

İmmünassay Yöntemi ile 25-Hidroksivitamin D₃ Ölçüm Belirsizliğinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Measurement Uncertainty for 25-Hydroxyvitamin D₃ with Immunoassay Method

Meltem Demir**

Fatma Demet İnce*

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

** Özel Antalya Medikal Park Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Antalya, Türkiye

Başvuru Tarihi: 24 Temmuz 2014

Kabul Tarihi: 29 Ekim 2014

ÖZET

Amaç: İmmünassay 25-Hidroksivitamin D₃ yönteminin tekrarlanabilirlik, kalite kontrol ve kalibratör materyallerinden kaynaklanan belirsizlikleri kullanılarak toplam ölçüm belirsizliği hesaplamak ve bunun hastaların D vitamini durumu kararına olası etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: 25-Hidroksivitamin D₃ ölçümü, elektrokemilüminesans immünassay yöntemi ile yapıldı. Tekrarlanabilirlik, kalite kontrol ve kalibratör materyallerinden kaynaklanan standart belirsizlikler hesaplandıktan sonra her bir değer in karesi toplandı ve bu değerin karekökü alınarak bileşik belirsizlik bulundu. Bileşik belirsizlik kapsam faktörü (k=2; güven aralığı, %95) ile çarpıldığında genişletilmiş belirsizlik elde edildi. 7922 adet 1 yıllık D vitamini sonucu 0-24, 25-49, 50-74, 75-150 nmol/L seviyelerine ayrılarak ölçüm belirsizliğinin kesim değerlerine ve hastaların D vitamini durumuna etkileri değerlendirildi.

Bulgular: Serum 25-Hidroksivitamin D₃ testi için toplam ölçüm belirsizliği $\pm$ %24 (güven aralığı, %95) olarak bulundu. Sonuçlar, ölçüm belirsizliği eklenerek veya çıkarılarak değerlendirildiğinde, tanıs al gruplar içindeki bireylerin değişimi anlamlı idi (p<0.001).

Sonuç: 25-Hidroksivitamin D₃ immünassay yöntemlerinin, yüksek hız, kolaylık ve verimlilik sağladığını ve klinik biyokimya laboratuvarlarında iş akışını geliştirdiğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte immünassay yöntem sonuçları klinik yorumları ve hasta yönetimini anlamlı şekilde etkiliyorsa, ölçüm belirsizliği çalışmaları yapılmalıdır. Hastanın sonuçlarına ölçüm belirsizliği değerini eklemek, klinik karar verme noktasında hekimin gücünü ve laboratuvar sonuçlarında güveni artıracaktır.

Anahtar sözcükler: 25-Hidroksivitamin D; belirsizlik; immünassay

ABSTRACT

Background: It was calculated total uncertainty of measurement using the repeatability and the uncertainty arising from the commercial quality control and calibrator in the method of immunoassay 25-Hydroxyvitamin D₃ and was evaluated the potential impact of its on the decision of vitamin D status of patients.

Materials and Methods: The measurement of 25-Hydroxyvitamin D₃ was made with electrochemiluminescence immunoassay method. After repeatability, the standard uncertainty arising from the commercial quality control and calibrator were calculated, square of each value were collected and the compound uncertainty was found with the square roots of that value. The expanded uncertainty was obtained by multiplied the combined uncertainty value with a coverage factor (k=2; confidence interval, 95%). Total 7922 results of vitamin D in 1-year was divided into 0-24, 25-49, 50-74, 75-150 nmol/L and the impacts on cut-off value of the measurement uncertainty and patients' vitamin D status was evaluated.

Results: For the serum 25-Hydroxyvitamin D₃ test, the total uncertainty of measurement was found as $\pm 24\%$ (confidence interval, 95%). When results were evaluated by adding or removing uncertainty of measurement, the variation of individuals within diagnostic groups were significantly ($p < 0.001$).

Conclusion: We thought that the 25-Hydroxyvitamin D₃ immunassay methods provide greater speed, easiness, efficiency and improve work flow in the clinical laboratory. However, the uncertainty of measurement studies should be made if studied results with immunassay methods could significantly affect clinical interpretations and patient management. Adding the value of the uncertainty of measurement to the results of patient will increase the power of physician in the point of clinical decision-making and confidence in the results of laboratory.

