

# Talasemi Taramasında HbA2'nin Ölçüm Belirsizliği

## *Measurement Uncertainty of HbA2 in Thalasemia Screening*

Hamit Yaşar Ellidağ\*      Esin Eren\*\*      Özgür Aydın\*      Funda Savaş\*  
Necat Yılmaz\*

\* Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Antalya, Türkiye

\*\* Antalya Atatürk Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Antalya, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 13.01.2014

**Kabul Tarihi:** 03.04.2014

### ÖZET

**Amaç:** Hemoglobinopati taraması için hemoglobin alt tiplerini ayırmada HPLC (High Performance Liquid Chromatography) yaygın kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda talasemi taramasında önemli bir belirteç olan HbA2 parametresinin ölçüm belirsizliği hesaplaması yapılarak, bu belirsizliğin HbA2 sonuçlarına etkisini tespit etmeyi amaçlamıştır.

**Gereç ve yöntem:** HbA2 analizi Antalya Eğitim ve Araştırma hastanesi biyokimya laboratuvarında Tosoh HLC-723 G8 cihazında katyon değiştirici HPLC yöntemi ile yapıldı. Ölçüm belirsizliğinin hesaplanması Nordtest kılavuzuna uygun olarak hesaplandı. Ölçüm belirsizliği hesaplanmasında laboratuvarımızda uygulanan iç kalite kontrol verileri ile laboratuvarlar arası değerlendirmeye dayalı olan dış kalite kontrol verileri kullanıldı.

**Bulgular:** HbA2 için ölçüm belirsizliği %95 güven aralığında  $\pm\%12.4$  olarak bulundu. laboratuvarımızda talasemi taramasının pozitif sonucu için HbA2'nin cut-off değeri %3.5'tur. Cut-off değerimiz ölçüm belirsizliği ile birlikte  $\%3.5\pm0.4$  olarak rapor edilebilir.

**Sonuçlar:** HbA2 talasemi taramasında önemli bir parametre olmasına rağmen literatürde bu parametrenin ölçüm belirsizliği hakkında herhangi bir yayın yoktur. Her laboratuvar kendi kalite geliştirme süreçleri içinde ölçüm belirsizlikleri tahminlerini yapması, klinisyene tanı ve tedavi noktasında katkı sağlar.

**Anahtar sözcükler:** Hemoglobin A2, yüksek basınçlı sıvı kromatografi, belirsizliği, talasemi

### ABSTRACT

**Objective:** High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is widely used to classify hemoglobin fractions in screening of hemoglobinopathies. We, here in this study, detected the "measurement uncertainty" of the pivotal parameter in thalassemia screening, namely HbA2; and assumed its value in the laboratory test results.

**Materials and Methods:** HbA2 analysis was measured by HPLC analyser Tosoh HLC-723 G8 instrument, which works in cation exchange principle, in Antalya Research and Education Biochemistry Laboratory. Measurement uncertainty calculations were made according to the Nordtest manuals, using internal, and external quality control values.

**Results:** The measurement uncertainty for HbA2 was  $\pm 12.4\%$  within a 95% coverage probability. The cut-off value used in our laboratory for a positive screening result is 3.5%. Our cut-off value should better be presented as  $3.5 \pm 0.4\%$  after the measurement uncertainty is included.

**Conclusions:** Although HbA2 measurement is important parameter in the screening of thalassemia, the literature lacks studies of measurement uncertainty of this parameter. Each laboratory should define their own measurement uncertainties not only to set their quality goals, but also in order to verify their capability to aid in clinical decisions.

**Key words:** Hemoglobin A2, high pressure liquid chromatography, uncertainty, thalassemia

## GİRİŞ

Talasemi, dünyada en yaygın genetik hastalıklar arasındadır ve dünya nüfusunun yaklaşık %1.5  $\beta$ -talasemi taşıyıcısıdır. Hemoglobinin yapısında bulunan globin zincirlerinin biri ya da daha fazlasının üretiminin azlığı veya yokluğu ile karakterize olan bu hastalık otozomal resesif olarak geçer (1,2). Talasemi tanısı ve taramasında hemoglobinin alt tiplerinin ayrıştırılması ve değerlendirilmesi önemlidir (3). Günümüzde hemoglobinin alt tiplerinin ayrımı için birçok metot kullanılmaktadır. Bu metotlar; selüloz asetat elektroforezi, kromatografik mikro-kolonlar, immünofiksasyon elektroforezi, kapiller elektroforez ve katyon değiştirici HPLC olarak sıralanabilir (4).

