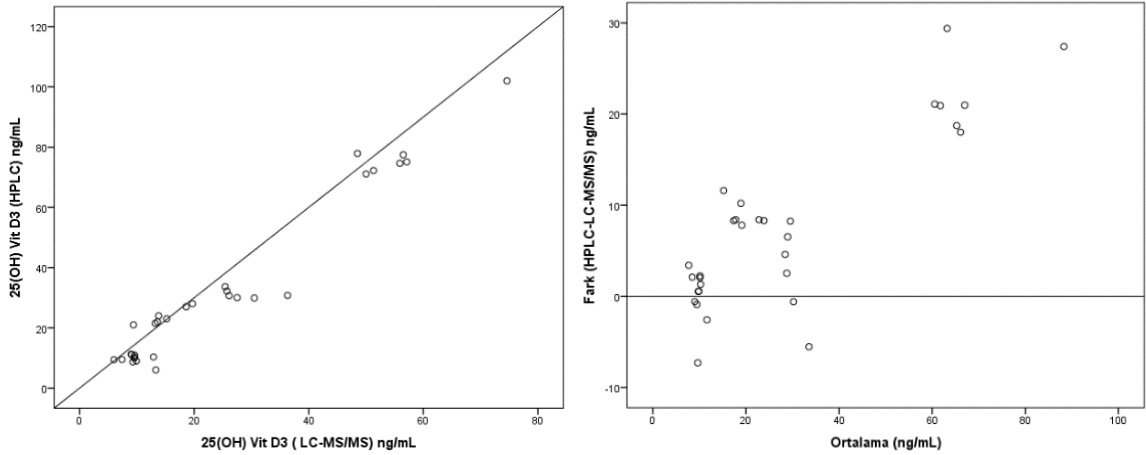
Sadece KKM'lerle (n=19) yapılan karşılaştırmada EP15-A2'ye göre hesaplanan %bias=%15,4 doğrulama sınırı -%0,1-%20 arasında bulundu. Hasta örnekleri de dahil 40 örnek ile yapılan karşılaştırma değerlendirmesi ile doğrulanmadı. Aşırı uç değerler atıldı.

N=31 örnek ile yapılan karşılaştırma sonucunda doğrulama sınırı sağlandı (%21,6; %3,9-%24,0) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16 31 örnek ile karşılaştırma sonuçları

Sıra No	ug/l (25-OH-Vit D3) HPLC	ug/l (25-OH-Vit D3) LC-MS/MS	Fark	%Fark
1	11,24	9,00	2,24	19,92
2	8,71	9,30	0,59	6,77
3	11,15	9,10	2,05	18,38
4	10,16	9,60	0,56	5,51
5	10,91	9,60	1,31	12,00
6	10,03	9,50	0,53	5,28
7	10,32	12,90	2,58	25
8	30,03	27,50	2,53	8,42
9	33,64	25,40	8,24	24,49
10	30,69	26,10	4,59	14,95
11	32,22	25,70	6,52	20,23
12	29,90	30,50	0,60	2,00
13	30,76	36,30	5,54	18,01
14	77,89	48,50	29,39	37,73
15	77,47	56,50	20,97	27,06
16	74,63	55,90	18,73	25,09
17	71,09	50,00	21,09	29,66
18	72,22	51,30	20,92	28,96
19	75,10	57,10	18,00	23,96
20	6,00	13,30	7,30	121,6
21	9,00	9,90	0,90	10
22	9,40	6,00	3,40	36,17
23	9,50	7,40	2,10	22,10
24	21,00	9,40	11,60	55,23
25	21,50	13,20	8,30	38,60
26	22,00	13,60	8,40	38,18
27	23,00	15,20	7,80	33,91
28	24,00	13,80	10,20	42,5
29	27,00	18,60	8,40	31,11
30	28,00	19,70	8,30	29,64
31	102,00	74,60	27,40	26,86
$s_{\bar{b}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (b_i - \bar{b})^2}{n - 1}}$			8,32	
$s_{\%b} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\%b_i - \%b)^2}{n - 1}}$			21,46	
t 0,01 ve df 31 için			2,738	
β			14	
$\beta \pm \frac{t_{1-\alpha/2, n-1} \cdot s_{\%b}}{\sqrt{n}}$			3,92-24,07	

Regresyon istatistiğine göre n=31, 25OHVitD3(HPLC)=-1,61+1,39(LC-MS/MS), r=0,976, Sy/x=6,03; üç KKM için % biaslar % 13, % 24, % 27, olarak hesaplandı. Şekil 4.1' de karşılaştırma grafikleri gözlenmektedir.



Şekil 4.1 Karşılaştırma grafikleri (Regresyon ve Bland-Altman)

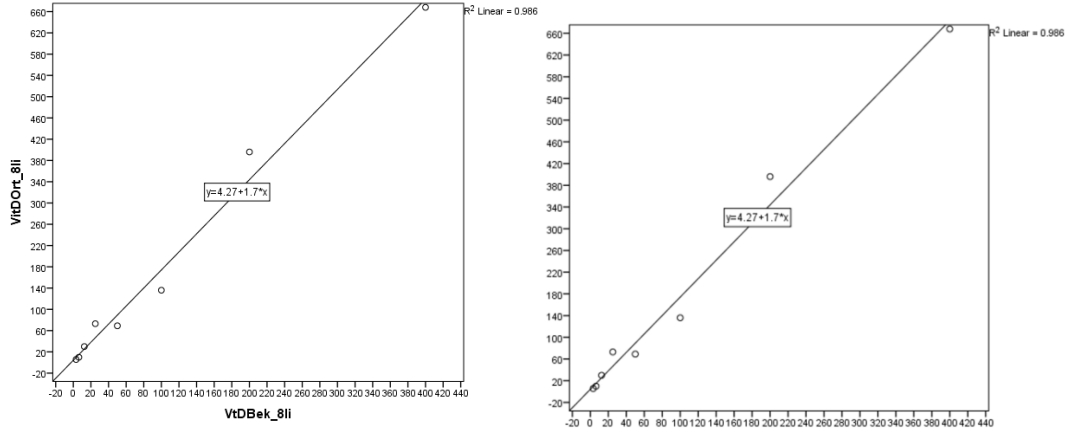
4.3 Doğrusallık (Rapor Edilebilir Aralığın) Doğrulanması

Ticari materyal dilüe edilerek gerçekleştirilen deney:

Tablo 3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanan 8 farklı konsantrasyon için tek günde gerçekleştirilen çift ölçüm sonuçları Tablo 4.17'de gözlenmektedir.

Tablo 4.17 25(OH)Vitamin D₃ çift ölçüm değerleri

Dilüsyon	Beklenen	1.ölçüm 25-OH-VitD ₃ (µg/l)	2. ölçüm 25-OH-VitD ₃ (µg/l)	Fark	Ortalama
1	3,13	6,2	5,2	1,0	5,69
2	6,25	10,5	9,3	1,2	9,86
3	12,5	35	25	10	29,76
4	25	74	73	1	73,41
5	50	71	67	4	68,76
6	100	168	103	65	135,6
7	200	422	369	53	395,7
8	400	678	658	20	668,1



Şekil 4.2 İlk sekiz konsantrasyonun beklenen ve ölçülen değerlerinin regresyon grafiği

Nonlinearite dereceleri hesaplandı. Kılavuz önerisine göre nonlinearite derecesinin hesaplanması için polinomial analiz gerçekleştirildi. MS Excel'de gerçekleştirilen analizler birinci derece polinomial analiz Tablo 4.18'de, ikinci derece polinomial analiz 4.19'da ve üçüncü derece polinomial analiz 4.20'de yer almaktadır.

Tablo 4.18 Birinci derece polinomial regresyon

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,847							
R square	0,718							
Adjusted R Square	0,671							
Standard Error	135,6							
Observations	8							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	281657,7	281657,7	15,31	0,007			
Residual	6	110324,9	18387,48					
Total	7	391982,6						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-195	106	-1,847	0,114	-453,7	63,4	-453,7	63,4
Dilüsyon	82	21	3,914	0,008	30,7	133,1	30,7	133,1
RESIDUAL OUTPUT								
Observation	Predicted Mean		Residuals		Stan. Residuals			
1	-113,3		118,95		0,947			
2	-31,4		41,23		0,328			
3	50,5		-20,76		-0,165			
4	132,4		-59,01		-0,470			
5	214,3		-145,55		-1,159			
6	296,2		-160,55		-1,279			
7	378,1		17,63		0,140			
8	460,0		208,07		1,657			

Tablo 4.19 İkinci derece polinomial regresyon

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,975							
R square	0,951							
Adjusted R Square	0,932							
Standard Error	61,8							
Observations	8							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	2	372876,5	1866438,3	48,79	0,0005			
Residual	5	19106,12	3821,224					
Total	7	391982,6						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	154,38	86,24	1,790	0,133	-67,3	376,1	-67,3	376,1
Dilüsyon	-127,82	43,97	-2,907	0,034	-240,9	-14,8	-240,9	-14,8
2°	23,30	4,77	4,886	0,005	11,04	35,56	11,04	35,56
RESIDUAL OUTPUT								
Observation	Predicted Mean		Residuals		Stan. Residuals			
1	49,9		-44,17		-0,845			
2	-8,1		17,92		0,343			
3	-19,4		49,14		0,941			
4	15,9		57,50		1,101			
5	97,8		-29,04		-0,556			
6	226,3		-90,64		-1,735			
7	401,4		-5,68		-0,109			
8	623,1		44,96		0,861			

Tablo 4.20 Üçüncü derece polinomial regresyon

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,995							
R square	0,989							
Adjusted R Square	0,981							
Standard Error	32,6							
Observations	8							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	3	387726,3	129242,1	121,5	0,0002			
Residual	4	4256,321	1064,08					
Total	7	391982,6						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-93,12	80,38	-1,159	0,311	-316,3	130,04	-316,3	130,04
Dilüsyon	129,67	72,73	1,783	0,149	-72,3	331,6	-72,3	331,6
2°	-44,20	18,24	-2,423	0,073	-94,8	6,45	-94,8	6,45
3°	5,00	1,34	3,736	0,020	1,284	8,716	1,284	8,716
RESIDUAL OUTPUT								
Observation	Predicted Mean		Residuals		Stan. Residuals			
1	-2,6		8,33		0,338			
2	29,4		-19,58		-0,794			
3	33,1		-3,36		-0,136			
4	38,4		35,00		1,419			
5	75,3		-6,54		-0,265			
6	173,8		-38,14		-1,547			
7	363,9		31,82		1,291			
8	675,6		-7,54		-0,306			

İkinci ve üçüncü derece polinomial regresyonun nonlinear katsayıları istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$, çıktılarda gözlenmektedir). Ölçüm prosedürü 3,13 $\mu\text{g/l}$ – 400 $\mu\text{g/l}$ arasında doğrusal bulunmadı.

Ek-4 kılavuz madde 11'e göre dilüe edilerek hazırlanan deney materyallerinin sonuçlarında sapan değerler ikiden fazla olduğu için, materyal ve dilüsyon işlemlerinin yeterli olmadığı düşünüldü. Satın alınan kontrol materyallerine göre doğrusallık doğrulama deneyleri tekrarlandı. Ticari yüksek ve düşük konsantrasyonlardaki materyallerden hazırlanan örnekler, rapor edilebilir aralığın doğrulanması yönteminde de açıklandığı üzere UTAK marka üç farklı seviyedeki kalite kontrol materyalleri ile 6 farklı konsantrasyon hazırlandı.

UTAK Düşük = 10 µg/l (ng/ml)

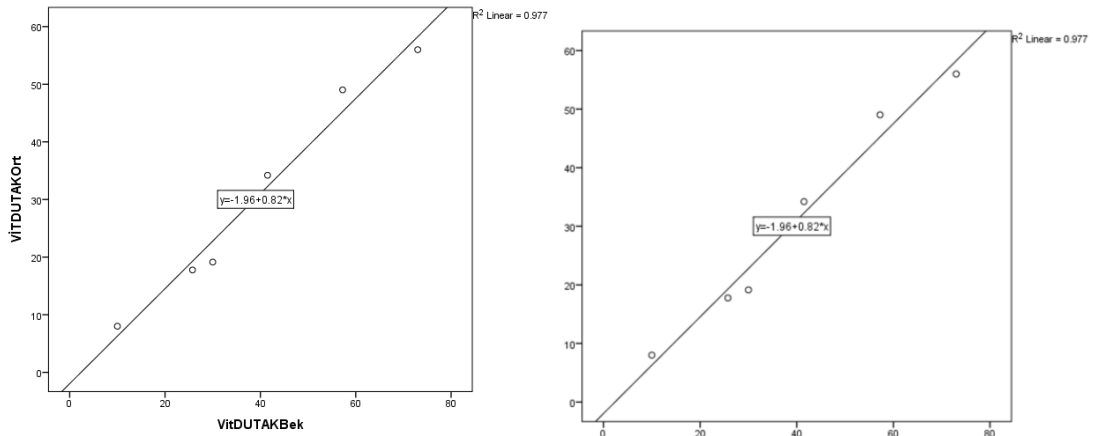
UTAK Orta = 30 µg/l (ng/ml)

UTAK Yüksek = 73 µg/l (ng/ml)

Tablo 4.21'de ticari kontrol materyallerinden hazırlanmış olan dilüsyonların ölçüm sonuçları gözlenmektedir.

Tablo 4.21 Rapor edilebilir aralığın değerlendirilmesi

Dilüsyon	Beklenen Değer µg/l	1. ölçüm µg/l	2. ölçüm µg/l	Ortalama	$x_1 - x_2$	Diffkarsi/2	%Fark	%Fark ² /2
1	10	8,16	7,85	8,00	0,31	0,05	3,79	7,22
2	25,75	19,70	15,84	17,77	3,86	7,45	19,59	191,96
3	30	17,90	20,38	19,14	-2,48	3,07	-13,85	95,98
4	41,5	31,23	37,18	34,20	-5,95	17,70	-19,05	181,49
5	57,25	45,48	52,57	49,02	-7,09	25,13	-15,59	121,51
6	73	54,82	57,17	55,99	-2,35	2,76	-4,29	9,19



Şekil 4.3 Ticari kontrol materyallerden hazırlanan dilüsyonların beklenen ve ölçülen değerlerinin regresyon grafiği

R^2 değeri 0,977 bulundu. Sapan değerler gözlenmediği için polinomial analizler gerçekleştirildi.

MS Excel'de birinci, ikinci ve üçüncü derece en küçük kareler regresyon analizi yapıldı.

Regresyon analizlerinden kılavuzda önerilen Tablo 4.22, 4.23 ve 4.24 hazırlandı.

Tablo 4.22 Birinci derece polinomiyal regresyon

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,982							
R square	0,963							
Adjusted R Square	0,954							
Standart Error	4,062							
Observations	6							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	1	1737,8	1737,8	105,3	0,0005			
Residual	4	65,99	16,49					
Total	5	1803,8						
	Coefficients	Standart Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-4,188	3,781	-1,107	0,330	-14,69	6,310	-14,69	6,310
x	9,965	0,971	10,26	0,0005	7,269	12,66	7,269	12,66
RESIDUAL OUTPUT								
Observation	Predicted Mean			Residuals				
1	5,78			2,23				
2	15,74			2,03				
3	25,71			-6,57				
4	35,67			-1,47				
5	45,64			3,39				
6	55,60			0,39				

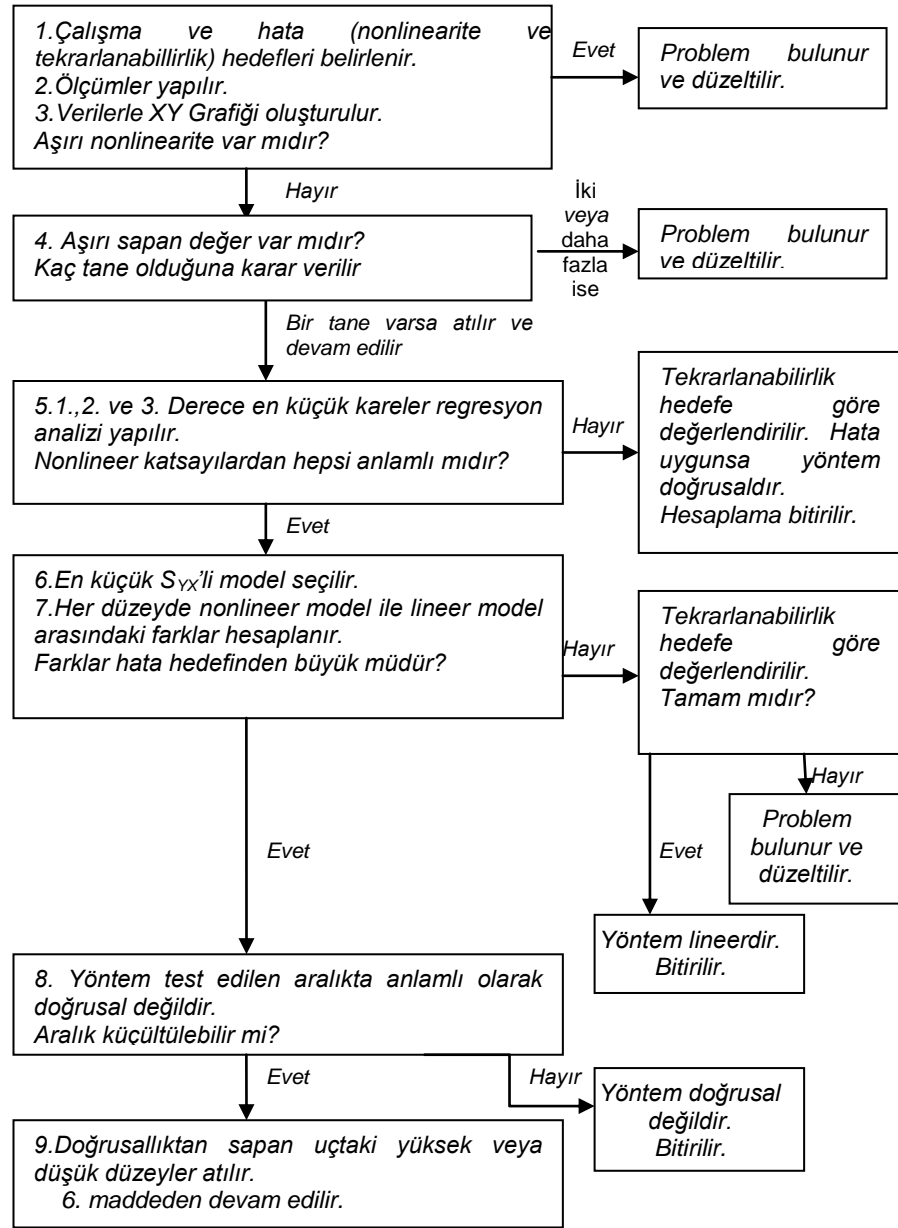
Tablo 4.23 İkinci derece polinomiyal regresyon

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,987							
R square	0,974							
Adjusted R Square	0,956							
Standard Error	3,962							
Observations	6							
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	2	1756,7	878,3	55,94	0,0042			
Residual	3	47,1	15,70					
Total	5	1803,8						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	2,450	7,088	0,346	0,752	-20,11	25,01	-20,11	25,01
x	4,987	4,637	1,075	0,361	-9,771	19,75	-9,771	19,75
x ²	0,711	0,649	1,097	0,353	-1,353	2,775	-1,353	2,775
RESIDUAL OUTPUT								
Observation	Predicted Mean			Residuals				
1	8,15			-0,143				
2	15,27			2,502				
3	23,81			-4,671				
4	33,78			0,429				
5	45,16			3,861				
6	57,97			-1,978				

Tablo 4.24 Üçüncü derece polinomial regresyon

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R								
R square								
Adjusted R Square								
Standard Error								
Observations								
ANOVA								
	df	SS	MS	F	Significance F			
Regression	3	1765,2	588,4	30,48	0,032			
Residual	2	38,61	19,31					
Total	5	1803,8						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	11,57	15,84	0,730	0,541	-56,59	79,74	-56,59	79,74
x	-6,488	18,05	-0,359	0,754	-84,16	71,18	-84,16	71,18
x ²	4,512	5,78	0,781	0,517	-20,34	29,37	-20,34	29,37
x ³	-0,362	0,546	-0,663	0,575	-2,710	1,987	-2,710	1,986
RESIDUAL OUTPUT								
Observation	Predicted Mean			Residuals				
1	9,23			-1,23				
2	13,75			4,02				
3	22,94			3,80				
4	34,64			-0,44				
5	46,68			2,34				
6	56,89			-0,89				

İkinci ve üçüncü derece polinomial regresyonun nonlineer katsayıları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Ölçüm prosedürü 10 µg/l – 73 µg/l arasında doğrusaldır. Şekil 4.4'ün ilk aşaması gerçekleştirilmiş olur.