Keywords: 25-Hydroxyvitamin D; uncertainty; immunoassay

GİRİŞ

Klinik biyokimya laboratuvarları tarafından verilen ölçüm sonucu, belirli bir miktardaki nesnenin değerinin, kısaca nesnenin ölçüm büyüklüğünün sadece bir tahminidir. Buna bağlı olarak ölçüm sonucu, ölçüm değeri ile belirsizliğinin toplamıdır (1). Uluslararası Temel ve Genel Metroloji Terimleri Sözlüğüne göre (VIM; International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology) ölçüm belirsizliği; ölçülen büyüklüğün alabileceği bütün değerlerin dağılımını içeren ve ölçüm sonucuyla rapor edilen bir parametredir. Böylelikle test sonucu ile birlikte raporlanan belirsizlik, ölçüm sonucunun doğruluğuna olan güveni artırmaktadır (2). Klinik laboratuvarlar için kalite standardı belgesi ISO 15189 (3) ve ölçüm belirsizliği konusunda genel bir konsensus belgesi olan GUM'a göre (4), her ölçüm laboratuvarı testlerinin ölçüm belirsizliğini hesaplaması gerekir. Diğer alanlardan farklı olarak; klinik laboratuvarlarda hem ölçüm belirsizliğinin çok farklı kaynakları olması, hem de klasik metrolojik yaklaşım ile tüm tıbbi testlerin ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasının çok zor olması sebebiyle

bir çok ülkede ölçüm belirsizliği hala laboratuvar test sonuçlarıyla birlikte raporlanamamaktadır.

Kliniklerde hekimlerin yorumlarını ve hasta yönetimini anlamlı şekilde etkileyebileceği için, çoğu laboratuvar testinin klinik kullanım amacına göre analitik hedefi (izin verilen toplam hatası) CLIA tarafından yayınlanmıştır (5). Özellikle klinik karar konsantrasyonlarında analitik hedefin sağlanması hasta güvenliği açısından kritiktir. Bu nedenle ölçüm belirsizliği analitik hedef içinde kalmalıdır; aksi durumda test klinik amaçla kullanılmaya uygun değildir.

Vitamin D düzeyini değerlendirmek için, 1-25 Hidroksivitamin D₃ yerine genellikle 25-Hidroksivitamin D₃ (25-OH D) ölçümü yapılmaktadır. Çünkü, 25-OH D daha uzun yarı ömre sahiptir ve dolaşımda yaklaşık 1000 kat daha fazla miktarda bulunmaktadır. Düşük 25-OH D düzeyi, sıklıkla bilinen rikets ve osteomalazi dışında, kanser, kardiyovasküler hastalık, multipl skleroz, romatoid artrit ve Tip 1 diyabetes mellitus gibi hastalıklarla birlikte (6). Hastalık ve risk faktörü gözet-

meksizin genel olarak değerlendirildiğinde, sağlıklı kişilerde 25-OH D düzeyinin 75-150 nmol/L'nin üzerinde olması tercih edilir (7).

25-OH D ölçümünde yöntemler arası farklılıkların olması ve kalibratörlerde standardizasyon yokluğu tek bir kesim noktasının belirlenmesinde zorluk yaratmakta ve laboratuvarlar arası farklılıklara yol açmaktadır. Ayrıca 25-OH D'nin analitik (8), biyolojik (9) ve mevsimsel (10) değişkenliği ölçüm belirsizliğine katkıda bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, 25-OH D'nin elektrokemilüminesans immünassay (ECLIA) yöntem ile ölçümünde tekrarlanabilirlik, kalite kontrol ve kalibratör materyallerinden kaynaklanan ölçüm belirsizliğini hesaplamak ve bunun hastaların D vitamini durumu kararına olası etkilerini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

25-OH D ölçümü

Elecsys 2010 otoanalizöründe (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ECLIA yöntemi ile orijinal reaktifler (05894913, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem, LC-MS/MS izlenebilir SRM 972 kalibratörü kullanılarak standardize edilmiştir. Yöntemin Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) Protokollerine (EP5-A2) göre tekrarlanabilirlikleri tayin edildi. Çalışma içi ve günler arası tekrarlanabilirlikler, sırasıyla %1.7, %7.8 saptandı.