HPLC, hemoglobinin A2 (HbA2), hemoglobinin F (HbF) ve hemoglobinin A0 (HbA0) yanında Hemoglobinin S (HbS) gibi patolojik hemoglobinin alt tiplerini ayırmada güvenilir, altın standart bir yöntemdir (5,6).  $\beta$ -Talasemi taşıyıcılarını saptamada HbA2 değerleri çok önemlidir.  $\beta$ -talasemi taşıyıcılarında, kullanılan metoda bağlı olmakla birlikte %3.5 ile %4 arasında değişen oranlarda yükselmiş HbA2 değerlerine rastlanır (7).  $\beta$ -talasemi ve diğer hemoglobinopati tarama ve tanısında genel olarak izlenen yol; hemoglobinin, hematokrit ve diğer eritrosit endekslerinin tespitinden sonra şüpheli olgularda HbF ve HbA2 analizlerini de içeren hemoglobinin alt tiplerinin ayrıştırılması ve sonunda kesin tanı için DNA analizini kapsar (4,8).

İlkesel olarak hiçbir ölçümün yüzde yüz doğru kabul edilmediği ve bir analitin ölçümünün gerçek değerinin bilinmediği kabul edilir.

Ölçüm belirsizliğinin ölçüm prosedürü sırasında meydana gelen ve ölçüm sonucunu etkileyen faktörleri kapsar. Bir analitin ölçümünü pek çok faktör etkileyebilir. Bunlar; ölçüm yöntemi, kütle ve hacimsel belirsizlikler, matriks etkisi, interferanslar, referans materyaller ve çevresel etkiler olabilir. Bu faktörlerin ölçüme etkisinin bir bölümü rastlantısal olabildiği gibi bir bölümü de sistematik olabilir. Sonuçta toplam belirsizliğin tahmin edilebilmesi belirsizliğe katkıda bulunan her bir bileşenin ayrı ayrı ele alınmasını gerektirir (9).

Klinik biyokimya laboratuvarında genişletilmiş ölçüm belirsizliği belirleneceği zaman iki faktör önemlidir: 1-Laboratuvar içinde kesinlik 2- Uygun referans ya da kalite kontrol materyali kullanarak değerlendirilen doğruluk. Doğruluk; ölçümün sistematik hatası, kesinlik ise rastlantısal hata olarak kabul edilebilir (10).

Çalışmamız talasemi taramasında önemli bir belirteç olan HbA2 parametresinin ölçüm belirsizliği hesaplaması yapılarak, bu belirsizliğin sonuçların yorumlanmasındaki önemi ve değerinin tespit etmeyi amaçlamıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

HbA2 analizi Antalya Eğitim ve Araştırma hastanesi biyokimya laboratuvarında Tosoh HLC-723 G8 cihazında katyon değiştirici HPLC yöntemi ile yapıldı.

Ölçüm Belirsizliği Hesaplaması:

Ölçüm belirsizliğinin hesaplanması Nordtest kılavuzuna göre yapıldı (11). Buna göre; laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik yanlılığı

[u(Rw)] ile yöntem ve laboratuvarın gelen yanlılığın (Uc) kombine edilmesiyle ölçüm belirsizliği hesaplandı.

Buna göre laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik yanlılığı;  $u(Rw)^2$  (analitik süreçten doğan belirsizlik) =  $(RSD_{normal\ kontrol}^2 + RSD_{patolojik\ kontrol}^2) / 2$  formülü ile hesaplandı. (9-11).

U yanlılık ise;  $U\ yanlılık^2 = uCref^2 + uEQA^2$  formülünden hesaplandı.

## BULGULAR

### u(Rw)'nin hesaplanması:

Normal ve patolojik (TOSOH HbA2 Control, Lot No:1024, Tosoh Bioscience, SF USA) düzeylerdeki son 40 çalışmaya ait iç kalite kontrol sonuçları toplandı ve her biri için rölatif standart deviasyon [ $RSD = \%CV$  (variyasyon katsayısı) =  $100 \times (\text{ölçümün standart sapması} / \text{ölçüm ortalaması})$ ] değerleri hesaplandı (RSD normal, RSD patolojik) (Tablo-1).