Şekil 4.4 Doğrusallığın değerlendirme basamakları

Tekrarlanabilirlik hedefe göre değerlendirilir

Rastgele hatanın derecesi hesaplandı:

1. Yol (Bkz. Ek-4)

Rastgele hatanın değerlendirilmesi hesaplamaları

Tekrarlanabilirlik aşağıdaki basamaklar uygulanarak da hesaplanabilir:

1. Yol:

- Her düzeydeki çift ölçümler arasındaki fark hesaplanır
- Çift ölçümler arasındaki farkın karesi alınır

- Farkların karesi toplanır.
- “Düzey sayısı (L) x 2”ye bölünür.
- Karekökü alınır

Doğrusallık değerlendirmelerinde tekrarlanabilirlik için hesaplamalar (Firma %CV olarak belirttiğinden farkların yüzdesi hesaplandı) (Tablo 4.25).

Tablo 4.25 Farkların yüzdesi

Dilüsyon	Beklene n Değer ug/l	1. ölçüm ug/l	2. ölçüm ug/l	Ortalama	x_1-x_2	Fark karesi	Diffkare si/2	%Fark	%Fark kare	%Fark $^2/2$	
1	10	8,16	7,85	8,005	0,310	0,096	0,048	3,799	14,43	7,216	
2	25,75	19,70	15,84	17,77	3,860	14,90	7,450	19,56	383,9	191,9	
3	30	17,90	20,39	19,14	-	2,480	6,150	3,075	-13,86	191,9	
4	41,5	31,23	37,18	34,21	-	5,950	35,40	17,71	-19,05	362,9	
5	57,25	45,48	52,57	49,03	-	7,090	50,27	25,14	-15,59	243,0	
6	73	54,82	57,17	55,99	-2,35	5,523	2,761	-4,287	18,38	9,188	
	Sum						56,17		1214,7	607,4	
	Ortalama						9,362		101,2	101,2	
	Sqroote	Havuzun tekrarlanabilirlik değeri						3,06		10,06	10,06

$1214/(6*2)$ L=6; Ölçüm tekrarı=2

Çift ölçümler arasındaki farklar havuzunun tekrarlanabilirlik değeri %10.06 bulundu. Doğrusallık için deneylerinde tekrarlanabilirlik için hata hedef ölçüm prosedürü için verilen bias değeridir. Firmanın verdiği bias VitD3 için %14,0'tür. Buna göre doğrusallık deneylerinde ölçülen farkla havuzunun %CV'si bias değerinden küçük bulundu.

3. Yol: İstatistik programları kullanılarak

SPSS te General Lineer Model>Univariate (UTAK kontrol materyallerinden hazırlanan deney materyalleri) sonuçları Tablo 4.26'da yer almaktadır.

Tablo 4.26 SPSS'te general lineer model univariate sonuçları

SPSS'e yüklü olan							
GLM/Univariate							
Sıra	Dilüsyon	VitUTAK ölçümler					
1	1	8,16					
2	2	19,7					
3	3	17,9					
4	4	31,23					
5	5	45,48					
6	6	54,82					
1	1	7,85					
2	2	15,84					
3	3	20,38					
4	4	37,18					
5	5	52,57					
6	6	57,17					
GLM/Univariate							
Descriptive Statistics							
Bağlı değişken:							
SıraUTAK		Ortalama	Std. Sapma	N			
1	1	8,005	,219	2			
	Total	8,005	,219	2			
2	2	17,77	2,73	2			
	Total	17,77	2,73	2			
3	3	19,14	1,75	2			
	Total	19,14	1,75	2			
4	4	34,20	4,207	2			
	Total	34,20	4,207	2			
5	5	49,03	5,01	2			
	Total	49,03	5,01	2			
6	6	55,99	1,66	2			
	Total	55,99	1,66	2		CV	Cvkaresi
Total	1	8,005	,219	2	0,05	2,74	7,50
	2	17,77	2,73	2	7,45	15,36	235,9
	3	19,14	1,75	2	3,07	9,16	83,94
	4	34,20	4,21	2	17,7	12,30	151,3
	5	49,03	5,01	2	25,13	10,23	104,6
	6	55,99	1,66	2	2,76	2,97	8,81
	Total	30,69	18,25	12	56,17		592,0
					9,36		98,67
			HavuzdifSD	SDr	3,060	%CV	9,933

*SPSS 21'de General Linear Model/Univariate analiziyle elde edilen farkların standart sapma ve %CV değerleri hesaplandı. Her iki ölçüm standart sapma kareleri toplanarak karekökleri alındı.

Farkların standart sapması ve %CV değerleri 1.Yol ile hesaplama sonuçlarıyla aynıdır.

4.4 Referans Aralığın Geçerliliğinin Doğrulanması

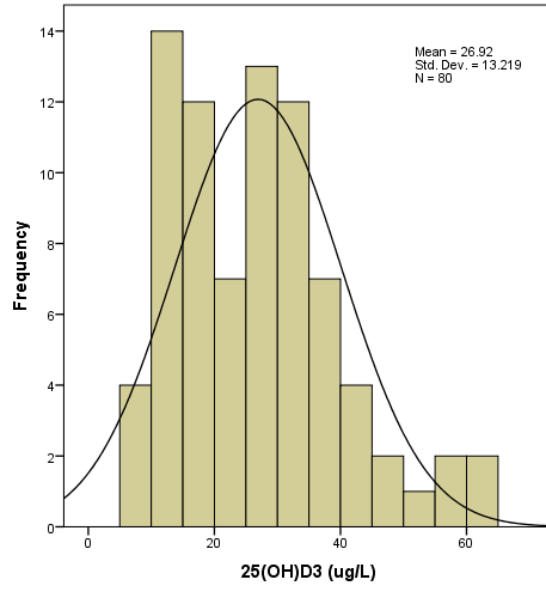
Çalışma grubu: n=80, yaş: $30,6 \pm 7,8$ (19-45); Kadın: n=40 yaş: $30,3 \pm 7,3$ (19-45); Erkek: n=40; yaş: $30,9 \pm 8,4$ (19-45)

Referans bireylerin D vitamini ölçüm sonuçları Tablo 4.27'de gözlenmektedir.

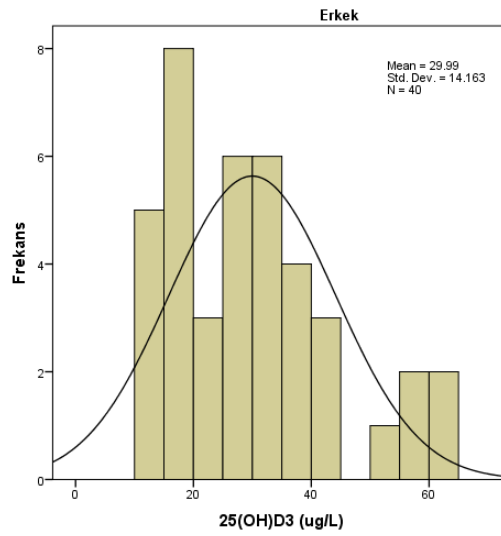
Tablo 4.27 25(OH)Vitamin D3 düzeyleri

Erkek		Kadın	
Sıra	25-OH-Vit D ₃ µg/l	Sıra	25-OH-Vit D ₃ µg/l
1	23,77	41	37,52
2	10,73	42	29,45
3	28,12	43	27,87
4	19,40	44	46,91
5	14,54	45	39,21
6	16,03	46	27,80
7	27,76	47	34,75
8	20,00	48	30,70
9	18,93	49	23,85
10	26,38	50	30,64
11	20,72	51	13,06
12	15,21	52	42,43
13	11,53	53	29,51
14	13,92	54	49,00
15	36,73	55	34,53
16	26,88	56	33,83
17	39,56	57	29,39
18	32,86	58	23,61
19	53,70	59	19,85
20	32,40	60	20,75
21	43,27	61	33,68
22	34,74	62	28,94
23	35,24	63	21,85
24	61,45	64	27,26
25	31,78	65	37,98
26	55,51	66	17,08
27	41,58	67	13,03
28	56,72	68	11,26
29	40,73	69	10,93
30	14,66	70	6,72
31	18,79	71	11,03
32	17,20	72	9,07
33	34,28	73	9,67
34	39,75	74	14,09
35	63,65	75	11,28
36	28,90	76	6,27
37	25,96	77	14,64
38	33,05	78	17,32
39	17,65	79	12,36
40	15,38	80	15,04

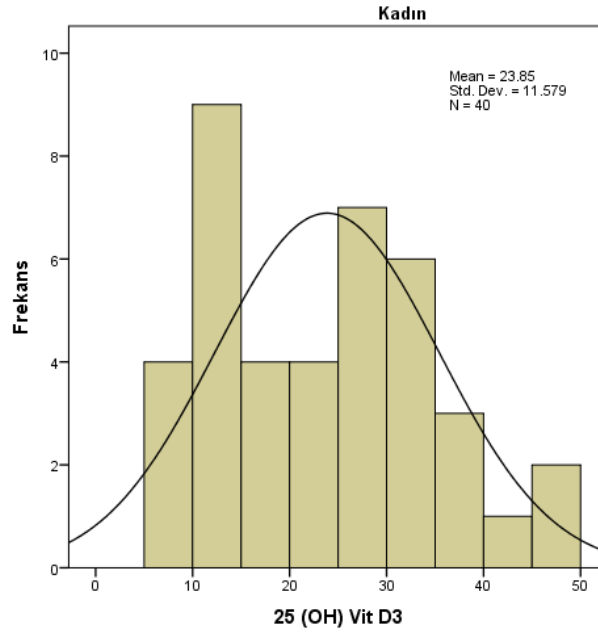
Referans bireylerin ölçüm sonuçlarıyla oluşturulan histogramlar Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de gözlenmektedir.



Şekil 4.5 Çalışma grubunun 25(OH)D3 ölçüm sonuçlarının histogramı



Şekil 4.6 Erkek grubunun 25(OH)D3 ölçüm sonuçlarının histogramı



Şekil 4.7 Kadın grubunun 25(OH)D3 ölçüm sonuçlarının histogramı

Aşırı uç değerlerin incelenmesi (Dixon ve Reed Kuralı):

Kadın;

$$R \text{ aralığı} \quad 49,0-6,3=42,7$$

$$D \text{ aralığı} \quad 49,0-46,9=2,1$$

$$D/R = 2,095/42,739 = 0,05$$

$D/R < 0,33$ olduğu için değer hesaba alındı.

Erkek;

$$R \text{ aralığı} \quad 63,7-10,73=52,92$$

$$D \text{ aralığı} \quad 63,7-61,5=2,2$$

$$D/R = 2,2/52,9 = 0,041$$

$D/R < 0,33$ olduğu için değer hesaba alındı.

Aşırı uç değer bulunmadı.

Kolmogorov Smirnov analizine göre kadın, erkek ve tüm grubun dağılımları normal dağılım gösterdi (tüm grup, $p=0,09$; kadın v erkek, $p=1,05$).

Erkek ve kadın dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (F-test, $p=0,037$).

Erkek ve kadın referans değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olan anlamlı fark bulundu (Student t-test, $p=0,041$).

Tablo 4.28 Referans birey gruplarının hesaplanan alt ve üst sınırları

	n	Alt sınır (%90 GA):	Üst sınır (%90 GA):
Erkek	40	10,8 (10,7-14,5)	63,5 (55,2-63,7)
Kadın	40	6,3 (6,27-9,7)	48,9 (39,2-49,0)
Tüm	80	6,77 (6,26-10,9)	61,32 (48,9-63,6)

Çalışma grubunun ölçülen kalsiyum ve PTH değerleri Tablo 4.29'da izlenmektedir.

Tablo 4.29 Çalışma grubunun kalsiyum ve PTH değerleri

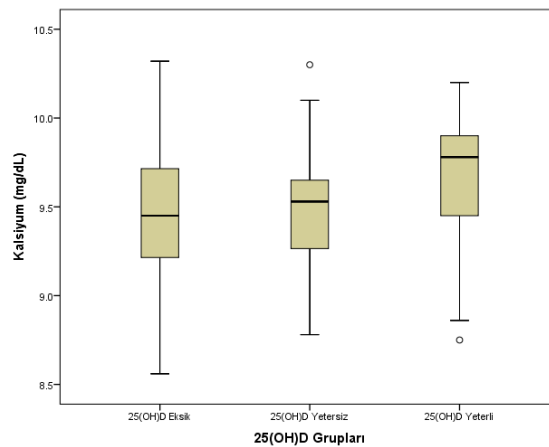
	n	2.5 percentil	97.5 percentil	SD	Min-Maks	Üretici Ref Aralık
Ca²⁺ (mg/dl)	80	8,8	10,3	0,401	8,5-10,3	8,6-10,0
PTH pg/ml	80	16,1	56,2	8,75	15,5-57	15-65

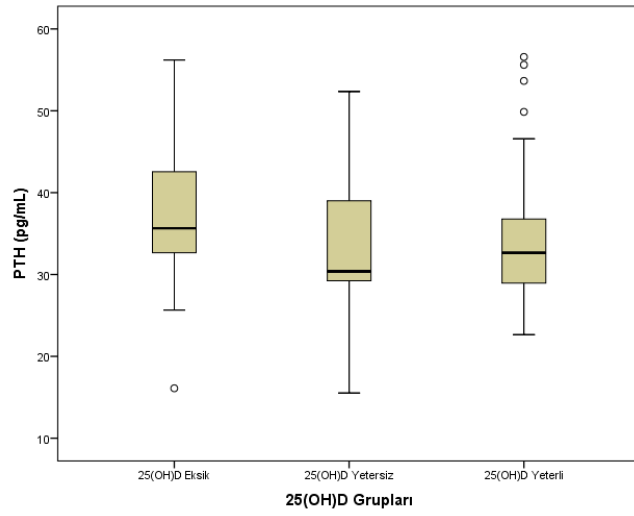
Tablo 4.30'da 25(OH)D gruplarının kalsiyum ve PTH değerleri listelenmektedir.

Tablo 4.30 25(OH) gruplarının kalsiyum ve PTH değerleri

	25(OH)D<20 ug/ml (n=34)		25(OH)D 20-30 arasında (n=16)		25(OH)D>30 ug/ml (n=30)	
	Ort(SD)	Min-Maks	Ort(SD)	Min-Maks	Ort(SD)	Min-Maks
Ca²⁺ (mg/dl)	9.5(0.402)	8.6-10.3	9.5(0.385)	8.7-10.3	9.7(0.394)	8.8-10.2
PTH (pg/ml)	38(8.1)	16-56	34(9.3)	15-52	35(9.1)	23-57

D Vitamini eksikliği, yetersizliği ve yeterli olma durumlarına göre ayrılmış grupların kalsiyum ve PTH kutu grafikleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmektedir.

**Şekil 4.8 D vitamini gruplarının kalsiyum düzeyleri (p=0,088)**



Şekil 4.9 D vitamini gruplarının PTH düzeyleri (p=0,074)

5 TARTIŞMA

Yeni satın alınan ölçüm kitlerinin performans özelliklerinin geçerliliğinin rutin uygulamaya sokulmadan önce kanıtlanması yasal mevzuat ve akreditasyon standardının şartlarındandır (ISO-15189 2009, WEB_10). Bu bağlamda, her laboratuvarında ölçüm prosedürlerinin performanslarının geçerliliğinin kanıtlanması ve doğrulanması süreçlerini açıklayan yazılı doküman bulunmalıdır. Laboratuvar geçerliliğinin doğrulanması deneyleriyle ilgili politika belirlemeli ve ortak doğrulama prosedürü yanında her analite ilişkin uygulanması gerekenler için kaynağa erişebilmelidir. Bu alanda deneyimli personeli bulunmalıdır. Türkiye’de bu alanda bilimsel derneklerin kurs kitapları (Aslan vd 2000, Aslan 2007, Aslan 2010, Aslan 2011, Aslan vd 2012) dışında kaynak bulunamadığından ve bu kaynakların çoğunda CLSI Kılavuzlarından yararlanma önerileri bulunduğundan CLSI Kılavuzlarının uygulanma durumu değerlendirildi.

Üretici firmaların daha işbirliği içerisinde bulunmaları ve ilgili yasal kurumların ulusal politikayı belirlemeleri gerektiğini göstermektedir.

Türkiye’de lisan açısından zorlayıcı durum yanında bu kılavuzların dilinin zor anlaşıldığı Klinik Biyokimya alanıyla ilgili çeşitli bilimsel ve meslek derneklerinin bilimsel toplantılarında paylaşılmaktadır. Bu nedenle Türkiye’de çok az laboratuvar CLSI Kılavuzlarından yararlanmaktadır. Çalışmamızda Türkiye’de laboratuvara uyarlanabilecek basamaklar Türkçe olarak geliştirilmiş oldu.

Kılavuz dilinin zor anlaşılması laboratuvar test toplam sürecinin tüm ayrıntılarıyla net öğrenilememiş olmasına bağlanabilir. Kılavuzlar hep aynı sistematik içerisinde hazırlanmaktadır (WEB_1). Toplam test sürecine bütünsel bakış ile yaklaşılması gerekmektedir. Klinik laboratuvarın toplam test sürecine sistematik yaklaşımı kazanmış kişiler tarafından anlaşılması daha kolay olacaktır. Diğer konu, kılavuzlar matematiksel hesaplamalara odaklanmaktadır ve yoğun matematiksel işlemleri kapsamaktadır. Çünkü CLSI’nin politikası ticari bir hesaplama ya da istatistik programa gönderme yapmamaktır. Aslında bu hesaplamalar istatistiksel programlarla da yapılmaktadır

Çalışmamızda matematiksel hesaplamalar gösterilmektedir. Excel’de yerleştirilen formüllerle çok kolaylıkla yapılabildiği kanıtlanmıştır.

Çalışmamız anlaşılması zorlayıcı olduğu vurgulanan kılavuzların daha anlaşılır olmasını sağlaması yanında Türkçe olarak hazırlanmasını da sağladı. Kılavuzlarda deney uygulama basamakları yanında ön hazırlıklar ve hesaplamalarla ilgili tüm bilgiler açıklanmaktadır. Deney öncesi, deney ve deney sonrası tüm basamaklar sistematik bir şekilde planlandı. Süreç yaklaşımıyla, girdiler, deneyde kullanılacak cihaz ve ölçüm kitlerinin kararlılığı ve kalite kontrolü, deney koşulları ve tüm faaliyetler başlıklar halinde listelendi. Hesaplamalar için tablolar hazırlandı. Hesaplamaların başarılı olduğunun kanıtlanması için kılavuzlardaki formüller MS Excel'de oluşturuldu ve kılavuz örnekleriyle aynı sonuçların elde edilmesi sağlandı. Hesaplamaların uygun olanları SPSS İstatistik Programında gerçekleştirildi. Bu bağlamda sonuçlarda yanlışlık olma riski kaldırıldı.

D Vitaminini seçmemizin nedeni, D vitamini ölçüm sonuçlarının standardizasyonu çalışmaları devam etmekteydi (Singh 2008, Binkley ve Sempos 2017). Kemikle ilgili bozukluk ve hastalıklar yanında çeşitli bozukluk ve hastalıklarda rol oynaması ve dünya genelinde sağlıklı kişilerde düşük bulunması da ölçüm prosedürünün doğruluğunun kanıtlanmasında seçilme nedenlerindendi (Cavalier ve Souberbielle 2018).

Her ölçüm prosedürü performans özelliğinin doğrulanması deneyleriyle ilgili değerlendirmeler yapıldı. Kesinlik doğrulanmasında analiz materyalleri olarak kontrol materyalleri ve önceden ölçülmüş hasta materyalleri havuzları önerilir. Her ikisinin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (CLSI-EP15A2E 2005).