Toplam ölçüm belirsizliğinin hesaplanması

Bu çalışmada Eurachem/CITAC Guide CG 4 "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement" (QUAM) göre istatistiksel yöntemlerle değerlendirilen belirsizlik değeri olan Tip A belirsizlik (tekrarlanabilirlik) ve istatistiksel olmayan yöntemlerle değerlendirilen belirsizlik değeri olan Tip B belirsizlik (kalite kontrol ve kalibratör materyallerinden kaynaklanan belirsizlik) ele alındı (2).

Standart ölçüm belirsizlikleri şu şekilde hesaplandı

- **Tekrarlanabilirlik (Rep)** için, aynı serum havuzunda yapılan tekrarlanabilirlik çalış-

masında (n=25) toplam varyasyon katsayısı (CV) = rölatif standart sapma (RSD) değerleri bulundu. Verilerinin Shapiro-Wilks testi ile normal dağılıma uyduğu tespit edildiğinden (p=0.445) standart belirsizlik (U_{Rep}), ölçüm sonuçlarının RSD'sinin $\sqrt{n}$ 'e bölümü şeklinde hesaplandı (Tip A).

$$U_{Rep} = RSD / \sqrt{n}$$

- **Kalibratör belirsizliği** için, Vitamin Total CalSet (Cal) (05894921, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kalibratörüne ait üretici firmanın vermiş olduğu belirsizlik değerleri kullanıldı. 4.98 nmol/L konsantrasyonu olan 25-OH D kalibratörü (Cal₁) için belirsizlik değeri 1.58 nmol/L ve 114.75 nmol/L konsantrasyonu olan 25-OH D kalibratörü (Cal₂) için belirsizlik değeri 7.72 nmol/L idi. Yanlılıktan kaynaklanan belirsizliği hesaplamak için dış kalite kontrol materyalleri kullanılabileceği gibi sertifikalı referans materyaller ya da izlenebilir kalibratörler kullanılabilmektedir (11,12). Bu sebeple dış kalite kontrol verileri yerine izlenebilir ticari kalibratör verileri kullanılmıştır.

C_{Cal} : kalibratör konsantrasyonu, U_{Cal} : sertifikada yer alır, k; kapsam faktörü ve %95 güven aralığı için k=2 dir. Güven aralığı belirtildiği için verilerin normal dağılıma uyduğu varsayıldı (Tip B).

$$\text{Rölatif } U_{Cal} = (100 \times U_{Cal}) / (k \times C_{Cal})$$

$$U_{Cal} = \sqrt{[(U_{Cal1})^2 + (U_{Cal2})^2] / 2}$$

- **Kontrol belirsizliği** için; üç farklı seviyedeki PreciControl (PC) Bone Vit D Total (11972227, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kontrollerine ait üretici firmanın vermiş olduğu belirsizlik değerleri kullanıldı. 38.25 nmol/L konsantrasyonu olan PreciControl (PC₁) için belirsizlik değeri 3.93 nmol/L, 75.75 nmol/L konsantrasyonu olan PreciControl (PC₂) için belirsizlik değeri 5.43 nmol/L ve 123.75 nmol/L konsantrasyonu olan PreciControl (PC₃) için belirsizlik değeri 3.70 nmol/L idi.

U_{PC} : kontrol konsantrasyonu, U_{PC} : sertifikada yer alır, k; kapsam faktörü ve %95 güven aralığı için k=2 dir. Güven

aralığı belirtildiği için verilerin normal dağılıma uyduğu varsayıldı (Tip B).

$$\text{Rölatif } U_{PC} = (100 \times U_{PC}) / (k \times C_{PC})$$

$$U_{PC} = \sqrt{[(U_{PC1})^2 + (U_{PC2})^2 + (U_{PC3})^2] / 3}$$

Bileşik ve genişletilmiş ölçüm belirsizlikleri şu şekilde hesaplandı

Bileşik belirsizlik (U_c): Bütün standart belirsizlikler bulunduğundan sonra her bir değerin karesi toplandı ve karekökü ile bileşik belirsizlik değeri bulundu.