### b- Laboratuvar ve yöntem yanlılık ölçüm belirsizliği (U yanlılık veya Uc)

Yanlılık, ölçüm sonucunun, gerçek olduğu var sayılan değer ile arasındaki farktır. Temel olarak sertifikalı referans materyalinden kaynaklanır. Bir ölçüm parametresine ait yanlılık tespit edilmiş ve anlamlı bulunmuşsa mutlaka düzeltilmelidir. Bu değer sıfır bile olsa belirsizlik bileşeni olarak dikkate alınması gereklidir (9,12). Diğer yonden, klinik laboratuvarlarda eksternal kalite kontrol verileri de yanlılık hesaplanmasında kullanılabilir. Bu şekilde hem kalibratör hem de metot kaynaklı hata olasılıkları tahmin edilmiş olacaktır.

Yöntem ve laboratuvar yanlılığından gelen belirsizlik tahmininde; kalibratörün belirsizliği (uCref) ile birlikte farklı seviyelerdeki analitlerle en az 3 katılımlı dış kalite kontrol (EQA) performans verilerinden elde edilen belirsizlik (uEQA) yer alır (9,11,12).

### b1. Kalibratörden gelen belirsizlik (uCref)

Kalibratör olarak 8BCAL01W lot numaralı G8 Hemoglobin F&A2 kalibratör (TOSOH CORPORATION) kullanıldı. Bu çalışmada üretici tarafından sağlanan, %5.3 konsantrasyonu olan HbA2 kalibratöründen gelen belirsizliğinin [uCref 0.066% (WHO Reference Reagent International Reference Reagent for Haemoglobin A2 NIBSC code: 89/666) ] rölatif değeri kullanıldı.

Rölatif uCref =  $(100 \times uCref) / (k \times Cref)$

HbA2 rölatif uCref =  $(100 \times \%0.066) / (2 \times \%5.3)$

HbA2 rölatif uCref = 0.62, HbA2 rölatif uCref<sup>2</sup> = 0.38

Cref; Kalibratör konsantrasyonu, uCref; sertifikada yer alır, k; kapsam faktörü, ek bilgi verilmedikçe %95 güven aralığı kullanıldı için 2'dir.

### b2. Dış kalite kontrol performans verilerinden elde edilen belirsizlik (uEQA)

EQA ile yanlılık, test sonucunun karşılaştırılma yapılan grubun test sonuç ortalamalarından sapma yüzdesi [ $=(\text{test sonucu} - \text{karşılaştırılan grup ortalaması} / \text{karşılaştırılan grup ortalaması}) \times 100$ ] olarak hesaplanır. Değerlendirmeye alınan her bir EQA raporu ile laboratuvarın genel performans verilerinden doğan belirsizlik için aşağıdaki eşitlik kullanılır.

$$uEQA = \sqrt{(\sum \text{yanlılıkEQA}^2) / n}$$

$$uEQA^2 = (\sum \text{yanlılıkEQA}^2) / n$$

n: EQA değerlendirme sayısı

Serum HbA2 düzeyi dış kalite kontrol performans verilerinden elde edilen belirsizliği laboratuvarımızın dahil olduğu Eqas EQA programından 10 analiz sonucuna göre belirlendi (Tablo 2).

**Tablo-1.** u(Rw)<sup>2</sup> hesaplanması

	Normal kontrol (40) 2.2 (1.8-2.6)*	Patolojik kontrol (40) 6.8 (5.4-8.1)*
Ortalama	2.1	6.7
Standart sapma	0.02	0.07
RSD	$(0.02/2.1) \times 100 = 0.9$	$(0.07/6.7) \times 100 = 1$
u(Rw) <sup>2</sup>	$(0.9^2 + 1^2) / 2 = 0.9$	

\*ortalama (aralık), RSD; rölatif standart deviasyon, u(Rw); laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik yanlılığı.