Kontrol materyallerinin Türkiye'de üretilmiyor olması diğer önemli sorunlardan birisidir. Bir üniversite biyokimya laboratuvarında yaklaşık 150-200 arasında analit ölçüldüğü düşünülürse geçerliliğin doğrulanması deneyleri için materyal satın alınması çok masraflıdır. Konsantrasyonları belirlenmiş kontrol materyalleri daha pahalıdır. Yasal kolaylık bulunmadığından yüksek gümrük vergisi ödenmektedir. Çoğu İstanbul, Ankara ve İzmir'den girişli olduklarından Türkiye'deki diğer illerdeki laboratuvarlar daha yüksek bedel ödedikleri gibi bu süreç zaman alıcı olmaktadır.

Özellikle insan materyali yerine geçebilecek ("commutable") kontrol materyali bulmak hem zorlayıcı hem de pahalıdır. Aynı zamanda bu tür doğrulama deneyleri için gereken materyallerin yurt dışından getirilmesinde kolaylaştırıcı bir yasal mevzuat bulunmadığından çok fazla masraf yanında yurt içerisine sokulmasında zaman alıcı ve masrafı artırıcı zorluklar yaşadık. Yasal mevzuatta ve kalite standartlarında (Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü 2016) her test için uygulanması şartı bulunduğu dikkate alındığında ne kadar sorun yaşanabileceği dikkate alınmalıdır.

Hesaplamalar oldukça bilgi ve beceri gerektirmektedir.

Kesinlik doğrulama deneylerinde ölçülecek materyal olarak daha önce ölçülmüş örneklerden havuzlar oluşturulabilmektedir. Bu durumda da hastalardan alınan

örneklerde analitin kararlılığı gündeme gelmektedir (CLSI-EP15A2E 2005). Ancak çalışmamızda tıbbi karar sınırlarına uygun sağlıklı ve hasta örneği hazırlamakta zorluk yaşadık. Hazırladığımız hasta havuzlarında D Vitamini ölçümlerinde yeterli sonuç alamadık, bazı hasta örnekleri ile ölçüm prosedürleri arasındaki spesifiklikte farklılık veya diğer nedenlerden dolayı farklılıklar beklenmedik şekilde farklılık gösterebilmektedir (CLSI-EP15A2E 2005). İnsan materyalleriyle kesinlik doğrulanması masraf gerektirmemekte ancak D Vitamininde de gözlemlendiği gibi 5 gün içerisinde ölçüm sorunlarının yaşanmasına neden olabilmektedir. Beş günde ardışık üçer ölçüm yapılması reaktif harcanması dışında zaman açısından zorlayıcı değildir. Kesinlik deneylerinin beş gün içerisinde yapılması zorlayıcı değildir. Ancak çok yoğun olan laboratuvarların bu konuda da bazı engeller olabilmektedir (Arneson ve Arneson 2013).

EP15-A2 Kılavuzu kesinlik doğrulanması deneyleri gerçekleştirilirken gerçeklik doğrulanması deneylerinin de gerçekleştirilmesini önerir. Kontrol materyalleri sekonder referans malzemesi veya güvenilirliği (kararlılığı, ölçüm sonucunun geçerliliği, vb.) sağlanmışsa geri kazanım hesaplamalarıyla değerlendirilebilir. Tablo 4.10'da gözlemlendiği gibi EP15-A2'nin önerdiği gerçeklik doğrulanmasında başarılı olundu. Gerçekliğin doğrulanmasıyla ilgili Türk Biyokimya Derneği Merkez ve İzmir Şubesinin yürüttüğü eğitim kursları ve bu kurs kitaplarının (Aslan vd 2000, Aslan 2007, Aslan 2010, Aslan 2011, Aslan vd 2012) dışında ulusal politikayı ve uygulamaları açıklayan kılavuzlar bulunmamaktadır. Bu nedenle iki CLSI Kılavuzu referans alındı. Gerçekliğin doğrulanması EP15-A2 önerisine göre satın alınan ve konsantrasyonları belirli olan kontrol materyalleriyle gerçekleştirilen deneylerde doğrulanmıştır.

CLSI EP15'e göre gerçeklik değerlendirilmesinde diğer yaklaşım birisi karşılaştırma deneyleridir. EP09-A2-IR Hasta Örnekleriyle Yöntem Karşılaştırılması ve Bias Hesaplanması Kılavuzuna göre hasta örnekleriyle de karşılaştırma deneyleri gerçekleştirildi. D vitaminiyle ilgili araştırma sonuçları insan örneklerinde ölçümlerde zorlayıcıları vurgulamaktadır (Carter 2012). Bu nedenle biz de bu yolu denemeye karar verdik.

Bu yöntemde, aynı örnek ikiye ayrılır güvenilir bir yöntem ile karşılaştırma yapılır (Holick 2009, Shin vd 2013, Cavalier ve Souberbielle 2018). Yöntemimizi LC-MS/MS yöntemiyle karşılaştırdık. İki yöntemle elde edilen 25(OH)D3 ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Regresyon istatistiğine göre $n=31$, $25\text{OHVitD3(HPLC)}=-1,61+1,39(\text{LC-MS/MS})$, $r=0,976$, $Sy/x=6,03$ ve üç KKM için %biaslar %13, %24, %27 olarak hesaplandı. Dağılım uygun bulundu ($0,976>0,975$). Vitamin D analitinin doğru ölçülmesinde LC-MS/MS ve HPLC yöntemlerinin tercih edilmesi gerektiği savunulmaktadır (Lensmeyer vd 2006).

Sertifikalı materyal ile kolaylıkla yürütülmesine karşın sertifikalı materyallerin ülkemizde bulunması ve satın alınması oldukça zorlayıcıdır. Ülkemizde Ulusal Metroloji Enstitüsü'nün ürettiği az sayıda referans materyalden (WEB_9) başka tıbbi laboratuvar ölçümlerine yönelik sertifikalı referans materyal bulunmadığı gibi iç kalite kontrol ve dış kalite değerlendirme programları için üretilen materyaller de bulunmamaktadır. Bu nedenle yurt dışından satın almak zorunda kalındı. Harcamanın yüksek olması yanında bu tür araştırmalara yönelik ulusal gümrük politikası ve kolaylaştırıcı yasal mevzuat bulunmadığı için gümrükten çekilmesi de zorlayıcı oldu. İçindeki konsantrasyonu ölçülmüş materyal daha pahalıdır. Gerçeklik doğrulanması deneyleri olduğu için konsantrasyonları saptanmış materyal kullanmak zorundaydık.

Karşılaştırma deneylerinde hem test yöntemi hem de referans yöntemde değerlendirme sürecinde ölçüm prosedürlerinin kalite kontrol sonuçlarının toplanması gereklidir. Karşılaştırma deneylerinde konsantrasyonların rapor edilebilir aralığa yayılmış en az 40 birey örneği olması şartı kısa sürede zorlayıcıdır. Kılavuzun önerisi olan örneklerin toplandığı gün analiz edilmesi, bu açıdan gerçekleştirilememiştir. Test yöntemi HPLC, karşılaştırma yöntemi olarak LC-MS/MS seçilmiştir (Lensmeyer vd 2006). Test yöntemi ile referans yöntemi kullanan laboratuvarların farklı şehirlerde bulunması çalışmamızı zorlamıştır. Kendi prosedürümüzün kalite kontrol sonuçlarını elde etmemizde karşılaştırma yöntemine ilişkin çalışma prosedürü, kontrol sonuçları gizlilik ilkesi öne sürülerek hizmet aldığımız laboratuvar tarafından sağlanmadı. Ölçüm tekniği olarak kullandığımız HPLC hem yetkin personel gerektiren hem de zahmetli bir tekniktir (Saenger vd 2006).

Sertifikalı referans materyallerin tekrarlanabilirlik deney sonuçlarından t-istatistiği ile doğrulama aralığı %99 hesaplanmıştır. Yöntem karşılaştırma ile hesaplanan % bias değerleri yüksek bulunmuştur. Diğer bir çalışma da korelasyon katsayısı (r^2)'nin 0,99'dan büyük durumunda yöntemin doğrusallığını kabul etmiştir (Ouweland vd 2010). Gerçekliğin doğrulanması için hem yetkinlik hem de ileri istatistik bilgisi gereklidir, her laboratuvarın kendi koşullarında bunu doğrulaması zorlayıcıdır.

Rapor edilebilir aralığın doğrulanması deneylerinde "CLSI-EP06-AE: Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi: İstatistiksel Yaklaşım)" kılavuzu referans alınmıştır. Diğer doğrulama deneylerinde belirtildiği gibi Türkiye'de rapor edilebilir aralığın doğrulanması ile ilgili Türk Biyokimya Derneği kursları ve kurs kitapları haricinde ulusal politikaya dayalı kolaylaştırıcı yasal mevzuat veya kılavuz gibi dokümana rastlanmamıştır.

Deney materyali olarak bir ticari kontrol materyalinin dilüsyonu, satın aldığımız 3 farklı düzey kontrol materyalinin belirli oranlarda karıştırılması ile elde edilen deney materyalleriyle gerçekleştirildi. Kılavuzda laboratuvar için önerilen örnek sayısı 5-7'dir.

Vitamin D'nin rapor edilebilir aralığı geniş olduğu için 8 örnek hazırladık. Klinik olarak önemli kararların alındığı konsantrasyonlarda hazırlanmalıdır.

Kılavuzun uygulama maddelerine göre, doğrusallık kesinlik ve gerçeklik durumlarından mümkün olduğunda izole şekilde değerlendirir ki, bu da zayıf kesinliğin doğrusallığın değerlendirilmesindeki etkisini azaltan bir yaklaşımdır. Böylece, zayıf tekrarlanabilirliğin kontrolü bu deneyin içindedir. Doğrusallık değerlendirme deneylerinde serum, plazma, idrar vb. gibi örnekler analiz edilebilir ve bu deneyler, non-linear hata için hedefleri belirlemede gereklidir.

Kılavuzda da belirtildiği üzere, doğrusallığın belirlenmesi için farklı deneysel metotlar bulunmaktadır. Deneysel veriye karşı polinomial eşitlik çeşitlerini test eden Kroll ve Emancipator Yöntemi, bu yöntemin avantajı sıkı bilimsel prensiplere dayalı sağlam bir metot olmasıdır. Bu yöntem Kroll, Praestgard, Michaliszyn ve Styer ve Amerikan Patolojistleri Koleji'nde (CAP) laboratuvarlar arası karşılaştırma programı ile iyileştirilmiştir. Krouwer ve Schain de çizginin son noktası (LOP) metodunu kullanarak genel bir yöntem teklif etmişlerdir. Tholen, hedef talep yüzdesine uyumsuzluk regresyonunun grafiksel değerlendirilmesini sunmuştur. EP6-A Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi Kılavuzu polinomial metot kullanmaktadır. Doğrusallığın polinomial değerlendirmesi, doğrusallığın bozulduğu noktayı ele almaktadır. Geri kazanım deneylerinde cihazda yetkinlik gereklidir, bunun için üretici firmanın eğitimlerine katılmalıdır. Analizi yapılacak örneğin de klinik testlerde kullanılan ile benzer özelliğe sahip olması gerekir. Kontrol materyali ve hasta havuzundan yararlanılabilmektedir. Örneklerin bilinen tüm girişimlerden arındırılmış olması önemlidir (CLSI-EP06AE 2003).

Tek bir analit için tüm sonuçlar aynı gün analiz edilmelidir. Her bir test için beş ve daha fazla dilüsyon noktalı konsantrasyonlar hazırlanır çünkü beşten az olursa sigmoid şekilli, doğrusal olmayan bir eğri ile bir regresyon ile kaçırabilir (Jhang vd 2004). Her nokta için çift ölçüm yapılır. Dilüsyon noktaları hazırlarken insan kaynaklı hata oranı yüksektir. Malzemeler uygun şekilde hazırlanmamış ve saklanmamışsa analit miktarı bozulabilir, yanlış pipet kalibrasyon sonucu sistematik hata ortaya çıkabilir. Bu durum da uzman ve yetkin personel gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Her noktaya karşılık elde edilen verilerin % uygunluğu ve çizilen grafiğe göre yöntemin doğrusallığının görsel değerlendirilmesi öznel ve zayıf tekrarlanabilirdir (Jhang vd 2004). Bir testin doğrusallığını değerlendirmek için birincil, ikincil ve daha yüksek dereceli polinomları karşılaştırmak için CAP bir verifikasyon yöntemi geliştirmiştir, bunun kullanımı kolaylık sağlamaktadır (WEB_2). Aksi halde bu hesaplamalar zorlayıcıdır.

Referans aralığın geçerliliğinin doğrulanması deneyleri CLSI-C28A3cE Klinik Laboratuvarlarda Referans Aralığın Belirlenmesi, Hesaplanması ve Doğrulanması Kılavuzuna göre yapılmıştır. Buna göre; tıbbi ya da bilimsel literatürlerden analitik interferanslar ve biyolojik değişkenliklerin listesi çıkarılmalıdır. Dışlama ve katma kriterleri için anket formu hazırlanmalıdır. Bunun için literatür taramasının iyi yapılması gereklidir. Referans aralık çalışmasına dahil edilecek bireyler için anket doldurulmalıdır. Bu, kişiler için zaman alıcı bir faaliyet olduğunda bu noktada zorluklarla karşılaşılabilir. Çalışmaya ilişkin etik kurul izni alınmalıdır, gerekli izinlerin alınması bürokrasiden kaynaklı uzun süreli olabilir. Bu da çalışmanın süresini arttırabilir. Potansiyel referans bireyler anket sonuçlarına göre kategorilendirilmelidir. Buna göre dışlama kriterleri ve sağlıklı olmama durumları değerlendirilerek çalışmaya dahil edilmeyecek referans bireyler belirlenir.

Referans birey belirlerken kılavuzda önerilen referans birey belirleme formuna 25(OH)Vitamin D₃ özelinde sorular ilave edilmiştir. Gönüllülerin, diyetle D vitamini takviyesi almıyor olmamasına dikkat edildi. Diyet alımı, D₂ vitamininin tek kaynağıdır. Birçok D vitamini özellikle vitamin D₂ içermektedir. İlave D₂ ve D₃ vitaminleri analitik belirsizliklerin kaynağı (diğer metabolitlere karşı girişim antikorumları ve çapraz reaktivite matriks etkisi) olarak kabul edilmektedir (Shin vd 2013). Güven limitleri içerisinde kalacak şekilde referans birey sayısına karar verilir. Bunun sayısı da 40'tır. Örnek toplama, seçilen tüm bireyler için aynı tutarlılıkta ve şartlarda gerçekleştirilmelidir. Tüm örnekler ilgili analitik metodolojiye uygun şekilde depolanmalıdır. Daha önce ölçümü yapılmış örnekler bu çalışma için kullanılamaz bu da çalışmanın uzun süreli ve dikkat gerektirdiğinin kanıtıdır.

Referans aralık transferi çalışması yanında popülasyonumuzdaki D vitamini durumunu saptayabilmek ve diğer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırmak için sağlıklı 40 kadın ve 40 erkek bireyden kan alındı. Sağlıklı birey bulunması ve örneklerin toplanması zaman alıcıydı. Doğrulama deneylerinin kısa sürede (5 gün) bitirilmesi gerektiği için referans aralık transferi için laboratuvarın "kontrole gelen bireyler", "operasyon için kontrol testleri istenen bireyler" ve "kan vericiler" den oluşan bir grup oluşturması yararlı olabilir.

Çalışmamızda 25(OH)Vitamin D seçilmesinin sebebi, henüz standardize olmamış bir yöntem olmasıdır. Mevcut yöntemler arasında HPLC, düşük verimden yüksek verime RIA, otomatik kemilüminesans immünoassay ve LC-MS/MS yer alır. Bu yeni yöntemler halihazırda tartışmalara yol açmıştır. İmmünoassay ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki korelasyon çalışmaları bir kaç araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmalar şeffaf ve iyi anlaşılır olmadığından, makul korelasyonları önemli farklılıklarla rapor edilmiştir (Singh 2008).

Toplam 25(OH)Vitamin D, 25(OH)VitaminD₃ artı 25(OH)VitaminD₂ konsantrasyonlarının toplamıdır. Bu tanımın, D₃ (kolekalsiferol) ve D₂ (ergokalsiferol) vitaminlerinin biyolojik olarak aynı değerde olduğunu anlaşılmaktadır. Toplam 25(OH)Vitamin D konsantrasyonu, Amerika Birleşik Devletleri'nde, mililitre başına nanogram birimi (ng/ml) ve başka bir yerde litre başına nanomol birimi (nmol/l) cinsinden rapor edilir; ng/ml, aşağıdaki formülü kullanarak yaklaşık olarak nmol/l'ye dönüştürülebilir: ng/mlx2,5=nmol/l (WEB_10).

Son yıllarda 25(OH)Vitamin D ölçümünde bir artış vardır. Daha çok metabolik kemik hastalığına yakalananlarda 25(OH)Vitamin D'nin rolü klinik olarak değerlendirilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü de, 20 ng/ml (50 nmol/l) altındaki D vitamini düzeylerini yetersizlik ve 10 ng/ml (25 nmol/l) altındaki D vitamini düzeylerini de eksiklik olarak tanımlamıştır (Vurgun vd 2016). D vitamini teşhisine ilişkin önerilerde eksikler ortaya çıkmış ve dolaşımdaki D vitamini konsantrasyonunu tanımlama konusunda önemli tartışmalar olmaktadır. Toplam 25(OH)Vitamin D ölçümünde kullanılan yöntemlerde önemli farklar vardır. Bazı yayınlar 25(OH)VitaminD₂ ölçümünde bazı yöntemlerde yetersizlikler olduğunu ortaya koymuştur (Roth vd 2008).

Kimyasal yöntemler kromatografik ayırmaya dayanır ve bunu immünolojik olmayan doğrudan saptama izler. Kimyasal metotlar ultraviyole (HPLC-UV) saptama ile doğrudan yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi (LC/MS) ile kombine edilmiş sıvı kromatografiyi içerir. Bu yöntemler arasındaki temel fark, HPLC ve LC/MS'nin 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃'ü ayrı ayrı ölçebilmeleridir (Hutchinson vd 2017). Bazı LC-MS/MS yöntemlerinde biyolojik olarak inaktif bir izomer olan 25(OH)Vitamin D₃'ün C-3 epimerik formu da saptanmıştır (Chouiali vd 2017).

Her laboratuvar için LC-MS/MS prosedürleri uygun olmayabilir. C-3 epimerik formunun LC/MS yönteminde saptanması ve bunun yanı sıra 24,25(OH)D₂'nin immünoassay yöntemle saptanması ne yazık ki çözülemeyecektir (Cavalier vd 2014, Hutchinson vd 2017).

Sağlıklı bireyler, hamileler, çocuklar, hemodiyaliz hastaları, yoğun bakım hastaları gibi farklı popülasyonlardaki sonuçların karşılaştırılabilirliği halen devam etmektedir (Cavalier ve Souberbielle 2018). Son yıllarda kronik böbrek hastalığı ve de paratiroid hormon (PTH) konsantrasyonuyla korelasyonu için de 25(OH)Vitamin D ölçümleri talep edilmektedir (Fraser 2009).

CLSI Kılavuzları hesaplama formüllerini yayınlamayı tercih etmektedir (CLSI-C28A3cE 2008, CLSI-EP06AE 2003, CLSI-EP09A2IRE 2010, CLSI-EP15A2E 2005). Ancak bu formüller kullanılarak yapılan hesaplamaların sonuçları MS Excel hem de SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Statistics Programı ile yapılan

sonuçlarla karşılaştırılarak laboratuvarda sistemin kurulmasında yararlı olmaktadır. Bu hesaplamalar için laboratuvarda bu hesaplama programlarını etkili kullanabilecek elemana gereksinim olduğu dikkat çekilmesi gereken bir durumdur (Sahillioğlu vd 2011).

D Vitamini örneği ise toplam 25(OH)Vitamin D ölçümünde kullanılan yöntemlerde önemli farkların olduğu durumların dikkat gerektirdiğine işaret etmektedir.

Referans değer verileri iyi incelenmeli ve veri dağılımları değerlendirmek için histogramlar Dixon ve Reed kurallarına göre çizilmelidir. Bu da uzmanlık gerektiren bir konudur.