$$U_c = \sqrt{[(U_{Rep})^2 + (U_{Cal})^2 + (U_{PC})^2]}$$

- **Genişletilmiş belirsizlik (U_x):** Bileşik belirsizlik değerini %95 güven aralığında kapsam faktörü ($k=2$) ile çarptığımızda genişletilmiş belirsizlik değeri elde edildi (13). Herhangi bir ölçüm sonucu (M) için $M \pm (\%U_x) \cdot M$ şeklinde rapor edildi.

$$U_x = k \times U_c$$

25-OH D vitamini test sonuçları ve ölçüm belirsizliğinin olası etkilerinin saptanması

Temmuz 2013- Temmuz 2014 tarihleri arasında raporlanan 7922 25-OH D vitamini sonucu değerlendirildi. Test istemi yapılan olguların yaş, cinsiyet, istem yapılan klinikler ve yetersiz 25-OH D düzeyine (<75 nmol/L) sahip hastaların yaş dağılımı saptandı. 25-OH D değerleri, 0-24, 25-49, 50-74, 75-150

nmol/L olarak düzeylere ayrılarak belirsizlik değerleri dahil edilerek gruplar arası değişimler değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler için ticari SPSS 15.0 programı kullanıldı. 25-OH D düzeylerinin 75 nmol/L olduğu değerlerde ölçüm belirsizliğine göre tanısal değişikliğin anlamlılığı Ki-Kare (Mc Nemar) testi ile değerlendirildi. P değeri <0.05 için fark anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

25-OH D ölçüm belirsizliği bileşenleri Tablo I'de gösterilmiştir. Bu çalışmada 25-OH D için U , U_c ve U_x hesaplandı. 25-OH D testi için toplam ölçüm belirsizliği %95 güven aralığında %24 olarak bulundu.

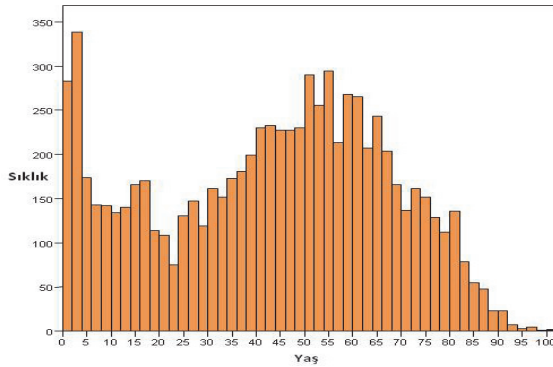
Yetersiz 25-OH D düzeyine (<75 nmol/L) sahip hastaların yaşlarının dağılımı Şekil I'de; başvurduğu kliniklerin dağılımı Tablo II'de; farklı düzey aralığındaki dağılımı Şekil II'de gösterilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 42.4 (41.9-43.0, %95 güven aralığı) ve %66.4'ü kadın, %33.6'sı erkek idi. Buna göre yetersiz düzeye sahip hastaların yaş dağılımı sıklıkla 0-5 yaş ve 40-70 yaş arasındaydı. En fazla test isteminin yapıldığı klinik iç hastalıkları, en az istemin yapıldığı klinik ise nöroloji olduğu görüldü.

Tablo I. 25-OH D ölçüm belirsizliği bileşenleri
Table I: Components of 25-OH D measurement uncertainty