**Tablo 2.** Dış kalite kontrol değerleri ile yanlışlık hesaplanması

EQA numunesi	HbA2 yanlışlığı (% sapma)	HbA2 yanlışlık(EQA)2
1	-4,545	20,661
2	-0,01	0,0001
3	6,707	44,988
4	1,01	1,02
5	-0,33	0,10
6	2,293	5,257
7	8,911	79,404
8	-9,427	88,868
9	-4,605	21,208
10	10,553	111,361
$\Sigma$ yanlışlıkEQA <sup>2</sup>		372,867
$uEQA^2 = (\Sigma yanlışlıkEQA^2)/n$		37,3

EQA: Dış Kontrol Değerleri

Kalibratör ve EQA performans verileri ile hesaplanan laboratuvar ve yöntem yanlışlığı;

$$U_{yanlışlık}^2 = UC_{ref}^2 + uEQA^2$$

$$U_{yanlışlık}^2 = 0.38 + 37.3$$

$$U_{yanlışlık} = 37.68 \text{ olarak bulundu.}$$

### Birleşik ölçüm belirsizliği (Uc)

Elde edilen verilerle aşağıdaki eşitlik yardımıyla HbA2 değerinin birleşik ölçüm belirsizliği hesaplandı.

$$Uc = \sqrt{[u(Rw)^2 + u_{yanlışlık}^2]}$$

$$Uc = \sqrt{(0.9 + 37.68)}$$

$$Uc = 6.2$$

### Genişletilmiş ölçüm belirsizliği (U)

Genişletilmiş ölçüm belirsizliği bileşik ölçüm belirsizliğinin kapsam faktörü (k) ile çarpılmasıyla elde edilir. k faktörü %95 güven aralığını temsil eden 1.96 yaklaşık 2 olarak alınır.

$$U = 2\sqrt{[u(Rw)^2 + U_{yanlışlık}^2]}$$

$$U = 2 \times 6.2$$

$$U = 2 \times 6.2$$

$$U_{HbA2} = \%12.4$$

### SONUÇ

Laboratuvarımızda talasemi taramasının pozitif sonucu için HbA2'nin cut-off değeri %3.5'tur. Hesapladığımız ölçüm belirsizliğine göre bu cut-off değere etki eden ölçüm belirsizliği  $3.5 \times \%12.1 = 0.4$ 'tür. Cut-off değerimiz ölçüm belirsizliği ile birlikte  $\%3.5 \pm 0.4$  olarak rapor edilebilir.

### TARTIŞMA

HbA2'nin ölçüm belirsizliğini hesapladığımız bu çalışmada, HbA2 için birleşik ölçüm belirsizliği %12.4 olarak hesaplanmıştır. Ölçüm belirsizliği hesaplanmasında laboratuvarımızda uygulanan iç kalite kontrol verileri ile laboratuvarlar arası değerlendirmeye dayalı olan dış kalite kontrol verileri kullanılmıştır.

HPLC, HbA2 tespitinde altın standart bir yöntemdir (5,6). Gerçekten de yaptığımız kesinlik çalışması sonunda %0,9 ile %1 gibi iyi %CV değerleri elde ettik. Bu şekilde laboratuvardaki bir ölçümün kesinliğini tespit etmek kolayken, doğruluğu tespit etmek daha zordur. Ölçülen parametreye ait referans madde bulmak her zaman mümkün değildir. Bunu için klinik biyokimya laboratuvarları ölçümün doğruluğunu tahmin etmek için dış kalite programları kullanırlar. Böylelikle belirli bir parametrenin dış kalite kontrol programına katılan başka laboratuvarlara ait sonuçların dağılımı ile karşılaştırabilirler. Dış kalite kontrol programı bir parametrenin veya parametrelerin sistematik hatasını tespit etmede iyi bir yöntem olmasına rağmen, dış kalite kontrol sonuçlarının değerlendirilmesinin zaman alması, dış kalite programına katılan laboratuvarların sayısı, dış kalite kontrol materyelinin transportunda ve yanlış sulandırılmasındaki hatalar, matriks etkisi, yanlış raporlandırma, analiz sırasında meydana gelen hatalardan dolayı her zaman iyi performans gösteremeyebilir (10,11). Bizim çalışmamızda UEQA'nın yüksek çıkması dış kalite materyelinin analizi sırasında

meydana gelen hatalardan dolayı olabilir. Yine tam bir ölçüm değerlendirme prosedürünün yapılması ve belirsizliğin saptanması için başka primer referans maddelere ihtiyaç vardır.