6 SONUÇ

1. Tıbbi (klinik) laboratuvarlarda satın alınan ölçüm (kitlerinin) prosedürlerinin performans özelliklerinin kendi laboratuvar koşullarında geçerliliği doğrulanmalıdır. Bu doğrulama prosedürlerinin nasıl yapılacağını gösteren ulusal bir kılavuz bulunmamaktadır. Dünyada yaygın kullanılan ABD CLSI Kılavuzları temel laboratuvar matematiği ve istatistiği bilgileri ve bilgisayar programları (MS Excel ve İstatistik yazılım paketleri, vb.) kullanma bilgileri ve becerileri bulunan personel ile her laboratuvarda uygulanabilir.
2. Türkiye’de tüm klinik laboratuvarlara uygulanabilecek ölçüm prosedürü geçerliliğinin doğrulanması kılavuzları Türkçe olarak hazırlandı:
 - a. Tekrarlanabilirliğin doğrulanması süreç yönetimi
 - b. Gerçekliğin doğrulanması süreç yönetimi
 - c. Rapor edilebilir aralığın doğrulanması süreç yönetimi
 - d. Referans aralığın doğrulanması süreç yönetimi
3. Tıbbi laboratuvarlarda ölçüm prosedürleri geçerliliğinin doğrulanması deneylerinin en zorlayıcı yönü kalite kontrol materyallerinin Türkiye’de üretilmediği için pahalı olması ve bulunmasının zor olmasıdır.
4. Standardizasyonu sağlanmamış olan D Vitamini ölçüm prosedürünün seçilmiş olması bu tür testler için ulusal politikanın geliştirilmesi gerektiğini gösterdi.
5. Klinik laboratuvarlarda şart olan ölçüm prosedürü geçerliliğinin doğrulanması için ulusal politika yapıcılarının kolaylaştırıcı yollar sağlaması gerekmektedir.
6. Sağlıklı popülasyonda ölçülen D Vitamini referans sınırlarının alt düzeyi dünyada gözlemlendiği gibi düşük bulundu. Buna göre hasta raporlarında klinik kılavuzların önerilerine göre değerlendirilmesi önerilmektedir.

7 KAYNAKLAR

Arneson WL, Arneson DL. Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. **Lab Med**2013; 44(1):e38–e42.

Aslan D, Semra G, Gül G, Pınar T. Klinik Laboratuvarlarda Yöntem Seçimi, Değerlendirilmesi ve Laboratuvara Uygulanması, **Turk J Biochem**, İzmir, 2000, s.119.

Aslan D. Klinik Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi, **TSE Stan Eko Tekn**2007:78-87.

Aslan D. Klinik Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi Kurs Kitabı (Olguya Dayalı), **Turk J Biochem**, İzmir, 2010, s.171.

Aslan D, TS EN ISO 15189 ve Klinik Laboratuvarlarda Akreditasyon Kurs Kitabı, **Turk J Biochem**, İzmir, 2011,s.83.

Aslan D, Akan P, Arslan B, Akyürek Ö, Demir S, İnal TC, Üstüner F. Referans Aralıkları Hesaplama Kursu Kitabı (Olguya Dayalı), **Turk J Biochem**, Ankara, 2012, s.82.

Atef SH. Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges. **J Steroid Biochem Mol Biol**2018; 175: 136–137.

Bakır F, Laleli Y. TS EN ISO / IEC 17025 Kapsamında Akreditasyona Teknik Hazırlık. **J Biochem**2006; 31: 96–101.

Betz JM, Brown PN, Roman MC. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. **NIH** 2011; 82(1): 44–52.

Binkley N, Ramamurthy R, Krueger D. Low vitamin d status: definition, prevalence, consequences, and correction. **Rheum Dis Clin North Am** 2012; 38(1): 45–59.

Binkley N, Sempas CT. Standardizing Vitamin D Assays: The Way Forward. **J Bone Miner Res**2017;29(8), 1709–1714.

Burnett D,Ceriotti F,Cooper G, Parvin C, Plebani M, Westgard J. Collective Opinion paper on Findings of the 2009 Convocation of Experts on Quality Control. **CCLM** 2010; 48(1):41-52.

Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D: A Difficult Analyte. **Clin Chem** 2012; 58(3): 486-488.

Cavalier E, Carlisi A, Bekaert AC, Rousselle O, Chapelle JP, Delanaye P. Analytical validation of the Liaison Calcitonin_II-Gen (DiaSorin). **Clin Chem Lab Med** 2010; 49(2): 271–275.

Cavalier E, Lukas P, Crine Y, Peeters S, Carlisi A, Le Goff C, Gadisseur R, Delanaye P, Souberbielle JC. Evaluation on Automated Immunoassays for 25(OH)-vitamin D Determination in Different Critical Populations Before and After Standardization of the Assays. **Clin Chim Acta** 2014; 431: 60–65.

Cavalier E, Souberbielle J. Vitamin D and its metabolites : from now and beyond. **JIFCC**2018; 29: 105–110.

Champe PC, Harvey RA.. *Lippincott's Illustrated Rewiews Serisinden: Biyokimya*, Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E (Eds.), **Nobel Tip Kitabevleri**, Istanbul,1997, s.438.

Chouiali A, Mallet PL, Fink G, Biron S, Langlois MF. Comparision of two methods for measuring 25-OH vitamin D in the follow-up of patients after bilio-pancreatic diversion bariatric surgery. **Clin Biochem** 2017; 50(4–5): 210–216.

Clinical and Laboratory Standards Institute, "Defining , Establishing , and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory ; Approved Guideline — Third Edition", **CLSI C28A3cE**, USA, 2008; s.61.

Clinical and Laboratory Standards Institute, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods ; Approved Guideline — Second Edition", **CLSI-EP05A2E**, USA, 2004; s.39.

Clinical and Laboratory Standards Institute, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures : A Statistical Approach ; Approved Guideline", **CLSI-EP06AE**, USA, 2003; s.47.

Clinical and Laboratory Standards Institute, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples ; Approved Guideline - Second Edition (Interim Revision)", **CLSI-EP09A2IRE**, USA, 2010; s.56.

Clinical and Laboratory Standards Institute, "User Verification of Performance for Precision and Truiness; Approved Guideline Second Edition", **CLSI-EP15A2E**, USA, 2005; s.49.

Ehrmeyer SS. Satisfying Regulatory and Accreditation Requirements for Quality Control. **Clin Lab Med** 2013; 33: 27–40.

European Commission, "Directive 98/78/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on the Supplementary Supervision of Insurance Undertakings in an Insurance Group". **EC Official Journal of the European Communities**, 1998, s.12.

Fidan F, Alkan BM, Tosun A. Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği. **Türk Osteoporoz Dergisi** 2014; 20: 71–74.

Fraser CG. Biological Variation: From Principles to Practice. **AACC Press**, Washington, 2001, s.151.

Fraser WD. Standardization of vitamin D assay: art or science? **Ann Clin Biochem** 2009; 46(1): 3-4.

Galior K, Ketha H, Grebe S, Singh RJ. 10 years of 25-hydroxyvitamin-D testing by LC-MS/MS-trends in vitamin-D deficiency and sufficiency. **Bone Rep** 2018: 268–273.

Gören AC, Bilsel G, Bilsel M. Rapid and simultaneous determination of 25-OH-vitamin D 2 and D 3 in human serum by LC/MS/MS: Validation and uncertainty assessment. **J. Chem. Metrl** 2007; 1: 1–9.

Harrison M, Davidson J, Lu Z, Morris H, Schneider H, Glendenning P. Use and Interpretation of Vitamin D testing. **RCPA** 2016; 1: 1–7.

Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 Routine 25-Hydroxyvitamin D Assays: Influence of Vitamin D Binding Protein Concentration. **Clin Chem** 2012; 58(3): 543-548.

Holick MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation And Clinical Application. **NIH Public Access** 2009; 19(2): 73–78.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Weaver CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab** 2011;96(7): 1911–1930.

Hollis BW, Editorial : The Determination of Circulating 25-Hydroxyvitamin D No Easy Task. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89(7): 3149–3151.

Hollis BW, Wagner CL. The Role of the Parent Compound Vitamin D with Respect to Metabolism and Function: Why Clinical Dose Intervals Can Affect Clinical Outcomes. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98(12): 4619–4628.

Horst RL. Exogenous versus endogenous recovery of 25-hydroxyvitamins D2 and D3 in human samples using high-performance liquid chromatography and the DiaSorin LIAISON Total-D Assay. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2010; 121(1–2): 180–182.

Hutchinson K, Healy M, Crowley V, Louw M, Rochev Y. Verification of Abbott 25-OH-vitamin D assay on the architect system. **Prac Lab Med** 2017; 7(2017): 27–35.

Jhang JS, Chang CC, Fink DJ, Kroll MH. Evaluation of Linearity in the Clinical Laboratory. **Arch Pathol Lab Med** 2004;128(1); 44–48.

Lai JKC, Lucas RM, Banks E, Ponsonby AL. Variability in vitamin D assays impairs clinical assessment of vitamin D status. **J Intern Med** 2012; 42(1): 43–50.

Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays. **Clin Chem** 2006; 52(6): 1120-1126.

Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D 3 is present in adult serum. **J Clin Endocrinol Metab** 2012, 97(1): 163–168.

Li L, Zeng Q, Yuan J, Xie Z. Performance evaluation of two immunoassays for 25-hydroxyvitamin D. **J Clin Biochem and Nutr** 2016; 58(3): 187–192.

Medical Advisory Secretariat. Clinical Utility of Vitamin D Testing, **Ontario Health Technology Assessment Series**, Toronto, 2010, s93.

Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. **Turk J Biochem** 2008; 6(1): 23–31.

Poduje S, Sjerobabski-Masneć I, Ozanić-Bulić S. Vitamin D-the true and the false about vitamin D. **Coll Antropol** 2008; 32(2): 159–162.

Rabenau HF, Kessser HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A.. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. **J Clin Virol** 2007; 40(2): 93–98.

Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography–tandem mass spectrometry as a reference. **Ann Clin Biochem** 2008; 45(2): 153–159.

Saenger AK, Laha TJ, Bremner DE, Sadrzadeh SMH. Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D₂ and D₃ Using HPLC–Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency. **Am J Clin Pathol** 2006; 125(6): 914–920.

Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Sağlıkta Kalite Standartları Hastane, **Sağlıkta Kalite ve Akreditasyon Daire Başkanlığı**, Ankara, 2016,s.461.

Sahillioğlu B, Serdar MA, Erkal N, Erden G, Bakır F, Yıldırımkaaya MM, Özüğuz U. 25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntm Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. **Turk J Biochem** 2011; 36(1): 73–79.

Saliba W, Ofra B, Rennert HS, Lavi I, Rennert G. The relationship between serum 25(OH)D and parathyroid hormone levels. **Am J Med** 2011; 124(12): 1165–1170.

Shin SY, Kwon MJ, Song J, Park H, Woo HY. Measurement of serum total vitamin D (25-OH) using automated immunoassay in comparison with liquid chromatography tandem-mass spectrometry. **J Clin Lab Anal** 2013; 27(4): 284–289.

Singh RJ. Are Clinical Laboratories Prepared for Accurate Testing of 25-Hydroxy Vitamin D **Clin Chem** 2008; 54(1): 221–222.

Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. **Clin Chim Acta** 2009; 408(1–2): 8–13.

Van den Ouweland JMW, Beijers AM, Demacker PNM, Van Daal H. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. **J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci** 2010; 878(15–16): 1163–1168.

Vurgun E, Evliyaoğlu O, Yıldırım S. Evidence-based laboratory: Determining the insufficiency level of vitamin D. **Haseki Tıp Bülteni** 2016; 54(2): 76–82.

WEB_1. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü internet sitesi. <https://clsi.org/>, (son güncellenme tarihi:2019, alındığı tarih:11.02.2019).

WEB_2 Amerikan Patologları Koleji internet sitesi. <https://www.cap.org/laboratory-improvement/accreditation/cap-15189-accreditation-program>, (son güncellenme tarihi:2019, alındığı tarih:11.02.2019).

WEB_3 Türk Akreditasyon Kurumu internet sitesi. <http://www.turkak.org.tr/TURKAKSITE/AkreditasyonAkreditasyonHizmetineYonelikStandartlarVeZorunluDokumanlar.aspx>, (son güncellenme tarihi:31.01.2019, alındığı tarih:11.02.2019).

WEB_4 Centers for Disease Control and Prevention internet sitesi. <https://www.cdc.gov/>, (son güncellenme tarihi:2019, alındığı tarih:11.02.2019).

WEB_5 U.S. Food and Drug Administration In Vitro Diagnostics internet sitesi. <https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/default.htm> (son güncelleme tarihi: 05.07.2018, alındığı tarih 09.09.2018).

WEB_6 UKAS Accreditation Standards internet sitesi. <https://www.ukas.com/about/about-accreditation/the-accreditation-process/accreditation-standards/>, (alındığı tarih 12.06.2018). (2018).

WEB_7 Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) internet sitesi. <https://www.cdc.gov/clia/Regulatory/default.aspx>, (son güncelleme tarihi 11.06.2018, alındığı tarih: 09.09 2018).

WEB_8. Westgard internet sitesi. <https://www.westgard.com/quality-requirements.htm>, (son güncelleme tarihi 2019, alındığı tarih: 02.07 2018).

WEB_9. Ulusal Metroloji Enstitüsü internet sitesi. <http://www.ume.tubitak.gov.tr/>, (son güncelleme tarihi: 2019, alındığı tarih 14.02.2019).

WEB_10. Vücut Dışında Kullanılan (In Vitro)Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği internet sitesi.<http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.10990&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=vücut dışında>, (son güncelleme tarihi:09.01.2007, alındığı tarih:09.09.2018).

Westgard JO. Basic Method Validation (3rd ed.), 1, **Westgard QC**, Madison, 2008, s.313

Yalçın S. "Beslenme, Vitaminler ve Mineraller", İnsan Biyokimyası, 1, Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds.), **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2006, s.573–608.

Zakowski Z. Role of CLSI in Assuring Quality Testing in Clinical Laboratories. **Jalm** 2016; 104-105.

8 ÖZGEÇMİŞ

Berna YILMAZ 1982 yılında Muğla'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Kütahya'da tamamladı. Lise eğitimini Denizli Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Bölümü'nde tamamladı. Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2009 yılına kadar özel sektörde çalıştı. 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında Denizli Büyükşehir Belediyesi Etüt ve Projeler Dairesi Başkanlığı'nda Proje Uzmanı olarak çalışmaya başladı. Ulusal ve uluslar arası projelerde görev aldı, halen bu görevine devam etmektedir.

9 EKLER

EK-1 ISO 15189 Yönetim ve Teknik Şartlar ve ISO 15189 Standardının Ölçüm Prosedürünün Doğrulanmasıyla İlgili Maddeleri

EK-2 Tekrarlanabilirliğin Doğrulanması Süreç Yönetimi

EK-3 Gerçekliğin Doğrulanması Süreç Yönetimi

EK-4 Rapor Edilebilir Aralığın Doğrulanması Süreç Yönetimi

EK-5 Referans Aralığın Doğrulanması Süreç Yönetimi

EK-1 ISO 15189 Yönetim ve teknik şartlar ve ISO 15189 Standardının ölçüm prosedürünün doğrulanmasıyla ilgili maddeleri

ISO 15189 Yönetim ve teknik şartlar

<p>4. Yönetim Gereklilikleri:</p> <p>4.1. Kuruluş ve Yönetim</p> <p>4.2. Kuruluş ve Yönetim Sistemi</p> <ul style="list-style-type: none"> • İç ve Dış Kalite Kontrol Programları • Kalite el kitabı • Cihazların, reaktiflerin, analitik sistemlerin kalibrasyon ve çalışmasının düzenli olarak izlenmesi • Cihazlar ve analitik sistemlerin bakım programlarının oluşturulması <p>4.3. Doküman Kontrolü</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kalite El Kitabı, Prosedürler, Talimatlar, Test Çalışma Talimatları, Dış Kaynaklı Dokümanlar <p>4.4. Sözleşmelerin Gözden Geçirilmesi</p> <p>4.6. Dış Hizmetler ve Malzemelerin Temini</p> <p>4.7. Müşteriye Hizmet/ Danışmanlık</p> <ul style="list-style-type: none"> • Laboratuvar Uzmanları ; Testlerin tekrarlama sıklığı, Numune türü dahil olmak üzere analiz seçimi, Test sonuçları ile ilgili değerlendirme konularında danışmanlık yapmalıdır; <p>4.8. Şikayetlerin Çözülmesi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Laboratuvar, şikayetlerin çözülmesi için bir yol belirlemelidir. • Geri bildirimlerin de toplanması sağlanmalıdır. <p>4.9. Uygunsuzlukların Tanımlanması ve Kontrolü</p> <p>4.10. Düzeltici Faaliyetler</p> <p>4.11. Önleyici Faaliyetler</p> <p>4.12. Sürekli İyileştirme</p> <p>4.13. Kalite ve Teknik Kayıtlar</p> <p>4.14. İç Tetkikler</p> <p>4.15. Yönetimin Gözden Geçirilmesi</p>
<p>5. Teknik Gereklilikler:</p> <p>5.1. Personel</p> <p>5.2. Yerleşim ve Çevre Koşulları</p> <p>5.3. Laboratuvar Donanımı</p> <p>5.4. Analiz Öncesi Prosedürler</p> <ul style="list-style-type: none"> • İstek formlarıyla ilgili prosedür (istek formu hasta ve doktoruyla ilgili yeterli bilgiyi içermeli) • Numune Alma El Kitabı (Hastanın Hazırlanması, Numunenin türü miktarı, Numune alım koşulları, Numune transport şartları • Numune kabul-red kriterleri • Gerekli numune hacimlerinin belirtilmesi <p>5.5. Analiz Prosedürleri</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test çalışma talimatları hazırlanmalı, • Testlerin geçerli kılınma işlemlerinin yapılması sağlanmalı, • Geçerli kılma ve/veya doğrulama verileri saklanmalı, • Ölçüm belirsizlikleri sürekli hesaplanmalı ve izlenebilirliği sağlanmalı, • Test metodunda yapılan değişiklik için, biyolojik referans aralıkları belirli aralıklarla gözden geçirilmeli, • Testin yönteminde yapılan değişiklikler için, laboratuvar hizmetinden yararlananlara bilgi verilmeli. <p>5.6. Analiz Prosedürlerinin Kalitesinin Güvence Altına Alınması</p> <ul style="list-style-type: none"> • Laboratuvar, test sonuçlarının geçerliliğini izlemek için bir yol belirlemelidir. • İç kalite kontrol uygulamaları • Sonuçların izlenebilirliğinin sağlanması • DKD programlarına katılım ve yönetim tarafından değerlendirme <p>5.7. Analiz Sonrası Prosedürler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Yetkili personelin sonuçları gözden geçirip rapor haline getirilmesine onay verilmesi • Primer ve ayrılmış numunelerin depolanması • Analiz için bir daha gerekli olmayacak numunelerin güvenli imhası <p>5.8. Sonuçların Rapor Haline Getirilmesi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kritik değer bildirim prosedürü olmalı • Test geri dönüş süreleri belirlenmelidir

ISO 15189 Standardının ölçüm prosedürünün doğrulanmasıyla ilgili maddeleri

Madde	Açıklama
4.6.2.	Hizmetin kalitesini etkileyen satın alınan donanım ve sarf malzemeleri standart teknik özelliklere veya ilgili prosedürlerde tanımlanan şartlara uygunlukları doğrulanıncaya kadar kullanılmamalıdır
5.3.9.	Uygulanabilir olduğunda, laboratuvarın kontrolü altında olan kalibrasyon veya doğrulama gerektiren donanım, etiketlenmeli veya diğer taraftan kalibrasyon veya doğrulama durumunu ve yeniden kalibrasyon veya doğrulamanın gerekli olduğu tarihleri göstermek için kodlamalıdır
5.3.10.	Donanım, laboratuvarın doğrudan kontrolünden çıktığı veya onarıldığı veya hizmete alındığında, laboratuvar kullanımdan önce donanımın kontrol edildiğinden ve güvenilir şekilde çalıştığının gösterildiğinden emin olmalıdır
5.3.13.	Laboratuvar, kalibrasyonların bir dizi düzeltme faktörlerine sebep olduğu durumda, önceki düzeltme faktörlerinin kopyalarının doğru bir şekilde güncelleştirildiğini değiştirildiğini garanti edecek prosedürlere sahip olmalıdır
5.5.1.	Laboratuvar, numune bölümlerinin seçilmesi/alınması ile ilgili prosedürler dahil, laboratuvar hizmetlerinden yararlananların ihtiyaçlarını karşılayan ve analizler için uygun olan analiz prosedürlerini kullanmalıdır
5.5.2.	Laboratuvar, analiz prosedürlerinin tasarlanan kullanım için uygun olduğunu doğrulamak amacıyla, sadece geçerli kılınmış prosedürleri kullanmalıdır. Geçerli kılınma işlemleri, belirli uygulamanın veya uygulama alanının gerektirdiği kapsamda olmalıdır
5.5.3.	Bütün prosedürler doküman haline getirilmeli ve ilgili personel için çalışma ortamında bulundurulmalıdır
5.5.5	Biyolojik referans aralıkları belirli aralıklarla gözden geçirilmelidir. Laboratuvar, belirli bir aralığın referans gruba artık uymadığı kanısındaysa, düzeltici faaliyeti takiben gerekliyse bir araştırma yapmalıdır.
5.6.3	Sonuçların izlenebilirliğinin sağlanması
7.4.3.	Satın alınan ürünün doğrulanması

EK-2 Tekrarlanabilirliğin Doğrulanması Süreç Yönetimi

Kesinlik Performansının Doğrulanması

ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nin yayınladığı "CLSI EP15-A2 Kesinlik ve Gerçeklik Performansının Kullanıcı Tarafından Doğrulanması (User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline) Kılavuzu"na göre hazırlanan kesinliğin doğrulanması süreci özetlenmektedir (CLSI-EP15A2E 2005).