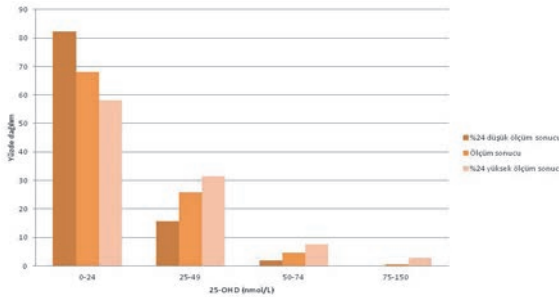
a.Tekrarlanabilirlik (U_{Rep})	1.13
$U_{Rep} = 5.64/\sqrt{25} = 1.13$	
b.Kalibratör belirsizliği (U_{Cal})	11.47
25-OH D rölatif $U_{Cal1} = (100 \times 1.58) / (2 \times 4.98) = 15.86$	
25-OH D rölatif $U_{Cal2} = (100 \times 7.72) / (2 \times 114.75) = 3.36$	
$U_{Cal} = \sqrt{[(15.86)^2 + (3.36)^2] / 2} = 11.47$	
c.Kontrol belirsizliği (U_{PC})	3.71
25-OH D rölatif $U_{PC1} = (100 \times 3.93) / (2 \times 38.25) = 5.13$	
25-OH D rölatif $U_{PC2} = (100 \times 5.43) / (2 \times 75.75) = 3.58$	
25-OH D rölatif $U_{PC3} = (100 \times 3.70) / (2 \times 123.75) = 1.49$	
$U_{PC} = \sqrt{[(5.13)^2 + (3.58)^2 + (1.49)^2] / 3} = 3.71$	
d.Bileşik belirsizlik (U_c)	12.11
$U_c = \sqrt{[(1.13)^2 + (11.47)^2 + (3.71)^2]} = 12.11$	
e.Genişletilmiş belirsizlik (U_x)	24.22
$U_x = 2 \times 12.11 = 24.22$	
Test sonuçları (M) için rapor formülü	$M \pm (M \times 0.24)$

Tablo II. Yetersiz 25-OH D düzeyine (<75 nmol/L) sahip hastaların başvurduğu kliniklerin dağılımı
Table II. Distribution of clinics that patients with insufficient 25-OH D levels applied.

Klinik	n	%
İç hastalıkları	1799	22.84
Fizik tedavi ve rehabilitasyon	1598	20.29
Çocuk hastalıkları	1537	19.51
Enfeksiyon hastalıkları	1364	17.32
Anestezi yoğun bakım	339	4.30
Allerji	166	2.11
Endokrinoloji	155	1.97
Romotooloji	81	1.03
Nefroloji	135	1.71
Nöroloji	122	1.55
Diğer	629	7.37
Toplam	7922	100



Şekil 1. Yetersiz 25-OH D düzeyine (<75 nmol/L) sahip hastaların yaşlarının dağılımı
Figure 1. Distribution of patient ages with insufficient 25-OH D levels (<75 nmol/L).



Şekil II. Ölçüm belirsizlikleri ile birlikte farklı düzey aralığındaki 25-OH D düzeylerinin dağılımı
Figure II. Distribution of different range 25-OH D values with the measurement uncertainty

Son bir yıl içinde retrospektif olarak değerlendirilen sonuçların %68'i (n=5460) şiddetli

eksiklik düzeyinde iken sonuçlar 25-OH D - Belirsizlik durumunda şiddetli eksikliği olanlar %82'ye (n=6527) yükseldi ve 25-OH D + Belirsizlik durumunda ise %58'e (n=4609) düştü. Belirsizliğin eklenerek ve çıkarılarak değerlendirildiğinde, tanısal gruplar içindeki kişilerin sayısal değişimi anlamlı olarak bulundu (p<0.001).

TARTIŞMA

25-OH D hidrofobik yapısı ve D vitamini bağlayan proteine yüksek afinitesi nedeniyle ölçümü kolay bir analit değildir (14). 25-OH D testinin farklı çalışma yöntemlerinde standardizasyonun olmaması hekimin test sonuçlarını değerlendirmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca 25-OH D için farklı kesim noktalarına göre değerlendirilen sonuçların terminolojisi ve yorumu da değişmektedir (15).

Yaptığımız çalışmada 25-OH D için ölçüm belirsizliği %24 olarak bulundu. 25-OH D için toplam izin verilen hata ± 3.0 ng/mL veya %25 dir. Bulduğumuz ölçüm belirsizliği izin verilebilir hatadan düşük olduğu saptandı. Ong ve arkadaşlarının dört farklı ölçüm sisteminin doğruluğunun incelendiği çalışmada çoğu yöntemin izin verilebilir hata kriterini karşılamadığı bulunmuştur. Bunun nedeni olarak da, vitamin D bağlayıcı protein ekstraksiyon yöntemlerinin, 25-OH D ve metabolitleri ile çapraz reaksiyonunun ve matriks interferansının farklı olması ve standardizasyon yokluğu kabul edilmiştir (16).