Yaptığımız bu çalışmada talasemi pozitifliği için HbA2'nin ölçüm belirsizliği ile beraber cut-off'u  $3.5 \pm 0.4$ 'tür. Buna göre Tosoh cihazı %3.1 ile %3.9 arasında bir doğru ölçüm aralığı belirler. Buna göre, laboratuvarımızın klinisyenlerimize yaptığı tavsiye; eğer hastada anemi yok ama MCV ve MCH değerleri düşük ve HbA2 değerleri 3 ile 3.5 arasında ise talasemi taraması için daha ileri tetkikler istemeleri yönündedir. Çünkü Mosca A. (13) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre HbA2'si sınır değerlerde olan talasemi taşıyıcılarının nadir olmadığı görülmüştür. Yine aynı şekilde HbA2 değeri 3.5 ile 3.9 çıkan hastalardan yapılan ileri tetkikler gereksiz maliyet ve zaman kaybına yol açabilir.

Sonuç olarak, HbA2 talasemi taramalarında hayati bir öneme sahiptir. Yanlış negatif sonuçlar istenmeyen sonuçlar doğurabilir. HbA2 talasemi taramasında önemli bir parametre olmasına rağmen literatürde bu parametrenin ölçüm belirsizliği hakkında herhangi bir yayın yoktur. Her laboratuvar kendi kalite geliştirme süreçleri içinde ölçüm belirsizlikleri tahminlerini yapması, klinik karar verme noktasında klinisyene tanı ve tedavi noktasında yardımcı olur.

#### KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problems. *Bull WHO* 2001; 79: 740-1.
2. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes 2001; pp.1-3 4th ed. Oxford: Blackwell Science LTD, Publication.
3. Merono F, Agouti I, Bonello-Palot N, Paolasso C, Levy N, Badens C. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassaemia mode. *Clinical Biochemistry* 2011; 44: 441-3.
4. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. *Clinical Biochemistry* (2009); 42: 1786-96
5. Colah RB, Surve R, Sawant P, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr* 2007; 74: 657-62.
6. Van Kirk R, Sandhaus LM, Hoyer JD. The detection and diagnosis of hemoglobin A2 by high-performance liquid chromatography. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 657-61.
7. Wild BJ, Bain BJ. Investigation of abnormal hemoglobins and thalassaemia. In (Eds. Lewis SM, Bain BJ, Bates I). *Dacie & Lewis Practical Hematology* 2001; pp. 231-268. 9th ed. Churchill Livingstone.
8. Ellidağ HY, Eren E, Tosun SA, Yılmaz N. Talasemi Taramasında Primus Ultra2 Analyzer ve Tosoh HLC-723 G8 HPLC Sistemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2013; 11(3): 99-104.
9. Çelebier A, Serin H, Güleç D, Karaca B. Klinik biyokimya laboratuvarında ölçüm belirsizliği: pratik uygulama. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2011; 36(4): 362-366.
10. Helm I, Jalukse L, Leito I. Measurement uncertainty estimation in amperometric sensors: a tutorial review. *Sensors (Basel)*.2010;10(5):4430-55
11. Magnusson B, Ossowicki H, Rienitz O, Theodorsson E. Routine internal- and external-quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012; 72(3): 212-20.
12. Şentürk BA, Kaplan YC, Yiğitbaşı T, Karadaş B, Zorlu N, Sütçü R. Esrar (cannabis) ve opiyat testleri için ölçme belirsizliği değerinin saptanması ve klinik karar değerine etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2013; 38(2): 181-5.
13. Mosca A, Paleari R, Galanello R, Sollaino C, Perseu L, Demartis FR, et al. IFCC Working Group on Standardization of HbA2. New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassaemia. *Bioelectrochemistry*. 2008; 73(2): 137-40

#### Yazışma adresi:

Dr. Hamit Yaşar Ellidağ  
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Biyokimya Laboratuvarı, Antalya, Türkiye  
Tel: 242 2494400  
Faks: 242 2494462  
E-posta: hayael1980@hotmail.com