Kesinliğin doğrulanması deneyi

Amaç: Üretici değerlerinin doğrulanması

Kılavuz: CLSI EP15-A2

Ön hazırlık

Laboratuvarda aday test için kalite kontrol prosedürü oluşturulmalıdır. Doğrulama deneyleri sırasında üreticinin önerilerine göre kalite kontrolün sağlandığı kanıtlanmalıdır. Deneye başlamadan önce laboratuvar görevlileri ölçüm prosedürü eğitimini almış olmalıdırlar.

Gereç

Ölçüm materyali:

1. Kontrol materyalleri (kit için sağlanmış olan iç kalite kontrol materyalleri kullanılmaz)
2. Kalibratör (kit ile sağlanmış olan kalibratör kullanılmaz)
3. Önceden analiz edilmiş hasta örnekleri (dondurulmuş olmamalıdır)
4. Konsantrasyonu bilinen uygun materyal

Kesinlik için ölçümde kullanılan materyal insan örneği matriksine uymalıdır. Örneğin, tam kan için insan tam kanına en yakın olan materyal kullanılmalıdır.

Deney protokolü

1. Süre: 5 gün
2. Günde çalışma sayısı: 1
3. Her çalışmada yapılacak ölçüm: Her konsantrasyondan 3'er ölçüm

Prosedür

1. Günde bir çalışma, her çalışmada her konsantrasyondan üçer ölçüm yapılır.

2. Kalite kontrol sonuçlarına göre çalışma iptal edilecek olursa ek bir çalışma yapılmalıdır.

3. Gerçeklik deneyleri de aynı çalışma gruplarında yapılabilir.

4. Kalibrasyon üreticinin önerilerine göre yapılır. Üretici çoklu kalibrasyon yaptığını belirtiyorsa o zaman deney sırasında tekrar kalibrasyon gerekebilir.

Verilerin (ölçüm sonuçlarının) kaydı

Tekrarlanabilirlik deneyi doğrulama kayıt formu hazırlanır. MS Excel hesaplama tablosunda formüller oluşturulur.

Keskinlik hesaplamaları

Daha önce belirtildiği gibi keskinlik ölçüsü standart sapma (s) ve değişkenlik (%CV) katsayısıdır. Ancak veri örnekleminin tanımlayıcı istatistiği de hesaplanır. Her düzeydeki konsantrasyon için hesaplamalar ayrı yapılır.

Çalışma grubu içi keskinlik (tekrarlanabilirlik)

Çalışma grubu için keskinlik hesaplamalarında kullanılan izleyen tablo tekrarlanabilirlik deneyi doğrulama kayıt formundaki formüller CLSI Kılavuzlarında varyans (değişkenlik) bileşenleri dikkate alınarak oluşturulan formüllerdir. Bu nedenle deney tasarımları aynı yapılmalıdır. Varyans veya değişkenlik katsayılarının hesaplanmalarının deney tasarımlarına göre değişebileceği dikkate alınmalıdır. Tekrarlanabilirlik (laboratuvar içi keskinlik) aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

Σ : Toplama sembolüdür.

D: Toplam gün sayısı (5)

n: Bir gündeki tekrarlı ölçümlerin toplam sayısı (3)

x_{di} : "d" günü "i" tekrar ölçümünün değeri

\bar{x}_d = "d" günü için tüm sonuçların aritmetik ortalaması

Hesaplanan çalışma grubu içi tekrarlanabilirliğin üretici değeriyle karşılaştırılması

Hesaplanan çalışma içi tekrarlanabilirlik değeri üretici değeri ile karşılaştırılır. Tekrarlanabilirlik ölçüleri standart sapma ve/veya %değişkenlik katsayısı (%CV)'dir. Üretici sadece %CV olarak verdiyse %CV değeri standart sapmaya (σ_r) çevrilir. Bunun için üreticinin %CV değeri test edilen materyalin tüm sonuçlarının aritmetik ortalamasıyla çarpılır.

$$\sigma_r = CV\%_r \cdot \bar{x}$$

%CV_r üreticinin verdiği çalışma içi değişkenlik katsayısıdır.

Hesaplanan tekrarlanabilirlik (s) < Üretici tekrarlanabilirliği (σ) ise ölçülen keskinlik üreticinininkiyle uygundur kararı verilir.

Hesaplanan tekrarlanabilirlik > üretici tekrarlanabilirliği ise bu farkın istatistiksel olarak anlamlılık derecesi değerlendirilir. Bunun için verifikasyon değeri hesaplanır.

$$\text{Verification value} = \frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$$

σ_r : üreticinin standart sapması (%CV veriyse hesaplanan değerdir)

v : Serbestlik derecesi = $D(n-1)$ (Bk. s_r formülü)

C : Ki kare dağılımına göre $(1-\alpha/2)$ yüzdeler noktasıdır (%97,5 yüzdeler nokta için $\alpha/2$ alınır). Ki kare tablosundan serbestlik ve seçilen $\alpha/2$ 'ye göre C değeri bulunur.

Ki Kare analizine göre yapılan değerlendirme uygulamayla birlikte açıklanmaktadır.

Hesaplanan tekrarlanabilirlik (s) < verifikasyon değeri ise ölçülen kesinlik üreticinininkiyle uygundur kararı verilir.

Tekrarlanabilirlik deneyi doğrulama kayıt formu (CLSI-EP15A2E 2005)

Cihaz

Analit

Konsantrasyon

Kontrol materyali Ref no/Lot no

Reaktif materyali Ref no/Lot no

Kalibratör /Lot

	Çalışma 1	Çalışma 2	Çalışma 3	Çalışma 4	Çalışma 5
Gün /Operatör					
Tekrar 1					
Tekrar 2					
Tekrar 3					
$\sum_{i=1}^3 \dots x_i$					
\bar{x}_d					
\bar{x}					
$x_1 - \bar{x}_d$					
$(x_1 - \bar{x}_d)^2$					
$x_2 - \bar{x}_d$					
$(x_2 - \bar{x}_d)^2$					
$x_3 - \bar{x}_d$					
$(x_3 - \bar{x}_d)^2$					
$\sum_1^3 (x_i - \bar{x}_d)^2$					
sd_r^2					
S_r					
$\bar{x}_d - \bar{x}$					
$(\bar{x}_d - \bar{x})^2$					

s_b^2			
s_l			
Gün içi doğrulama değeri $\frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$		$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$	
T			
Günler arası doğrulama değeri $\frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$		$\sigma_l = \% CV_l \cdot \bar{x}$	

Formüllerin açıklamaları:

1. Kesinlik değerinin hesaplanması

- Her gün elde edilen Her gün elde edilen üçlü ölçüm sonuçlarından günlük ortalamalar ($\bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_3, \bar{x}_4, \bar{x}_5$) hesaplanır.
- Günlük ortalama değerlerinden beş günün ortalaması hesaplanır

$$(\bar{x}, \text{büyük ortalama}) \quad \bar{x} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 + \bar{x}_4 + \bar{x}_5}{5}$$

2. Gün içi tekrarlanabilirliğin (kesinliğin) hesaplanması

Her çalışma için çalışma içi standart sapma (s_r) ve çalışma içi değişkenlik katsayısı

($\% CV_r$) hesaplanır. Ortalama standart sapma hesaplanır (s_r).

$$s_r = \frac{\sqrt{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}}{D(n-1)}$$

D : Toplam gün sayısı

n : Her gün için toplam tekrar ölçüm sayısı

x_{di} : Ölçüm yapılan gün sayısı (d) için her tekrarın(i) sonucu

\bar{x}_d : Ölçüm yapılan günlerin sonuçlarının ortalaması

Gün içi standart sapmanın karesinin ortalaması, sd_r^2 hesaplanır.

$$sd_r^2 = \frac{sd_{r1}^2 + sd_{r2}^2 + sd_{r3}^2 + sd_{r4}^2 + sd_{r5}^2}{5}$$

Çalışma içi sigma σ_r değeri hesaplanır. Buradaki $\% CV_r$, çalışma içi değişkenlik katsayısıdır, üreticinin belirlediği değerdir.

$$\sigma_r = \% CV_r \cdot \bar{x}$$

Çalışma içi doğrulama değeri hesaplanır.

$$\text{Doğrulama değeri} = \frac{\sigma_r \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$$

v : Tekrarlanabilir serbestlik derecesi = $D \cdot (n-1) = 10$ (D gün sayısı, n tekrar sayısı)

C : Beş gün boyunca kullanılan düzey sayısı

C ve v, değerleri için χ^2 (ki-kare) dağılım tablosundan (CLSI-EP15A2E 2005) faydalanılır.

Hesaplanan çalışma içi tekrarlanabilirlik, üreticinin verdiği tekrarlanabilirlik değeriyle karşılaştırılır. Üreticinin değeri %CV olarak ise, standart sapma sigmaya çevrilir.

3. Günler arası (laboratuvar içi) tekrarlanabilirlik değerinin hesaplanması

Günler arası tekrarlanabilirlik değeri için varyans terimi, s_b^2 ve çalışmalar arası standart sapma, s_l hesaplanır.

$$s_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D \left(\bar{x}_d - \bar{x} \right)^2}{D-1}$$

\bar{x}_d : Çalışma içindeki ölçümlerin ortalaması

$$s_l = \sqrt{\frac{n-1}{n} \cdot s_r^2 + s_b^2}$$

n : Her çalışma grubu için tekrar ölçüm sayısı

Günler arası sigma, σ_l değeri hesaplanır.

$$\sigma_l = \%CV_l \cdot \bar{x}$$

Günler arası doğrulama değeri hesaplanır.

$$\text{Doğrulama değeri} = \frac{\sigma_l \cdot \sqrt{C}}{\sqrt{T}}$$

T : Etkili serbestlik derecesi

C : Beş gün boyunca kullanılan düzey sayısı

$$T = \frac{\left((n-1) \cdot s_r^2 + (n \cdot s_b^2) \right)^2}{\left(\frac{n-1}{D} \right) \cdot s_r^4 + \left(\frac{n^2 \cdot (s_b^2)^2}{D-1} \right)}$$

D : Gün sayısı

n : Ölçüm tekrarı sayısı

Buradaki s_b^2 değeri, hesaplama basamaklarında daha önce hesaplanan değerdir.

4. Üreticinin verdiği gün içi tekrarlanabilirlik değerinin doğrulanması

- Hesaplanan s_r ile üreticinin verdiği σ_r karşılaştırılır

Hesaplanan s_r değeri < üreticinin verdiği σ_r değeri ise, gün içi üreticinin verdiği tekrarlanabilirlik doğrulanmış olur.

- Hesaplanan s_r ile gün içi doğrulama değeri karşılaştırılır

Hesaplanan s_r değeri \leq gün içi doğrulama değeri ise, tekrarlanabilirlik üretici firmanın belirttiği değer ile tutarlıdır ve tekrarlanabilirlik doğrulanmış olur.

5. Günler arası (laboratuvar içi) kesinliğin üreticinin değeriyle karşılaştırılması

- Hesaplanan s_l ile iddia edilen σ_l karşılaştırılır: Hesaplanan s_l değeri $<$ iddia edilen σ_l değeri ise, günler arası kesinlik üreticinin iddia ettiği ile tutarlıdır ve günler arası kesinlik gösterilmiştir. Hesaplanan s_l değeri $>$ iddia edilen σ_l değeri ise, kullanıcının bulduğu değer üreticinin iddia ettiği değerden büyüktür ve bu istatistiksel olarak mümkün değildir.
- Hesaplanan s_l ile doğrulama değeri karşılaştırılır:

Hesaplanan s_l değeri \leq doğrulama değeri ise, günler arası kesinlik üretici firmanın belirttiği değer ile tutarlıdır ve kesinlik doğrulanmıştır. Hesaplanan s_l değeri $>$ doğrulama değeri ise, günler arası kesinlik üretici firmanın belirttiği değer ile uyumlu değildir ve günler arası kesinlik doğrulanmamıştır, üretici ile irtibata geçilmelidir (CLSI-EP15A2E 2005).

EK-3 Gerçekliğin Doğrulanması Süreç Yönetimi

Gerçeklik performansının doğrulanması

ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün yayınladığı "CLSI EP15-A2 Kesinlik ve Gerçeklik Performansının Kullanıcı Tarafından Doğrulanması (User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline) Kılavuzu"na göre hazırlanan gerçekliğin doğrulanması süreci özetlenmektedir (CLSI-EP15A2E 2005).

İki yol ile gerçekleştirilebilir:

- 1) Sertifikalı referans materyali ile: Yeterlilik test (dış kalite kontrol programı) materyalleri ve diğer konsantrasyonu ölçülmüş referans materyalleri aday prosedür ile analiz edilir, beklenen referans değerleriyle karşılaştırılır.
- 2) Karşılaştırma deneyleriyle ile: Aynı vücut materyalinin paralel olarak iki ölçüm prosedürüyle (Aday prosedür ve karşılaştırma ölçüm prosedürü) ölçülmesi (split-sample comparison experiment). Tüm ölçüm aralığına uygun şekilde dağıtılmış konsantrasyonlardaki 20 hasta örneği iki parçaya ayrılır. Analit, aynı zamanda hem aday hem de karşılaştırma ölçüm prosedürüyle ölçülür. Her iki prosedür sonuçları anlamlı farklılık olup olmadığının saptanması için karşılaştırılırlar (CLSI-EP09A2IRE 2010).

Gerçekliğin doğrulanması deneyi

Amaç: Üretici değerlerinin doğrulanması

Kılavuz: CLSI EP15-A2

Ön hazırlık

Deneye başlanmadan önce laboratuvar görevlileri ölçüm prosedürü eğitimini almış olmalıdırlar. Laboratuvarında aday test için kalite kontrol prosedürü oluşturulmalıdır. Doğrulama deneyleri sırasında üreticinin önerilerine göre kalite kontrolün sağlandığı kanıtlanmalıdır.

Gerçeklik performansının doğrulanması deneyleri

1. Konsantrasyonu ölçülmüş referans materyal ile gerçeklik performansının doğrulanması

1.1 Gereç

Ölçüm materyali: Konsantrasyonu ölçülmüş referans materyali (tıbben karar düzeylerindeki konsantrasyonlarda en az iki referans materyali - Rapor edilebilir aralık ile birlikte doğrulanabilmesi için ölçüm aralığına yayılmış en az 5 farklı tıbben karar düzeylerindeki konsantrasyonlarda materyal)

1.2 Deney protokolü

Süre: Üç veya beş farklı çalışma grubunda ölçüm yapılacak şekilde birbirlerine en yakın sürelerde (5 gün olabilir-kesinlik deneylerine bakınız).

Günde çalışma sayısı: 3 veya 5 farklı çalışma grubu

Her çalışmada yapılacak ölçüm: Her konsantrasyondan ikişer ölçüm

1.3 Konsantrasyonu ölçülmüş referans materyal ile ilgili kritik hususlar:

Analitlerin hedef değerleri belirlenmiş olan referans materyalleri çeşitli kaynaklardan sağlanmaktadır. Fakat istenen analiz konsantrasyonuna erişmek için maddeler eklenmiş olabilir ve kararlılıklarının (dayanıklılık) güçlendirilmeleri için işlemde geçirilmiş olabilirler. Üretim şartlarından dolayı yapılan bu işlemler orijinal insan örneğinden farklı matriks özelliği gösterebilir. Bu matriks farklılığı analitik yanıtı değiştirebilir. Analitik yanıt materyal-ölçüm prosedürü kombinasyonu için tektir. Bunun için gerçeklik performansının doğrulanmasında kullanılacak olan referans materyalin ölçüm prosedürü için verilen değerler kullanılmalıdır. Diğer konu da kullanılan referans materyalin analizinde kullanılan ölçüm prosedürü kitinin aday prosedürde kullanılan farklı olmasıdır. Uygun referans materyal için üreticinin önerisi alınabilir.

1.3.1 Gerçeklik performansının doğrulanmasında kullanılabilecek değerleri bildirilen referans materyal kaynaklarının bazıları aşağıda listelenmektedir:

- Taze dondurulmuş insan serumu veya katkısız insan materyalleri. Bazı analitler için sertifikalı referans materyaller (SRM veya “İng. CRM) ABD Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsünde ve dünyada kabul görmüş üreticilerden elde edilebilir. Bunların bir kısmının listesine “Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine” <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db/> sitesinden erişilebilir.
- Yeterlilik testleri (proficiency testing) programlarından elde edilen referans materyaller.
- Üreticiler tarafından kendi ölçüm prosedürleri için özel olarak üretilmiş materyaller.
- Laboratuvarlar arası karşılaştırma (Dış Kalite Değerlendirme) programlarından. Benzer grup ortalamalarının kullanılması bazı sorunlar yaratabilir. Bu grupların sonuçlarının kullanılabilmesi için en az 10 laboratuvardan oluşması önerilmektedir.
- Üçüncü parti üreticilerden. Belirsizlikleri yüksek olabilir.
- Analit konsantrasyonları sabitlenmiş olanlar. Örneğin, kan parsiyel gaz basınçları tonometriyle belirlenmiş değerlerde sabitlenebilir.

1.3.2 Ölçülmüş değerlerin belirsizliği (uncertainty)

Referans materyal üreticileri çoğunlukla ölçülmüş değerlerin belirsizlik sınırlarını veya değerlerin %95 güven aralıklarını yayımlarlar. Bu materyaller için kullanıcı verifikasyon sınırlarının belirlenmesinde ölçülmüş değer standart hatasını hesaplar

(Bkz. Kesinlik doğrulama). Standard hata çeşitli yollarla hesaplanabilir. Bu metinde sembolü “ s_a ” olarak alınmaktadır:

1.3.2.1 Üretici, ölçülmüş değer için, standart hatayı sağlar veya “standart belirsizliği” (çoğunlukla “ u ”) veya “birleşik standart belirsizlik” (çoğunlukla “ uc ”) sınırlarını raporlarsa, “ s_a ” = sağlanan standart hata, standart belirsizlik veya birleşik standart belirsizliktir.

1.3.2.2 Üretici, ölçülmüş değer için “%95 güven aralığı” (C) değerini yayımladıysa, “ s_a ” = $C/2$ 'dir. Üretici güven aralığının üst ve alt sınırlarını raporladıysa, C = (üst-alt)'tır ve yine “ s_a ” = $C/2$ 'dir.