Ölçüm belirsizliği değeri eksiklik grubunda eklendiği veya çıkarıldığında (Tablo 3) elde edilen yeni değerlere göre hastaların tanısal yaklaşımları şiddetli eksiklikten yeterli düzeye kadar olan aralıklarda değişim gösterebilmektedir. Örneğin sonucu 27 nmol/L olan bir kişinin eksiklik durumu belirsizlik değerine (27 ± 6.5 nmol/L) göre klinik olarak şiddetli eksiklik ya da 46 nmol/L sonucu olan bir kişinin eksiklik durumu belirsizlik değerine (46 ± 11 nmol/L) göre klinik olarak yeterli yorumlanabilir.

Tablo III. 25 OH D'nin ölçüm belirsizliği değerlerine göre sağlık durumunun (10) değişimi
Table III. Change of health according to the 25 OH D measurement uncertainty values.

Sağlık Durumu	25-OH D (nmol/L), n (%)	25-OH D - Belirsizlik (nmol/L), n (%)	25-OH D + Belirsizlik (nmol/L), n (%)
Şiddetli eksiklik (≤ 25 nmol/L)	5460 (68)	6527 (82)	4609 (58)
Eksiklik (25-50 nmol/L)	2043 (26)	1238 (16)	2497 (32)
Yetersizlik (50-75 nmol/L)	373 (5)	157 (2)	591 (7)
*İstenen düzey (75-150 nmol/L)	46 (1)	0 (0)	225 (3)
Toksosite (≥ 150 nmol/L)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Toplam	7922 (100)	7922 (100)	7922 (100)

*Hastalarımızın rapor sonuçları 75 nmol/L kesim değerine göre değerlendirilmiştir.

Günümüzde dünyada 1 milyondan fazla kişinin 25-OH D düzeyinin 50 nmol/L'den daha düşük olduğu tahmin edilmektedir (17). Çalışmamıza göre kişilerin %94'ünün 25-OH D eksikliği (< 50 nmol/L) bulunmaktadır. Uçar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hastaneye başvuran hastaların (n=513) kesim sınırı 50 nmol/L ele alındığında yüksek oranda (%72.5) D vitamini eksikliği tespit edilmiştir (18). Çidem ve arkadaşları ise yaygın kas-iskelet sistemi ağrıları olan hastalarda (n=8457) D vitamini eksikliği prevalansını %71.7 olarak bulmuştur (19). Çalışmamızda görülen 25-OH D eksikliği (< 50 nmol/L) oranı %94.7 olarak tespit edilmiştir. Hastaneye başvuran kişilerin tamamına yakınının 25-OH D yetersizliği tespit edilmekle birlikte popülasyonda görülme sıklığı merak uyandırmaktadır. Hekimsoy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre Manisa'da erişkin popülasyonun (n=391) sadece %11'i 25-OH D yeterli düzeye (> 75 nmol/L) sahiptir (20). Oranların çalışmamızda diğer çalışmalara göre yüksek olmasının sebebi, hastanemizin organ nakli merkezinin olması nedeniyle böbrek yetmezliği hasta grubunun olması ve soysa-ekonomik düzeyin çok daha düşük olan popülasyonuna hizmet vermesi olabilir.

25-OH D eksikliğindeki oran yüksek olduğundan ve son yıllarda teste olan ilgi arttığında klinik laboratuvarlar, iş yükünü azaltmak amacıyla otomatize ölçüm sistemlerini tercih etmeye başlamışlardır. Bunun sonucu olarak da ölçümler arası varyasyon % 25' lere (özellikle düşük serum düzeylerinde), ölçüm içi varyasyon ise %10'lara ulaşmıştır (8).

Cavalier ve arkadaşları, 25-OH D ölçüm belirsizliği için Roche Elecsys cihazında düşük, orta ve yüksek düzeyde serum havuzu kullanarak yaptıkları çalışmada ortalama (nmol/L) ve rölatif belirsizlik değerlerini bizim çalışmamıza benzer şekilde sırasıyla 35.7 (%22.4), 70.9 (%20.9), 100.5 (%14.8) olarak bulmuşlardır (21). Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) ise 25-OH D için kabul edilebilir hatayı; ölçüm sonucu 20 nmol/L üzerinde ise ± 15 nmol/L olarak bildirmiştir (22). RCPA' a göre 75 ± 15 nmol/L şeklindeki kabul edilebilir hata aralığı, bulduğumuz 75 ± 18 nmol/L belirsizlik değerine yakındır.