1.3.2.3 Üretici “genişletilmiş belirsizliği” (U) raporladıysa, mutlaka örn., %95 veya %99 gibi “kapsama” alanını veya kapsama faktörünü de belirtmiş olmalıdır. Kapsama alanı %95 ise “ s_a ” = $U/2$; kapsama alanı %99 ise, “ s_a ” = $U/3$ 'tür. Kapsama faktörü raporlandıysa (çoğunlukla “ k ”), “ s_a ” = U/k 'dir.

1.3.2.4 Referans materyalin ölçülmüş değeri yeterlilik testleri uzlaşmış sonuçlardan alınmışsa, bu sonuçların standart sapma değeri de verilir ve (s) olarak ve benzer grubu oluşturan laboratuvar sayısı (n) da raporlanır. Bu durumda “ s_a ” = (s/\sqrt{n}) 'dir.

1.3.2.5 Referans materyalin ölçülmüş değeri laboratuvararası karşılaştırma programından sağlandıysa, “ s_a ” programdaki bilgiden elde edilir. İdeali şöyledir: benzer grup laboratuvar sayısı ile birlikte farklı laboratuvarların sonuçlarından standart sapma raporlanır. Ancak program hepsinin standart sapma değerini tüm katılımcı laboratuvar sayısını raporlayabilir. Her iki durumda da uygun s ve n değerine göre “ s_a ” = (s/\sqrt{n}) olarak hesaplanır. İkinci durumda “ s_a ” ölçülmüş değer belirsizliğinin fazla hesaplanmasına neden olacaktır. Bir miktar yüksek bulunabilir. Bu da toplam sonuç sayısı n olarak alınırsa düşük hesaplanmasına tercih edilir.

1.4 Prosedür (konsantrasyonu ölçülmüş referans materyali ile)

1.4.1 Ölçüm prosedürüne en uygun materyal seçilir.

1.4.2 Analiz örnekleri üretici önerilerine göre hazırlanır. Analize başlarken örneklerin iyi karıştırılmış olması gerekir.

1.4.3 Her materyal 3 veya 5 farklı çalışma grubunda analiz edilir. Her örnekten çift çalışır. Hazırlanan tabloya veriler kaydedilir (Tablo 2.3).

1.4.4 Her konsantrasyon için ortalama (\bar{x}) ve ortalamanın standart hatası hesaplanır (Bkz. Bu bölümün sonundaki “Hesaplama Açıklamaları”)

1.4.5 Doğrulama değerlendirmeleri aşağıdaki gibi gerçekleştirilir:

Verifikasyon sınırları hesaplanır:

1.4.5.1 Yanlış red hızı, α , belirlenir. Bu hata hızı için hata red hızı olarak %1 ve %5 seçilmektedir.

1.4.5.2 Ölçülmüş konsantrasyona göre üreticinin bias raporlamadığı varsayılır. Bu durumda $\beta = 0$ 'dır.

1.4.5.3 $(100 - \alpha/2)$ noktası ve $(2n-1)$ serbestlik derecesine göre t değeri belirlenir. n = test edilen örnek sayısı; 2 her konsantrasyondan yapılan ölçüm sayısıdır (3 kez ölçüldüyse 3; 4 kez ölçüldüyse 4 alınır). Örneğin, α %1 ve n=5 ise, 9 serbestlik derecesine göre t-dağılımındaki $(100 - \alpha/2)$ noktası t Tablosundan 3.250 olarak bulunur.

Not: yeterlilik testi materyalinden yararlanıldıysa t-istatistiği için serbestlik derecesi için ölçülmüş değer ve s_a hesaplanmasındaki sonuç sayısı alınır. Ancak komplekstir. Bu, hesaplamaların dışındadır. İstatistik uzmanlarına danışılabilir.

1.4.5.4 Birimli bias için verifikasyon aralığı hesaplanır:

$$\bar{x} \pm t_{1-\alpha/2, 2n-1} \cdot \sqrt{s_{\bar{x}}^2 + s_a^2}$$

\bar{x} = Ölçüm sonuçlarının ortalaması

$s_{\bar{x}}$ = Ölçüm ortalamasının standard hatası

s_a = Materyalin konsantrasyonu ile ilişkili standart hata

Yüzde bias kullanılıyorsa, verifikasyon sınırlarının hesaplanmasında yüzde bias ve yüzde standart sapma kullanılır.

1.4.5.5 Ölçülmüş değer verifikasyon sınırları içerisindeyse, üreticinin belirttiği gerçeklik performansı doğrulanmış olur.

1.4.5.6 Ölçülmüş bias veya yüzde bias ölçülmüş değerlerden çok farklı ise, ancak halen verifikasyon sınırları içerisindeyse, kullanıcı daha güçlü test gerçekleştirebilir. Bunun için farklı çalışma gruplarında 2 veya 4 örnek daha çalışarak verileri birleştirebilir ve hesapları tekrarlayabilir.

1.4.5.7 Ölçülmüş değer verifikasyon sınırları içerisinde değilse, kullanıcı üreticinin performansına uygun bulunmamıştır. Aşağıda açıklanan önerilerden birisini gerçekleştirmelidir:

a) Bias'ın veya toplam hatanın laboratuvar ihtiyacına uygun olup olmadığı belirlenir. İzin verilen toplam hata, bias ve standart sapma için birinci hafta metinlerine bakınız.

b) Üreticiyle iletişime geçilir.

2. Hasta örnek sonuçlarının diğer ölçüm prosedürü sonucuyla karşılaştırılması

2.1 Gereç

2.1.1 Ölçüm materyali: Hasta örnekleriyle n=20 (rapor edilebilir aralığa yayılmış her konsantrasyondan uygun sayıda)

2.2 Deney protokolü

2.2.1 Süre: 1 gün(hasta örneklerinin toplanması)

2.2.2 Günde çalışma sayısı: 1 (tüm örnekler aynı çalışma grubunda analiz edilir. Bkz. aşağıdaki açıklama)

2.2.3 Her çalışmada yapılacak ölçüm: Her konsantrasyondan ikişer ölçüm

2.3 Hasta örnekleriyle ve prosedür ile ilgili kritik hususlar Toplanan hasta örneklerinin konsantrasyon aralığı ve hangi konsantrasyonlardan ne kadar örnek toplanacağı kritiktir. Konsantrasyon aralığı ölçüm prosedürünün ölçüm aralığında uygun şekilde yayılmış olmalıdır. Ölçüm aralığının dışındaki örnekler çalışılmamalıdır. Aday prosedür ve karşılaştırma prosedürü özellikleri iyi bilinmelidir. Özellikle her iki prosedür için analite girişim oluşturan maddeler değerlendirilmelidir.

Her iki prosedür ile ölçümler benzer koşullarda yapılmalıdır. Aynı gün içerisinde en fazla dört saatte gerçekleştirilmelidir. Farklı coğrafyalarda yapılıyorsa dondurulmuş örnekler benzer koşullar ve sürelerde çözülüp ölçülmelidir.

Tüm örnekler aynı günde analiz edilemeyecekse her iki prosedürle aynı örnekler aynı günlerde ölçülmeli ve süre 5 günü aşmamalıdır.

Her iki prosedürün kalite kontrol sonuçları deneylerin yapıldığı günler için kaydedilmiş olmalıdır.

Mümkünse örnekler toplandıkları günde analiz edilmelidir.

2.4 Prosedür (Hasta örnekleriyle)

2.4.1 20 hasta örneği toplanır. Uygun koşullarda saklanır. İki set halinde toplanarak üretici önerilerine göre dondurulur.

2.4.2 Örnekler her iki ölçüm prosedürü ile analiz edilir (Her konsantrasyondan çift ölçüm).

2.4.3 Sonuçlar elde edildikçe değerlendirilir. Çok farklı bulunanlar EP15 analizi için dışlanır. Örnekleme büyüklüğünün yerine getirilmesi için yeni örnek analiz edilmelidir.

2.4.4 Kalite kontrol sonuçlarına göre çalışma iptal edilecek olursa kalite kontrol sonucu düzeltilmeli ve ek bir çalışma yapılmalıdır.

2.4.5 Her ölçüm arasındaki fark hesaplanır. Birimli ve yüzde olarak değerler listelenir.

Birimli bias:

Her örneğin biası = b_i = Aday prosedür sonucu_i – karşılaştırma prosedürü sonucu_i

Yüzde olarak bias:

Her örnek için yüzde bias = % b_i

$$\%b_i = 100 * \left(\frac{\text{aday prosedür sonucu}_i - \text{karşılaştırma prosedürü sonucu}_i}{\text{karşılaştırma prosedürü sonucu}_i} \right)$$

2.4.6 Bias ve yüzde bias grafikleri çizilir. Y-eksenine her örneğin bias değerleri, x-eksenine karşılaştırma prosedürü sonuçları yazılır. Bias fark grafiği incelenir. Farkların test edilen konsantrasyon aralığında sabit olup olmadığı değerlendirilir. Birimli bias ve yüzde bias için sabit ise aşağıda hesaplanacak olan ortalama bias prosedürler arasındaki farkın ortalamasını temsil eder. Bu değer üreticinin gerçeklik değeriyle karşılaştırılabilir.

Birimli bias ve yüzde bias her ikisi de konsantrasyon aralığında sabit değilse veriler iki parçaya ayrılır. Her iki parça için de ortalama bias hesaplanır. Bias konsantrasyonla birlikte değişiklik gösteriyorsa ortalama bias hesaplanmaz. Bu durumda, gerçeklik performansının doğrulanması için daha çok veriye ihtiyaç vardır (Bkz. "CLSI EP9 – Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples" Kılavuzu, en son baskısı)

2.4.7 Verifikasyon sınırları hesaplamaları yapılır. Verifikasyon sınırlarının hesaplanmasında t dağılımı temel alınır. Buna göre hesaplanan bias değerinin aşağıdaki sınırlar içerisinde bulunması gerekir.

Verifikasyon aralığı = Üretici biası \pm t-kritik * Biasların standart hatası

Aşağıdaki hesaplamalar bias standart hatası ve t-kritik değerinin hesaplanması aşamalarını kapsamaktadır.

2.4.7.1 Birimli ve yüzde bias ortalamaları hesaplanır.

$$\bar{b} = \frac{\sum_{i=1}^I b_i}{n}$$

$$\%b = \frac{\sum_{i=1}^I \%b_i}{n}$$

2.4.7.2 Birimli bias ve yüzde bias standart sapma değerleri hesaplanır.

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (b_i - \bar{b})^2}{n-1}}$$

$$s_{\%b} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\%b_i - \overline{\%b})^2}{n-1}}$$

2.4.7.3 Yanlış red olasılığı, alfa, değeri belirlenir. Tipik değer alfa = %1 ve %5'tir.

2.4.7.4 (100 - $\alpha/2$) noktası ve (n-1) serbestlik derecesine göre t değeri belirlenir. n = hasta örneği sayısıdır. Hasta örnek sayısı 20 ve yanlış red olasılığı %1 ise 19 serbestlik derecesine göre tablodan bulunan iki taraflı t değeri 2.861'dir.

2.4.7.5 Birimli bias için verifikasyon sınırları hesaplanır.

$$\beta - \frac{t_{1-\alpha/2, n-1} \cdot s_{\bar{b}}}{\sqrt{n}} \quad \text{ve} \quad \beta + \frac{t_{1-\alpha/2, n-1} \cdot s_{\bar{b}}}{\sqrt{n}}$$

β , üreticinin bias değeridir.

Yüzde bias'a göre değerlendirilecekse

$$\beta - \frac{t_{1-\alpha/2, n-1} \cdot s_{\%b}}{\sqrt{n}} \quad \text{ve} \quad \beta + \frac{t_{1-\alpha/2, n-1} \cdot s_{\%b}}{\sqrt{n}}$$

2.4.8 Gerçeklik performansına karar verilir. Verifikasyon sınırlarına göre değerlendirilir.

Hesaplanan ortalama bias (\bar{b}), Verifikasyon sınırları içerisinde ise gösterilen bias üreticinkiyle uygundur kararı verilir.

Hesaplanan ortalama yüzde bias ($\overline{\%b}$), Verifikasyon sınırları içerisinde ise gösterilen bias üreticinkiyle uygundur kararı verilir.

2.4.9 Ölçülen bias ve yüzde bias üreticinkinden büyük fakat verifikasyon sınırları içerisinde ise, daha güçlü test yapmak gerekebilir, 10-20 daha fazla hasta örneği analiz edilebilir ve birleştirilmiş verilere göre istatistiksel analiz uygulanabilir.

2.4.10 Hesaplanan bias verifikasyon sınırları içerisinde değilse bu deney ile üreticinin gerçeklik performansı doğrulanmıyor sonucu çıkarılır ve üreticiyle iletişim kurulur.

Örnek veri kayıt formu (CLSI-EP09A2İRE 2010)

Gün(ler):			Analit:			
Test Yöntemi:						
Karşılaştırılan Yöntem:						
	Test Yöntemi		Karşılaştırılan Yöntem		Test Yöntemi (Y)	Karşılaştırılan Yöntem (X)
Örnek #	1.ölçüm	2. ölçüm	1.ölçüm	2. ölçüm	Ortalama	Ortalama

Hesaplama Açıklamaları:

- Karşılaştırılan yöntem (x) ve test yöntemi (y) için aşırı uçlar değerlendirilir.
- Her iki yöntem için çift ölçümlerin mutlak farkı (DX_i DY_i) alınır.

$$DX_i = |x_{i1} - x_{i2}|$$

$$DY_i = |y_{i1} - y_{i2}|$$

i: örnek sayısıdır (1'den N'ye kadar gider, N: örneklerin toplam sayısıdır).

- Her bir yöntem için çift ölçümlerin mutlak farkının (\bar{DX} , \bar{DY}) ortalaması alınır.

$$\bar{DX} = \frac{\sum DX_i}{N}$$

$$\bar{DY} = \frac{\sum DY_i}{N}$$

- Her bir yöntem için farkların mutlak yakınlığı (DX'_i, DY'_i) ve bunların ortalamaları hesaplanır.

$$DX'_i = \frac{|x_{i1} - x_{i2}|}{\bar{x}_i} \quad DY'_i = \frac{|y_{i1} - y_{i2}|}{\bar{y}_i},$$

$$\bar{DX}' = \frac{\sum DX'_i}{N} \quad \bar{DY}' = \frac{\sum DY'_i}{N}$$

- Veriler dört grafikte gösterilir.
- İlk grafik \bar{y}_i ' (tekrarların ortalaması) 'nin \bar{x}_i (tekrarların ortalaması)'e göre dağılımını gösterir. x-ekseni karşılaştırılan yöntem, y-ekseni test yöntemidir.
- İkinci grafik \bar{x}_i (tekrarların ortalaması)'e karşı her bir y_{ij} (i kadar örneğin r tekrarının yorumu)'nin dağılımıdır.
- Üçüncü grafik \bar{x}_i 'e karşı y ve x ortalamalarının farkının ($\bar{y}_i - \bar{x}_i$) çizimidir.
- Dördüncü grafik, \bar{x}_i 'e her bir y'nin ve x ortalamalarının farkına ($y_{ij} - \bar{x}_i$) göre çizimidir.
- Eşleştirilmiş sonuç dizisi için (\bar{x}_i, y_{ij}), eğim (b) ve y-ekseni kesişim noktası (a) hesaplanır.

$$y_i = a + bx_i$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N \left[\left(\bar{x}_i - \bar{x} \right) \left(\bar{y}_i - \bar{y} \right) \right]}{\sum_{i=1}^N \left(\bar{x}_i - \bar{x} \right)^2}$$

- Her bir y_{ij} için regresyon standart hatası ($S_{y \cdot x}$) hesaplanır.

$$S_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^2 (y_{ij} - Y_i)^2}{(2N - 2)}}$$

her bir \bar{y}_i için,

$$s_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{Y})^2}{N-2}}$$

- Gerçeklik değeri hesaplanır

Verilen tıbbi karar düzeyi X_c , formülde yerine konular ve bias (B_c) hesaplanır.

$$\hat{B}_c = a + (b-1)X_c$$

- Bias için %95 güven aralığının alt sınırı hesaplanır,

$$[B_{c,düşük}, B_{c,yüksek}] = \hat{B}_c \pm 2s_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(X_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\bar{B}_K = \frac{\sum_{i=1}^{N_K} (\bar{y}_i - \bar{x}_i)}{N_K}$$

$$S_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_K} \left[(\bar{y}_i - \bar{x}_i) - \bar{B}_K \right]^2}{N_K - 1}}$$

B_c : X_c konsantrasyonunda gerçek bias

N_K : k grubundaki veri noktalarının sayısı

\bar{B}_K : k grubundaki ortalama bias

S_k : k grubundaki biasın standart sapması

- Korelasyon katsayısı incelenerek regresyon istatistiğinin uygulanabilme derecesi değerlendirilir.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})(\bar{y}_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N_K} (\bar{x}_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N_K} (\bar{y}_i - \bar{y})^2}}$$

Gerçekliğin doğrulanması için karar $r > 0.975$ ise dağılım uygundur.

EK-4 Rapor Edilebilir Aralığın Doğrusallığı Süreç Yönetimi

ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün yayınladığı “EP6-A Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi: İstatistiksel Yaklaşım (Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach)” Kılavuzu’na göre hazırlanan doğrusallığın doğrulanması süreci özetlenmektedir (CLSI-EP06AE 2003)

1. Dikkat edilmesi gereken hususlar (CLSI-EP06AE 2003)

- Analiz edilecek olan klinik örneklere uygun matriksteki materyal kullanılmalıdır.
- Tüm konsantrasyon ve hacim birimleri aynı olmalıdır.
- Tek bir analit için tüm materyaller aynı gün ve çift ölçülmelidir.
- Dilüsyonda üretici firmanın önerdiği dilüent kullanılır.
- Doğrusal aralığın değerlendirilmesinde minimum analitik konsantrasyon, maksimum analitik konsantrasyon ve tıbbi karar sınırları dikkate alınır.
- Klinik karar verilmesinde yararlanılan konsantrasyonlarda hazırlanmalıdır.

2. Hedeflerin belirlenmesi

Her analit için izin verilen hata ve hedef belirlenir. Toplam hata kriterine göre belirlenebilir. Bias hedefi temel alınmalıdır. Bias hedefine eşit veya daha küçük değerde olmalıdır. Bias hedefinin ölçüm hatasından küçük olması gerekir.

Doğrusallık deneylerinde test örneklerinin konsantrasyonu bilinmiyorsa doğrusallık hedefleri göreceli (yüzde) olmalıdır.

3. Diğer olası hatalar ve etkilerinin değerlendirilmesi için uygulanması gereken hususlar

Ölçülen değerler (Y eksen) ile beklenen düzeylerin (X eksen) grafiği çizilir. Ancak bu grafiğin görsel incelemesi yeterli değildir. İstatistiksel analiz yapılmalıdır. Tüm noktalar değerlendirilmelidir.

Doğrusallıktan sapma en iyi “Fark Grafiği ile gösterilir. Birinci ve 3. Derece modeller arasındaki farklılıklar Y eksenine X eksenine de konsantrasyonlar yazılır. %farklar çizilerek izin verilen hatalar ile karşılaştırılır.

4. Doğrusallık deneylerinde varsayımlar

Bu kılavuzdaki lineer aralığın istatistiksel analizi aşağıdaki varsayımlara göre gerçekleştirilir:

- Örneklerin konsantrasyonları doğru olarak bilinmektedir veya birbirlerine oranları bilinmektedir.
- Lineer aralık yalnız kabul edilen performansı gösteren en düşük ve en yüksek konsantrasyonlarda değerlendirilmektedir.
- Lineer aralık sistemin son çıktısını değerlendirilmesi için test edilir. Cihazın değil.

- Test sistemi diğer performansları açısından geçerlidir.
- Regresyon katsayılarının anlamlılığı çift ölçümlerinin hepsinin normal dağıldığı varsayımını kabul eder. Bu dağılımın değişkenliği her konsantrasyonda sabittir.

5. Önerilen raporlama ifadesi

Boşluklar doldurularak aşağıdaki ifade yazılabilir:

(Yöntem) ile yapılan (analit) ölçümünde, ölçüm prosedürünün (alt sınır) ile (üst sınır) arasında doğrusal olduğu gösterilmiştir. Bu aralıkta hedef veya maksimum fark (...) değeridir.