Diğer önemli hususlardan biri de 25-OH D "eksikliği" veya "yetersizliği" tanısını koymada analitik varyasyonun yanı sıra biyolojik varyasyon da gözönünde bulundurulmalıdır. Binkley ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 25-OH D için biyolojik varyasyon %20, sistematik bias ise %17 olarak belirtilmiştir (23). Çalışmamızda biyolojik varyasyona bağlı belirsizlik ele alınmamıştır.

Ölçüm belirsizliği çalışma grubu; ölçüm belirsizliğini kısa yoldan hesaplayabilmek için $\pm 1.96 \times CV$ formülünün kullanılmasını önermektedirler (24). Böylelikle, örnek hazırlama, kullanılan cihaz, kit ve kalibratörler ile çevresel faktörlerin zaten CV'nin içinde olduğu kabul etmişlerdir. Wagner ve arkadaşlarının çalışmasında 25-OH D'nin CV değerini %14.5 olarak bulmuşlardır (25). Yukarıdaki formüle göre $1.96 \times \%14.5 = \%28.4$ değeri bizim çalışmamızdaki belirsizlik değerini kapsamaktadır. Benzer şekilde 2010 yılında farklı yön-

temlerle çalışan laboratuvarların karşılaştırıldığı "NIST/NIH Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program (VitDQAP)" programında 25-OH D ölçümlerinin CV'si %12 olarak bulunmuştur (26).

Binkley ve arkadaşları laboratuvarların ölçüm ortalamaları arasındaki farkın %50'ye ulaşabildiği, laboratuvarın kullandığı yöntem ve kesim sınırına göre bir laboratuvar da normal aralıkta bulunan değerlerin bir başka laboratuvar da yetersiz olarak değerlendirildiğini bildirmiştir (27). Hastalarda "25-OH D eksiklik" tanısının konması klinik durum kadar ölçüm sonucuna bağlı olduğundan yöntemler arası geniş ölçüm farklılıkları ve sonuçlara ölçüm belirsizliği eklenmemesi nedeniyle, laboratuvarlar arası karşılaştırılabilir sonuçlar günümüz koşullarında mümkün değildir (28).

Vitamin D External Quality Survey (DEQAS) tarafından, standart referans materyal olarak NIST/SRM 972 kullanılması önerilmektedir. Ayrıca DEQAS aynı yöntem ile çalışan laboratuvarlar için sonuçları standardize etmeye çalışmaktadır. Buna rağmen DEQAS' da karşılaşılan CV değerleri %10-20 arasında değişmektedir (29).