6. Deney örneklerinin hazırlanması (CLSI-EP06AE 2003)

Üretici firmanın belirtmiş olduğu rapor edilebilir aralığa yayılacak şekilde belirlenmiş dilüsyonlarda materyaller hazırlanır.

Doğrusallık deneylerinde kullanılacak olan analiz materyalleri, matrikslerinin uygunluk durumlarına en üst dereceden itibaren aşağıda sıralanmaktadır:

- Düşük ve yüksek konsantrasyondaki hasta materyali havuzu Önerilen dilüent ile dilüe edilmiş hasta örnek havuzu
- Analit eklenmiş hasta örnek havuzu (Eklenecek ve analit veya analit içeren materyaller özenle seçilmelidir. Kılavuzda ayrıntılı açıklanmaktadır.)
- Düşük konsantrasyondaki işlenmiş materyallerle dilüe edilen havuz veya işlenmiş havuz materyali
- Ticari kontrol/kalibratör(doğrusallık deneyleri için üretilmiş materyal)
- Salin ile veya önerilen dilüentten başka dilüentle dilüe edilmiş havuz
- Konsantre veya dilüe edilmiş ticari kontrol materyali
- Sulu çözeltiler
- Diğer çözenlerde hazırlanmış çözeltiler

İlk maddede belirtilen farklı konsantrasyonlarda materyalin hazırlanması için yüksek konsantrasyonlu ve düşük konsantrasyonlu iki örnek havuzu belirli oranlarda karıştırılır. Dilüsyonlar için kılavuzda belirtilen örnekler izleyen tabloda sunulmaktadır. Üst ve alt sınırların %20 veya %30 civarında olması tercih edilir.

Dilüsyon oranları (CLSI-EP06AE 2003)

5 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,75D+0,25Y 3: 0,50D +0,50Y 4: 0,25D +0,75Y 5: Yüksek (Y)	6 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,8D+0,2Y 3: 0,6D +0,4Y 4: 0,4D +0,6Y 5: 0,2D+0,8Y 6: Yüksek (Y)	7 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,833D+0,167Y 3: 0,667D +0,333Y 4: 0,500D +0,500Y 5: 0,333D+0,667Y 6: 0,167D+0,833Y 7: Yüksek (Y)	8 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,857D+0,143Y 3: 0,714D +0,286Y 4: 0,571D +0,429Y 5: 0,429D+0,571Y 6: 0,286D+0,714Y 7: 0,143D+0,857Y 8:Yüksek (Y)
9 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,875D+0,125Y 3: 0,750D +0,250Y	10 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,889D+0,111Y 3: 0,778D +0,222Y	11 noktalı 1: Düşük (D) 2: 0,9D+0,1Y 3: 0,8D +0,2Y	

4: 0,625D +0,375Y 5: 0,500D +0,500Y 6: 0,375D +0,625Y 7: 0,250D +0,750Y 8: 0,125D +0,875Y 9: Yüksek(Y)	4: 0,667D +0,333Y 5: 0,556D+0,444Y 6: 0,444D+0,556Y 7: 0,333D+0,667Y 8: 0,222D +0,778Y 9: 0,111D +0,889Y 10: Yüksek(Y)	4: 0,7D +0,3Y 5: 0,6D +0,4Y 6: 0,5D +0,5Y 7: 0,4D+0,6Y 8: 0,3D+0,7Y 9: 0,2D+0,8Y 10: 0,1D+0,9Y 11: Yüksek(Y)
---	--	---

7. Örnek hazırlanması ve değerlerin belirlenmesi

Seçilen materyale göre hazırlanır. Laboratuvarlar için materyal sayısının 5-7 arasında olması uygun bulunmaktadır.

8. Ölçümlerin yapılması

9. Doğrusallığın (lineer aralığın) gösterilmesi - Veri değerlendirilmesi, verinin incelenmesi

- Aşık farklılıklar açısından veriler incelenir. Analitik ve teknik hatalar var ise düzeltilir ve ölçümler tekrarlanır.

- Analitik ve teknik açıdan aşık hatalar yok ise grafik çizilerek görsel olarak incelenir. Yanıt değişkeni (cihaz yanıtı) “Y” ekseninde, örnek konsantrasyonu ya da relatif konsantrasyonu “X” ekseninde olmak üzere grafik çizilir.

- Bunun için; “Y” eksenine çift ölçümlerin ortalaması, “X” eksenine örnek konsantrasyonu veya göreceli değerleri yazılır. Grafik ya manuel çizilir ya da bilgisayar programında çizdirilir. Doğrusallıktan çok ayrılan sapmalar, yanlış noktalar, aşık çeviri hataları veya cihaz aksaklıkları açısından incelenir.

- Gerekirse, sapma ve kaymalar ölçüm sırasına göre değerlendirilir. “İyi” veriye odaklanılmaz, problemleri veriler değerlendirilir.

- Her düzeydeki farklar için ölçümler değerlendirilir. Doğrusal ise her segmentin eğimi yaklaşık eşit olur. Azalan ya da artan eğimler doğrusallıktan ayrıldığını (nonlinearite) gösterir.

- Her ölçümün yanıtı (y_i) diğer Y değerlerinden çok farklı ise aşırı uç değerlendirilmesi yapılır. Doğrusallık deneylerinde aşırı uç değerler grafikte görsel olarak incelenir. Tek aşırı uç saptanırsa atılır. Veya daha fazla rastlanırsa, analite uygun, özellikle tıbbi karar düzeylerine göre, değerlendirme yapılır veya protokol yeniden gözden geçirilir. Üreticiye başvurularak değerlendirme yapılır.

- XY grafiği sonraki doğrusallık değerlendirilmesi için rehberlik yapar. Doğrusallıktan ayrılma aşık olup olmadığı veya aralığın daraltılması veya genişletilmesi hakkında bilgi sağlar.

10. Doğrusal aralığın saptanması

- Doğrusallığın polinomial değerlendirilmesi

Yöntem iki basamakta yürütülür. 1) Nonlinear polinomiyalin verilere lineer polinomiyalden daha iyi uyup uymadığı incelenir. 2) Eğer daha çok uyuyorsa, veriye en iyi uyan nonlinear ve lineer polinomiyal arasındaki farkın yöntem için daha önceden belirlenmiş hedef bias değerinden küçük olma durumu değerlendirilir.

- Polinomiyal regresyon:

En az farklı konsantrasyonlarda 5 örnek çift olarak ölçülmelidir. Örneklerin dilüsyonları birbirlerine eşit aralıklarda olabilir veya olmayabilir. Eşit olursa x değerleri yerine 1, 2, 3, 4 ve 5 yazılabilir (Örnek: 20-100 mg/dL aralığında, konsantrasyonlar 20, 40, 60, 80, 100 mg/dl ise).

Birinci, ikinci (kuadratik) ve üçüncü- derece polinomiyal ile polinomiyal regresyon analizi yapılır. İstatistik programları kullanılır.

Sıra	Polinomiyal	Regresyon df (Rdf)
Birinci	$y = b_0 + b_1x$	2
İkinci	$y = b_0 + b_1x + b_2x^2$	3
Üçüncü	$y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$	4

“b₁” regresyon katsayılarıdır. 2. Derecede “b₂” nonlinear katsayıdır. 3. Derecede “b₂” ve “b₃” nonlinear katsayılarıdır. Her nonlinear katsayısının standart hatası bulunur (İstatistik programının çıktısında vardır). Nonlinear katsayıların istatistiksel anlamlılığı, t değerine göre belirlenir. İlk iki katsayı “b₀ ve b₁) test edilmez, çünkü nonlineariteyi göstermez.

$$t = \frac{b_i}{SE_i}$$

Serbestlik derecesi hesaplanır.

$$df = L \cdot R - Rdf ,$$

L: Farklı konsantrasyonların sayısı veya örnek sayısı; R: Her örnekte gerçekleştirilen ölçüm sayısı; Rdf: Regresyon analizinin serbestlik derecesidir. Rdf b₀ da dahil regresyon modelinin katsayısıdır (Örnek: Üçüncü derece polinomiyal için: L=5; R = 2; Rdf = 4 ve df = 5.2-4 =6 olarak bulunur). Ya tablodan iki taraflı t değer bulunur ya da istatistik programında gözlenen t değerinin olasılık değerine bakılır. Eğer b₂ veya b₃ için p>0.05 ise doğrusaldır kararı verilir. Analiz yüksek kesinsizlik açısından değerlendirilir (Bkz. izleyen paragraflarda).

Nonlinear katsayılarından birisi dahi anlamlı ise (p>0,05), bu protokole göre veri seti nonlinearidir. Bu değerlendirmede nonlinearite istatistiksel olarak anlamlı bulursa da hasta sonuçlarını etkilemeyebilir. Doğrusallıktan sapma anlamlı ise doğrusallıktan sapma derecesi değerlendirilir.

11. Doğrusallıkta sapma derecesi

Her konsantrasyon için aşağıdaki hesaplamalar gerçekleştirilir:

Regresyon standart hatasına ($S_{y,x}$) bakılarak en iyi uyum sağlayan 2 ve 3. Derece (nonlinear) polinomiyal seçilir (Bu istatistik model ve ölçülen sonuçlar arasındaki farkın ölçüsüdür. Dolayısıyla en küçük $S_{y,x}$ değeri veriye en iyi uyum sağlayanı gösterir.

Doğrusallıktan sapma (DL) hesaplanır:

DL; 2. derece model ile 1. derece model veya 3. derece ile 1. derece arasındaki farktır. Bu nonlinear model ile lineer model arasındaki farkın ölçüsüdür. Her konsantrasyon için ayrı ayrı hesaplanır. Analit birimleriyle ifade edilir. Hedefler % ise her bilinen konsantrasyona veya x_i göreceli konsantrasyonlar ise ortalama değere göre %ler hesaplanır.

Her düzey için DL değeri hedef değerler ile karşılaştırılır.

Küçük değerde ise nonlinearitye istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olsa da önemli değildir.

Büyük ise büyük olan noktalardaki konsantrasyonlar değerlendirilir. İki uçta ise uçtakiler atılarak tekrar değerlendirilebilir. Ancak doğrusallık sınırları küçülür.

Çözüm bulunamaz ise üreticiye veya temsilcisine danışılır.

12. Doğrusallık deneylerinde rastgele hatanın değerlendirilmesi

Rastgele hata doğrusallığı etkiler. CLSI EP06 Kılavuzunda rastgele hata tekrarlanabilirlik olarak hesaplanır. En iyi hesaplama L sayıda çift ölçümlerin havuzlanmış farklarının tekrarlanabilirliğidir. Bu havuzlanmış farklar analit düzeylerinden bağımsız olarak değişkenliğin toplam ortalama ölçüsüdür (SD_r veya CV_r). SD_r ; tüm düzeylere göre kabul edilebilir derecede eşit ise tekrarlanabilir düzeylere göre sabittir (Sabit SD_r). Fark yüksek konsantrasyonlarda daha yükseliyorsa tekrarlanabilirlik referans konsantrasyona göre orantılıdır (sabit CV_r). Tekrarlanabilirlik hata hesaplamaları yüzde farklara göre yapılmalıdır. Tekrarlanabilirlik, hatanın ortalama karesinin karekökü olarak varyans analiziyle hesaplanabilir. Doğrusallık için deneylerinden tekrarlanabilirlik için hata hedef ölçüm prosedürü için verilen bias değeridir.

13. Rastgele hatanın değerlendirilmesi hesaplamaları

Çift ölçümlerin farkları değerlendirilerek hesaplanır. Hedef tekrarlanabilirlik ile karşılaştırılır. Büyükse, çift ölçümler doğrusallık için yeterli olmayabilir. Önceki tekrarlanabilirlik uygun bulunmuşsa doğrusallık için deneyler tekrar edilebilir.

Doğrusallık doğrulama deneyleri için tekrarlanabilirlik hatası aşağıdaki basamaklar uygulanarak da hesaplanabilir:

1. Yol:

- Her düzeydeki çift ölçümler arasındaki fark hesaplanır
- Çift ölçümler arasındaki farkın karesi alınır

- Farkların karesi toplanır.
- “Düzyey sayısı (L) x 2”ye bölünür.
- Karekökü alınır

2. Yol:

- Aşağıdaki formüllerle hesaplanır:

Her konsantrasyonun ölçümleri çift yapılırsa:

$$SD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^L [r_{i1} - r_{i2}]^2}{2 \times L}}$$

r: Ölçümler arasındaki fark (çıkarılan değerler veya bunların yüzdeleri olabilir. Yüzdeler kullanılırsa hesaplanan CV_r 'dir.

Her konsantrasyonun ölçümleri 2 den fazla yapılırsa:

$$SD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^R [r_{ij} - r_i]^2}{L \times (R - 1)}}$$

R = Her düzeyin ölçüm sayısı (j=1, ..., R)

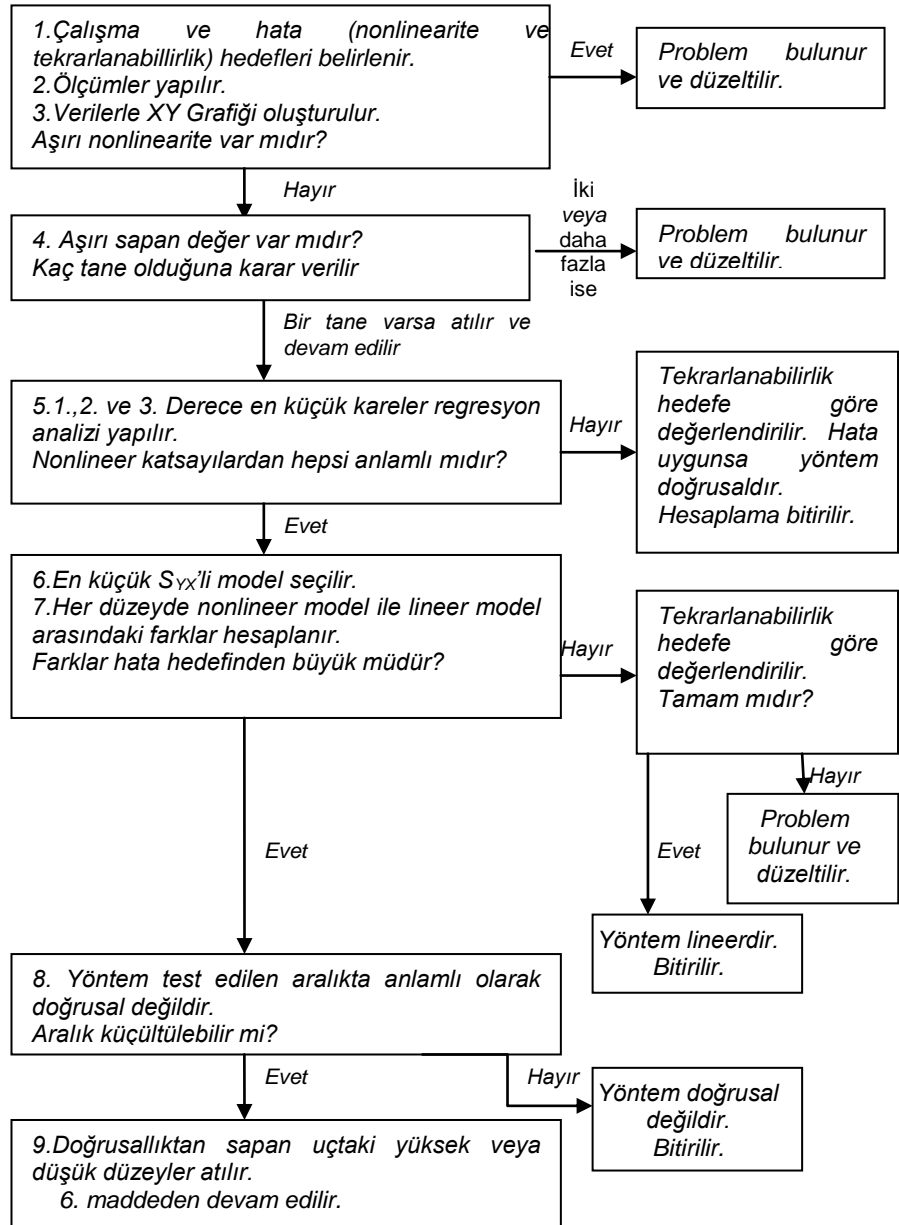
L = Ölçülen örnek sayısı (i= 1, ..., L)

r_i = i. Düzeydeki ortalama konsantrasyon

3. Yol

İstatistik programlarından yararlanılır.

Rapor edilebilir aralığın doğrusallığının değerlendirilmesi basamakları Şekil 4.4'te gösterilmektedir.



Şekil 0.1 Doğrusallığın değerlendirme basamakları

EK-5 Referans Aralığının Doğrulanması Süreci Yönetimi

Referans aralıklarının belirlenmesi, hesaplanması ve doğrulanması

ABD Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün yayınladığı "CLSI C28-A3 Klinik Laboratuvarlarda Referans Aralığının Belirlenmesi, Hesaplanması ve Doğrulanması" Kılavuzu'na göre hazırlanan referans aralığının doğrulanması süreci özetlenmektedir.

Kılavuz, yeni ölçüm prosedürü geliştirilip uygulanması için referans aralıklarının saptanmasını ve üretilerek, üretici tarafından belirlenmiş referans aralığının laboratuvarın popülasyonu için geçerliliğinin doğrulanması protokolünü kapsamaktadır. Her iki durumda uygulanması gereken prosedürleri ve koşullar şu başlıklar altında açıklanmaktadır:

1. Referans aralıklarının hesaplanmasında uygulanması gereken hususlar
2. Referans aralıklarının transferi
3. Referans aralıklarının geçerliliğinin kanıtlanması/doğrulanması (verifikasyonu)

Referans aralıklarının hesaplanmasında uygulanması gereken hususlar:

- 1.1 Minimum referans birey sayısına karar verilir
- 1.2 Referans bireylerle ilgili bilgilerin toplanacağı anket formu hazırlanır.
- 1.3 Ankete referans aralığı belirlenecek olan analite özel konular da eklenir.
- 1.4 Referans bireylerin seçiminde dikkat edilecek katma ve dışlama ölçütleri belirlenir.
- 1.5 Kaç alt gruba ayrılacağına karar verilir.
- 1.6 Preanalitik faktörlere göre bireyler hazırlanır.
- 1.7 Örneklerin toplanması, işlenmesi, saklanması ve taşınması koşulları belirlenir.
- 1.8 Kalite kontrolü yapılmakta olan yöntemlerle ölçümler yapılır.
- 1.9 Örneklerin analitik prosedürün özelliklerine göre taşınması sağlanır.
- 1.10 Veriler incelenir ve analiz edilir.
 - Histogram çizilir.
 - Aşırı sapan uç değerler incelenir.
- 1.11 Referans aralık sınırları hesaplanır
- 1.12 Alt grupların farklılıkları değerlendirilir. Birleştirme konusunda karar verilir.
- 1.13 Referans aralıklar rapor edilir (Sınırların %90 güven aralıkları da yazılır).

Bazı maddeler aşağıda açıklanmaktadır:

1.1 Minimum referans birey sayısına karar verilir: Nonparametrik yöntem için en az 120 birey, transfer için en 20 birey.

1.2 Referans bireylerle ilgili bilgilerin toplanacağı anket formu hazırlanır.

1.3 Ankete referans aralığı belirlenecek olan analite özel konular da eklenir.

Referans birey belirleme formu (CLSI-C28A3cE 2008)

Örnek no:	Örnek alındığı saat:	(Laboratuvar tarafından doldurulacaktır)									
Adı, soyadı:	Medeni hali:	Meslek:	Telefon:								
Yaş:(yıl)	Cinsiyet:	İrk:	Boy:	(m)	(cm)	Ağırlık: (kg)					
Kendinizi sağlıklı hissediyor musunuz?		(E)	(H)								
Düzenli olarak egzersiz yapıyor musunuz?		(E)	(H)								
Evet ise ne kadar sıklıkta? (saat/hafta)											
Aktivitenin derecesi? (hafif)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 (ağır)
Son zamanlarda hiç rahatsızlandınız mı?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne zaman? Ve neden?											
Reçete edilmiş ilaç alıyor musunuz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne? Süresi:											
En son ilaç ne zaman aldınız? Adı:											
D vitamini supplementi alıyor musunuz?		(E).....	(H)								
İşinizde tehlikeli kimyasal maddelere maruz kalıyor musunuz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne? Süresi:											
Sigara kullanıyor musunuz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne şekilde? Ne kadar? Süresi:											
Özel diyet uyguluyor musunuz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise lütfen tanımlayınız Süresi:											
Kronik hastalığınız var mı?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne?											
Alkol kullanma alışkanlığınız var mı?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne şekilde? Hangi sıklıkta? Süresi:											
En son alkol ne zaman aldınız?											
Bir doktor kontrolü altında mısınız?		(E)	(H)								
Eğer evet ise neden?											
Rahatlatici ilaç kullanıyor musunuz?		(E)	(H)								
Evet, ise ne? Hangi sıklıkta? Süresi:											
Son zamanlarda hastaneye yattınız mı?		(E)	(H)								
Ne zaman? Neden?											
Ailenizde geçirilmiş bir hastalık var mı?		(E)	(H)								
Eğer var ise tanımlayın:											
Son günlerde aspirin ya da ağrı kesici aldınız mı?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne? Ne zaman?											
Son günlerde soğuk algınlığı ve alerji tedavisi gördünüz mü?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne? Ne zaman?											
Son günlerde hiç antiasit veya mide ilacı aldınız mı?		(E)	(H)								
Eğer evet ise ne? Ne zaman?											
Diyet hapi kullanıyor musunuz?		(E)	(H)								
Süresi:											
<i>Kadınlar için</i>											
Adet görüyor musunuz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise, en son adet tarihiniz nedir?											
Eğer hayır ise, hormon replasman tedavisi alıyor musunuz?(E)		(H)									
Eğer varsa, bebeğinizi emziriyor musunuz?		(E)	(H)								
Hamile misiniz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise, tahmini doğum tarihiniz nedir?											
Oral kontraseptif kullanıyor musunuz?		(E)	(H)								
Eğer evet ise hangisi?											

1.4 Referans bireylerin seçiminde dikkat edilecek katma ve dışlama ölçütleri belirlenir:

Dışlama kriterlerine örnek (CLSI-C28A3cE 2008)

Alkol kullanımı	Yakın zamanda geçirilen hastalık
Kan basıncı	Emzirme
Uyuşturucu bağımlılığı	Obezite
Çevre	Meslek
Genetik faktörler	Hamilelik
Açlık, tokluk	Son dönemde geçirilen ameliyat
Sigara kullanımı	Vitamin alımı
Reçeteli ilaç kullanımı	Son dönemde kan verme

Katılma kriterlerine örnek (CLSI-C28A3cE 2008)

Yaş	Coğrafik konum	Fizyolojik değişkenlik
Postür	Cinsiyet	İrk
Diyet	Kan grubu	Sigara kullanımı
Etnik geçmiş	Menstrual döngü	Açlık, tokluk
Egzersiz	Hamilelik	

1.5 Kaç alt gruba ayrılacağına karar verilir:

Referans aralıkların hesaplanmasında referans bireylerin etkili faktörlere göre alt gruplara ayrılması gerekir. Cinsiyet ve yaş grupları en yaygın alt gruba ayırma faktörü olsa da sigara içilmesi, vücut kütle indeksi, beslenme şekilleri gibi çeşitli faktörlere göre ayrılabilir.

1.6 Preanalitik faktörlere göre bireyler hazırlanır:

Referans aralıkların saptanmasında preanalitik değişkenliklerin standardize edilmesi gerekir. Bireyin hazırlığı ve metodolojik faktörleri her birey için mümkün olduğunca aynı koşullarda olmalıdır. Dikkate alınması gereken preanalitik faktörler izleyen tabloda belirtilmektedir. Bu değişkenlere analitin doğasına göre ek faktörler eklenebilir.

Preanalitik faktörler (CLSI-C28A3cE 2008)

Bireyin Hazırlığı	Örnek Toplama	Örneğin Hazırlanması
<ul style="list-style-type: none"> Geçmiş diyet Açlık, tokluk • Farmakolojik etkenlerin varlığı • İlaç tedavisi • Fiziksel aktivite • Örnek alınmadan önceki dinlenme süresi • Stres 	<ul style="list-style-type: none"> • Çevresel koşullar • Alınma saati • Postür • Örnek tipi • Kan akışı • Ekipman • Turnike kullanımı • Tüpler 	<ul style="list-style-type: none"> • Laboratuvara ulaşım • Serum/plazma ayrımı • Saklama • Analiz için hazırlama

1.10 Veriler incelenir ve analiz edilir:

- Verilerin histogramları çizilir ve görsel incelenir.
- Aşırı uç değerler belirlenir.

Veri toplandıktan sonra ilk basamak verilerin sıklık (frekans) dağılımının incelenmesidir.

Sapan değerlerin saptanmasında çok sayıda istatistiksel teknik vardır. Hepsinde verilerin Gaussian dağılımı gösterdiği varsayılır. Çok aşırı değerler bulunduğu sapan değer gizli kalabilir. Bu nedenle histogramda aşırı sapan değer net olarak anlaşılacağından aşırı sapan uç değerler incelenir.

Aşırı uç/sapan değerlerin incelenmesi yöntemlerinden birisi Dixon-Reed Kuralı'dır.

Dixon Reed tarafından önerilen yöntem D/R oranı olarak bilinir.

D = En uçtaki veri (büyük veya küçük) ile yanındaki en büyük (veya en küçük) verinin absölü farkıdır.

R = En büyük veri ile en küçük veri arasındaki farktır (hesaplanırken sapan değerler de hesaba alınır).

Fark (D) R değerinin 1/3'ne eşit veya büyükse aşırı uç değer silinir. Uçtaki değer çok aşırı düzeyde ise bir önceki değerden başlanır. Bu değer sapan değer olarak saptanırsa diğer aşırı uçtaki değerler birlikte silinir. Görsel olarak aşırı uç gözlenirse ancak D/R ile saptanamazsa ya hepsi alınır ya da başka bir test uygulanır. D/R yöntemi Kılavuzda önerilmektedir. Non-parametrik dağılıma uygulanır.

1.11 Referans aralıklar hesaplanır:

- Referans aralıklar nonparametrik veya parametrik yöntem ile hesaplanır. Dağılımın normal dağılıma uyumu değerlendirilir. Dağılım normal ise parametrik yöntem, parametrik değilse nonparametrik yöntem uygulanır.

- Parametrik yöntem: Dağılımın 2,5 ve 97,5. yüzdeler bulunur.

- Nonparametrik yöntem:

Alt sınır (2,5. Yüzdeler): $r_1=0,025 (n+1)$

Üst sınır (97,5. Yüzdeler): $r_2=0,975 (n+1)$ formülleriyle hesaplanır (n = referans birey sayısı)

- Referans aralıkların güven aralıkları hesaplanır.

- Normal dağılım ise hesaplama sınırların %90 güven aralığı $2.81*SE$ (Standard hata) ile toplanır ve çıkarılır.

- Dağılım normal değilse, 2,5. yüzdelerdeki %90 güven aralığını belirleyen sıra numaraları izleyen tablodan yararlanılarak bulunur. Grup sayısına karşılık gelen a ve b değerleri belirlendikten sonra bu sıra numaralarına karşılık gelen değerler 2,5

yüzdelerinin %90 güvenle alt ve üst sınırlarını temsil etmektedir. 97,5 yüzdeliğin güvenlik sınırı ise, bulunan a ve b sayıları n+1'den elde edilir.

2,5 yüzdelerde %90 güven sınırını belirleyen sıra numaraları

Örnek sayısı, n		Sıra	
En az	En çok	a	b
120	131	1	7
132	159	1	8
160	187	1	9
188	189	1	10
190	216	2	10
217	246	2	11
247	251	2	12
252	276	3	12
277	307	3	13
308	310	3	14
311	338	4	14
339	366	4	15
367	369	5	15

a: hedef popülasyonun 2,5. yüzdelerdeki sınırın %90 güven aralığının alt sınırını temsil eden verinin numarasını gösterir. b: hedef popülasyonun 2,5. yüzdelerdeki sınırın %90 güven aralığının üst sınırını temsil eden verinin numarasını gösterir. 97.5. yüzdeler için, a ve b için bulunan sıra numaraları, n+1'den çıkarılır.

1.12 Alt grupların farklılıkları değerlendirilir. Birleştirme konusunda karar verilir:

Klinik olarak anlamlı olmadıkça referans aralıkların tüm popülasyon için raporlanması karışıklık yaratmaması açısından uygundur. Ancak alt gruplara göre rapor edilmesi değerlendirilmelidir. Genel olarak iki alt grup ortalamaları arasında gözlenen farkın %5 veya %1 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunması durumunda alt grupların referans aralıklarının ayrı raporlanması gerektiği savunulur.

İki alt grubun standart sapmaları oranı 1,5 veya daha büyük bulunursa daha geniş olan dağılımı dar olanı her iki tarafta da aşar.

Değerlendirmeler sonunda her iki alt grup arasında fark bulunursa her alt grup en az 120 bireyden oluşturulur.

Alt grupların referans aralıkları arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığının değerlendirilmesi

Farkların anlamlılığının değerlendirilmesinde çeşitli testlerden yararlanılır:

1.12.1. Harris ve Boyd önerisi(Normal Standard Sapma Testi (EP28-A3'te önerilen)): İki alt grup ortalamaları, standart sapma ve grup birey sayıları ile z değeri hesaplanır.

$$z = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\left[\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2} \right) \right]^{1/2}}$$

\bar{x}_1 ve \bar{x}_2 iki alt grubun belirlenen ortalamalarıdır. s_1^2 ve s_2^2 standart sapmalarıdır. n_1 ve n_2 alt gruplardaki birey sayısıdır. Orijinal veri fazla derecede çarpık ise, log transformasyonu gibi basit bir transformasyon yapılır ve z testi transforme edilmiş değerlerle gerçekleştirilir.

Hesaplanan z değeri kritik z (z^*) değeri ile karşılaştırılır. Kritik z değeri aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$z^* = 3 (n_{ort}/120)^{1/2}$$

$$n_{ort} = (n_1 + n_2)/2 \text{ olduğuna göre}$$

$$z^* = 3 [(n_1 + n_2)/240]^{1/2}$$

Hesaplanan z değeri kritik z (z^*) değerinden fazla ise alt grup referans aralıkları ayrı raporlanır.

Aynı zamanda büyük standart sapma değeri küçük olanın 1,5 katından fazla ise alt grup referans aralıkları ayrı raporlanır.

1.12.2 Lahti ve Ark. Önerileri (Yüzdellik ve uzaklık kriteri; Uzaklık kriteri): Tüm grubun referans aralığı dışında kalan alt grupların yüzdeleri değerlendirilir. Uzaklık Kriterine göre şu basamaklar izlenir:

a) Yüzdellik kriteri

Alt grup dağılımlarının ortak referans aralık dışında kalan alt grup dağılımlarının yüzdeleri ile açıklanır (yalnız dağılımların her iki ucundaki yüzdelerin daha büyük olanı alınır):

- Her iki yüzde değeri $< \%3,2$ ise, ayrı hesaplama yapılmaz.
- En az bir yüzde değeri $\%3,2$ ve $\%4,1$ arasında ve birisi $\geq \%4,1$ ise, basit bir istatistik yöntemle karar verilir.
- En az bir tanesi $\geq \%4,1$ ise ayrı hesaplanır.

b) Uzaklık kriteri

Ayırma kriteri alt grup dağılımlarının referans sınırları fark ile açıklanır.

- Standart sapmaları oranı, $R \geq 1,5$ ise ayrı hesaplanır.
- $R < 1,5$ ise referans aralıkların alt sınırları (DL) ve üst sınırları (DU) arasındaki farklar bulunur
- Daha dar olan alt grup standart sapması (s) kullanılır.

- Her iki DL ve $DU < 0,25s$ ise ayrı hesaplanmaz
- DL ve DU'nun ikisinden birisi veya her ikisi de $0,25s$ ile $0,75s$ arasında ve her ikisi de $\geq 0,75s$ ise karar için başka istatistik yöntem bulunur.

1.14 Referans aralıklar rapor edilmesi (Sınırların %90 güven aralıkları da yazılır).

2. Referans aralıkların transferi ve geçerliliklerinin kanıtlanması:

Güvenilir referans aralıkların belirlenmesi zaman alıcı ve masraflıdır. Yeni test ve yöntemlerin hızla çoğalması büyük ve küçük laboratuvarlar için de zorlayıcı olmakta hatta gerçekçi olmamaktadır.

Ölçüm yöntemlerinin ticari olarak satın alındığı klinik laboratuvarlarda, çoğunlukla kit kılavuzlarında üreticiler tarafından hesaplanmış olan referans aralıklar veya beklenen değerler kullanılır. Ancak bu değerler, laboratuvarın hizmet ettiği popülasyon için geçerli olmayabilir.

Firma tarafından verilmiş olan değerler uygulamaya sokulmadan önce laboratuvar tarafından doğrulanması gerekir. Bu işlem transfer olarak adlandırılır.

Öncelikle, analitik sistemin kesinlik, doğrusalılık, gerçeklik ve dolayısıyla doğruluk açısından yeterli olduğu kanıtlanır. Orijinal referans aralığının uygun olarak hesaplandığı varsayılır.

İki önemli konu dikkate alınmalıdır:

2.1 Analitik sistemin karşılaştırılabilirliği

2.2 Referans birey popülasyonunun karşılaştırılabilirliği

2.1 Analitik sistemin karşılaştırılabilirliği

Laboratuvar belirli bir analitin referans aralığını kendi popülasyonu için belirli bir yöntem için güvenilir bir şekilde hesaplamışsa, yeni yöntem geçtiği zaman bu yöntem için tekrar referans birey toplamasına gerek kalmayabilir.

Yeni yöntemin uygulanmasından önce büyük olasılıkla daha önceki yöntem ile karşılaştırma çalışması yapmıştır. Bu karşılaştırma çalışmasından elde edilen verilerle hesaplanmış referans aralığının kullanılmasına veya yeni bir çalışma ihtiyacına ihtiyaç durumuna karar verilebilir.

Hastalardan taze örnek alınarak karşılaştırma çalışması yapılır. Referans birey bulmak şart değildir. Genellikle, aşağıdaki durumlar varsa referans aralıklar transfer edilebilir:

- Yeni yöntem benzer değişkenlikteyse ve girişimler de benzer ise
- Aynı veya karşılaştırılabilir standart veya kalibratörleri varsa
- Elde edilen verilere göre karşılaştırılabilirliği kabul edilebiliyorsa

Doğrusal regresyon yoluyla transfer

• Yeni yöntem geçildiği zaman regresyon analizi ile transfer yapılabilir. İlişki doğrusal ise ve uyum iyiye (örn, $r^2 > 0,90$) regresyon denklemi transfer için kullanılabilir. İlişki doğrusal değilse de transfer edilebilir, ancak ileri analiz gerekir.

• Farklı tekniklerle çalışan laboratuvarlar arasında transfer için her yöntemin kesinlik ve bias değerleri net olarak bilinmelidir.

2.2 Referans birey popülasyonunun karşılaştırılabilirliği

Klinik laboratuvar başka bir laboratuvarın veya kit üreticisinin referans aralığını transfer edeceği şartları karşılıyorsa ikinci dikkate alınması gereken konu referans popülasyonun karşılaştırılabilir olduğunun değerlendirilmesidir.

3. Referans aralıkların geçerliliğinin kanıtlanması (validasyonu)

Referans aralığın transferinin kabul edilebilirliğinin değerlendirilmesinde üç yaklaşım önerilmektedir:

3.1. Sübjektif değerlendirme;

3.2. Az sayıda referans birey ölçümlerinin istatistiksel analizi (örn, n=20);

3.3 Daha fazla sayıda referans birey ölçümlerinin değerlendirilmesi (n=120'den az olması beklenir, 60 önerilmektedir).

3.1. Sübjektif değerlendirme

Transferin kabul edilmesi sübjektif değerlendirmelerle de yapılabilir. Ancak çok dikkatli olunmalı, ilgili ve gerekli tüm şartlar açıkça belirlenmeli ve raporlanmalıdır. Referans popülasyonun demografik değişkenleri, coğrafik lokasyonları; preanalitik değişkenler, analitik prosedür ayrıntıları, analitik performans, referans değerlerin tam seti, referans aralığın hesaplanma yöntemi mutlaka yazılmalıdır. Bu faktörler laboratuvarın işletimi ve test yapılan birey popülasyonuna uyuyorsa, uyduğunu gösteren kayıtlardan başka geçerli kılma veya validasyon çalışmasına gerek yoktur.

3.2 Az sayıda referans birey ile (n=20)

Sübjektif değerlendirmeye alternatif olarak üreticinin veya referans aralığı aldığı laboratuvarın aralıklarının transferini geçerli kılmak isteyebilir. Bu durumda kendi sağlıklı popülasyonundan 20 referans bireyin sonuçlarını değerlendirir, daha çok sayıdan elde edilen referans aralıklarla transferin kabul edilebilirliğine karar verir. Orijinal laboratuvarın preanalitik değişkenleri ve analitik performansını kontrol ettiği raporlanmalıdır. Eğer demografik değişkenlerde ve coğrafik lokasyonlar arasında kayda değer fark varsa transferin çok anlamı olamaz.

Transferin geçerli kılınması çalışmasında referans birey seçimi için gerekli olan tüm şartlar sağlanarak sağlıklı popülasyondan 20 kişi seçilir. Grubun homojenliği test edilir. Hiç sapan değer olmamalıdır. Dixon/Reed veya Tukey yöntemleriyle analiz edilir. Sapan değer bulunursa bunlar atılır ve tekrar veri toplanır. Sapan değer bulunmayıncaya kadar bu işleme devam edilir.

Referans aralığın belirlendiği 20 kişiden en az 2'si (%10'nu) transferde kullanılan üretici veya diğer laboratuvarın raporladığı %95 referans sınırlarının dışında bulunursa transfer kabul edilir. Bu durumda yanlış red olasılığı %5-7'dir. Üç veya dört olursa transfer onaylanmaz. İki'den yüksek olduğu zaman, analitik sistem kontrol edilebilir veya yeni referans bireylerde tekrar ölçüm yapılabilir Aynı kurallara uyularak sağlıklı birey toplanır. İki sonuçtan fazlası önceki aralığın dışında değilse

ikinci çalışmaya göre transfer kabul edilir. İkincide de üç veya daha fazla veri aralığının dışında ise analitik prosedür tekrar değerlendirilir, iki popülasyonun örneklemelerinin biyolojik özellikleri incelenir. Laboratuvarın kendi referans aralığını saptaması konusunun değerlendirmesi gerekebilir.

Laboratuvar daha ileri testlerle verilerini değerlendirme yoluna gidebilir.

Lokasyon (ortalama) ve skala (yayılım)'ın değerlendirilmesinde Mann-Whitney U (M-W U) test lokasyondaki; Siegel-Tukey (S-T) test yayılımdaki; Kolmogorov Smirnov (K-S) testi her iki değişikliğin saptanmasında en iyisidir (azalma ve artma durumlarının her ikisinde de).

Yapılan ölçümlerden elde edilen aralık firmanın aralığı içinde ise ve firma aralığı çok geniş ise, transfer işlemi daha fazla sayıda referans bireyle yapılmalıdır.

3.3 Daha fazla sayıdaki referans birey ile

Ölçüm prosedürünün ve analitin özelliğine göre laboratuvarlar daha fazla sayıda referans birey ile geçerli kılma çalışması yapmak isteyebilir. Kendi popülasyonunda 60 referans birey ile çalışma yapar. Transfer edeceği referans aralığa göre değerlendirir. Burada yukarıda vurgulanan tüm şartların sağlandığı kanıtlanmalıdır.

Madde 2.1'de anlatıldığı gibi sapan değerlere göre ikinci grup çalışması yapılabilir. İki gruba göre onaylanamazsa 120 referans birey seçilerek çalışma planlanır.

Burada da güçlü istatistiksel teknikler alternatif yollar sağlamaktadır. 60 referans bireylik örneklem ile robust (sağlam) teknikler kabul edilebilir güven aralıklı referans aralıklarının hesaplanmasını sağlar. Ancak, analitten analite değişiklik olabileceği için her laboratuvar analite göre değerlendirip karar vermelidir.