Klinik biyokimya laboratuvarlarında hasta sonuçlarına ölçüm belirsizliği değerlerinin eklenmesi klinik karar verme noktasında hekimin gücünü ve laboratuvar sonuçlarına duyduğu güveni artıracaktır. Bu nedenle, özellikle 25-OH D gibi farklı yöntemlerle çalışılan ve tedavi kararının değişebileceği testler için belirsizlik çalışmaları yapılmalıdır. Klinisyenlere gönderilecek raporlarda, test sonuçlarının gerçek değeri ne ölçüde temsil ettiğini gösteren ölçüm belirsizliği değeri de eklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Taylor BN, Kuyatt CE. National Institute of Standards and Technology (NIST) Technical Note 1297. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. 1994 ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1994. p.1-2.
2. EURACHEM/CITAC Working Group. Uncertainty. Ellison SLR, Williams A, eds. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Eurachem/CITAC CG 4, 3rd ed. UK; 2012. p.4-6.
3. ISO 15189:2007-Medical Laboratories-Particular requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes, 2007.
4. Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. ISO, Geneva, Switzerland, 1993.
5. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) proficiency testing criteria for acceptable analytical quality. Fed Reg 1992;57(40): 7002-186.
6. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2004; 80: 1678- 88.
7. Phillips KM, Byrdwell WC, Exler J, Harnly JM, Holden JM, Holick MF. Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D₃ in selected US foods. Journal of Food Composition and Analysis 2008; 21: 527-34.
8. Health Quality Ontario. Clinical utility of vitamin D testing: an evidence-based analysis. Ont Health Technol Assess Ser 2010; 10(2): 1-93.
9. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of areference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. Clinica Chimica Acta 2009; 408: 8-13.
10. Snellman G, Melhus H, Gedeberg R, Byberg L, Berglund L, Wernroth L. Determining Vitamin D status: A comparison between commercially available assays. PloS ONE 2010; 5(9): 10.1371.
11. Moses G, Crawford L. Traceability and Uncertainty of Measurement for Medical Laboratories. Quality Management Program-Laboratory Services (QMP-LS), Ontario Laboratory Accreditation Division (OLA) 2009; 4-11.
12. Martens R, Volder F, Poorter G. Estimating Measurement Uncertainty In Quantitative Chemical Analysis. Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) 2008; 5-17.
13. Farrance I, Frenkel R. Uncertainty of Measurement: A review of the rules for calculating uncertainty components through functional relationships. Clin Biochem Rev 2012; 33(2): 49-75.
14. Chen Y, Kinney L, Božović A, Smith H, Tarr H, Diamandis EP et al. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur and Roche Modular Analytics E170 Total 25-OH Vitamin D assays. Clin Biochem 2012; 45(16-17): 1485-90.
15. Wimalawansa SJ. Vitamin D in the New Millennium. Curr Osteoporos Rep 2012; 10(1): 4-15.
16. Ong L, Saw S, Sahabdeen NB, Tey KT, Ho CS, Sethi SK. Current 25-hydroxyvitamin D assays: do they pass the test? Clin Chim Acta 2012; 413(13-14): 1127-34.
17. Vitamin D nutritional policy in Europe. CPME 2009/179 Final EN.
18. Uçar F, Taşlıpınar MY, Soydaş AO, Özcan N. Ankara Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesine Başvuran Hastalarda 25-OH Vitamin D Düzeyleri. Eur J Basic Med Sci 2012;2(1):12-5.
19. Çidem M, Kara S, Sarı H, Özkaya M, Karacan İ. Yaygın kas-iskelet ağrısı olan hastalarda D vitamini eksikliği prevalansı ve risk faktörleri. Journal of Clinical and Experimental Investigations 2013; 4 (4): 488-491.

20. Hekimsoy Z, Dinç G, Kafesçiler S, Onur E, Güvenç Y, Pala T, Güçlü F, Özmen B. Vitamin D status among adults in the Aegean region of Turkey. BMC Public Health 2010; 10: 782.
21. Cavalier E, Rozet E, Gadisseur R, Carlisi A, Monge M, Chapelle JP et al. Measurement uncertainty of 25-OH Vitamin D determination with different commercially available controls: Impact on the clinical cut offs. Osteoporos Int 2010; 21(6): 1047-51.
22. Jones GRD, Sikaris K, Gill J. Allowable Limits of Performance' for External Quality Assurance Programs-an Approach to Application of the Stockholm Criteria by the RCPA Quality Assurance Programs. Clin Biochem Rev. 2012; 33(4): 133-9.
23. Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK. Correlation among 25-hydroxy-vitamin D assays. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(5): 1804-8.
24. White GH, Farrance I, AACB Uncertainty of Measurement Working Group. Uncertainty of Measurement in Quantitative Medical Testing - A Laboratory Implementation Guide. Clin Biochem Rev 2004; 25(4): S1-24.
25. Wagner D, Hanwell HE, Vieth R. An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. Clinical Biochemistry 2009; 42: 1549-56.
26. Bedner M, Lipka KA, Tai SS. Clin Chim Acta. An assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability studies conducted by the Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program 2013; 426: 6-11.
27. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: A call for standardization. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(7): 3152-7.
28. Lamberg-Allardt C, Brustad M, Meyer HE, Steingrimsdottir L. Vitamin D - a systematic literature review for the 5th edition of the Nordic Nutrition Recommendations. Food Nutr Res 2013; 3: 57.
29. Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J. How Accurate Are Assays for 25-Hydroxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality Assessment Scheme. Clin Chem 2004; 50(11): 2195-7.

Yazışma adresi:

Fatma Demet İnce
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye
E-posta: fatmademet.arslan@gmail.com
