

TSH Reseptör Antikoru Analizinde Manuel Ölçüm Yerine Otomatize Ölçüm Kullanılabilir mi?

Can Automated Immunassays be Used Instead of Manual Analysis for TRAb Analysis?

Ferhat Demirci* Barış Sağlam* Pınar Akan* Dilek Çımrın**

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, İzmir, Türkiye

** Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 10 Şubat 2014

Kabul Tarihi: 11 Nisan 2014

ÖZET

Amaç: Hipertiroidinin en sık sebebi olan Graves Hastalığı, tiroid hormonlarının aşırı üretimiyle sonuçlanan otoimmün bir hastalıktır. Graves hastalığının klinik tanısının doğrulanmasında TSH reseptör antikoru (TRAb) kilit role sahiptir. Bu antikorumun değişik biyoaktiviteye sahip tipleri nedeni ile farklı ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Graves tanı kılavuzlarında önerilen yöntem, radyoimmün ölçümdür (RIA). Günümüzde manuel RIA yerine immün ölçüm temelli otomatize yöntemlerin kullanımı tartışılmaktadır. Çalışmamızda TRAb analizi için geliştirilen otomatize immün ölçüm temelli bir yöntem ile referans RIA yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 55 hastaya ait serum örnekleri Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsünün hasta bazlı yöntem karşılaştırma prosedürüne uygun olarak RIA ve ECLIA yöntemiyle analiz edildi. Her iki yöntemin sabit ve rastgele hata oranları belirlenerek, tıbbi karar limitlerine göre geçerlilikleri değerlendirildi.

Bulgular: RIA yönteminin toplam hata oranı (TE) 19.81 (%), ECLIA yönteminin ise RIA referans kabul edildiğinde % 41.6 toplam hata oranına sahip olduğu görüldü. Regresyon analizi sonrasında yöntemler arasında iyi düzeyde korelasyon olduğu saptandı (r: 0.8) ancak düşük düzeylerde yöntemler arası farkın daha yüksek olduğu görüldü. Borderline sonuçlar Graves hastalığı dışında bir tiroid hastalığı olarak kabul edildiğinde ECLIA yönteminin negatif prediktif değeri % 97.8, testin geçerliliği %94.3 olarak bulundu.

Sonuç: ECLIA yöntemi RIA'a göre yüksek total hata oranına rağmen tanısız geçerliliğinin, negatif prediktif değerinin yüksek olması ve manuel yöntemlere göre daha düşük rastgele hata değerlerine sahip otoanalizörde çalışabilmesinden ötürü rutin kullanımda tercih nedeni olabilir. Diğer taraftan bu yöntemin ekipman ve sarf ihtiyaçları nedeni ile maliyet açısından değerlendirilmesi gerektiği de unutulmamalıdır.

Anahtar sözcükler: Tiroid uyarıcı hormon reseptörü; metodolojik çalışma; karşılaştırmalı çalışma; Graves hastalığı

ABSTRACT

Objective: Graves' disease is an autoimmune disease which results in excessive production of thyroid hormones and is the most common cause of hyperthyroidism. TRAb has a key role to confirm the clinical diagnosis of Graves' disease. The different measurement methods have been developed

because of the different bioactivity types of these antibodies. Radioimmunoassay (RIA) is the recommended method of measurement in Graves' diagnostic guidelines. Recently, use of immune-based automated methods instead of manually RIA measurement is discussed. In our study, we aimed to compare the availabilities of automated immunoassay and manual RIA methods for TRAb analysis.

Materials and Methods: According to "Patient Based Comparison Methods of Clinical Laboratory Standards Institute", the serum samples of 55 patients were analyzed by RIA and ECLIA methods. The systematic and random error rates were determined for both methods. The method's validities were evaluated for medical decision criterions.

Results: While total error (TE) of the RIA method was 19.81 (%), TE rate of ECLIA method was 41.6 (%). According to regression analysis, the correlation between two methods was good level ($r = 0.8$). At the lower levels of TRAb, the differences between RIA and ECLIA were higher than the others. When borderline test results were evaluated as any thyroid disease except Graves'; the negative predictive value of ECLIA method was 97.8 (%), the validity of the test was 94.3 (%).

Conclusion: ECLIA method may be preferable for routine TRAb analysis to diagnosis Graves' disease, although it has high total error rate compared to RIA. It has high diagnostic validity and negative predictive values. It is known that automated methods may have lower random error compared to manual methods. On the other hand, the cost effectiveness of automated ECLIA method should be evaluated because of its requirements such as analyzer and supplies.

Key words: Thyroid Stimulating Hormone Receptor; methodological study; comparative studies; Graves' Disease

GİRİŞ

Hipertiroidilerin en sık sebebi olan Graves Hastalığı, tiroid hormonlarının aşırı üretimiyle seyreden otoimmün bir hastalıktır. Tiroid hormonlarının tüm vücut sistemlerini etkilemesi nedeni ile, hastalık multisistemik semptomlarla karakterizedir (1). Bu geniş çeşitlilikteki semptomların varlığı yanı sıra genellikle gecikmiş tanı ve rezidüel komplikasyonlara bağlı olarak, küçümsenmeyecek sayıda Graves hastası toplumdan ve sosyoekonomik yaşamdan soyutlanmıştır (2,3).

Graves hastalığı tanısının ilk basamağını fizik muayene ile artmış kalp hızı ve boyunda tiroid bezinin büyüklüğünün tespiti ile klinik tanı oluşturur. Benzer bulguları oluşturan hipertiroidi sebeplerinin ayırıcı tanısı için öncelikle tiroid stimulan hormon (TSH) ve yanı sıra serbest tiroksin (fT4), serbest triyodotironin (fT3) ölçümlerinin değerlendirilmesi gerekir. Bir hipertiroidi nedeni olan Graves hastalığının klinik tanısının doğrulanmasında ise TSH reseptör antikoları (TRAb) kilit role sahiptir. TRAb ayrıca bilateral egzoftalmisi olan ötiroid hastaları ve antitiroid ajanlarla tedavi edilen Graves hastalarının prognozunu değerlendirilmesinde de önem taşır (4). Diğer tiroid bezi otoantikolarından olan Tiroid stimulan

immunglobulin (TSI), tiroid peroksidaz anti-kor (TPO) varlığı da sıklıkla Graves hastalığı ile beraberdir (5,6).

TSH reseptör antikoları (TRAb) değişik biyolojik aktiviteye sahip olan stimulan (TSAb) ya da blokan (TBAb) özellikli immunoglobulinlerden meydana gelir. TSAb, cAMP üretimini artırırken, TBAb inhibisyona yol açmaktadır (7). TSH'nin reseptörüne bağlanmasını inhibe eden TSH reseptör antikoları ilk olarak tiroid hücre membranlarının kullanılması ile ölçülüyordu ve çok spesifik değildi. İkinci jenerasyon ölçüm yöntemlerinde ise kemiluminesan ve radyoizotop işaret ile birlikte analitik spesifite artırılmıştır. İkinci jenerasyon ölçüm yöntemleri ile genellikle 1,5 IU/L üzerindeki TRAb varlığı Graves hastalığı için pozitif olarak kabul edilmektedir. Üçüncü jenerasyon ölçüm yöntemlerinde ise insan monoklonal TSH reseptörü stimulan antikoru (TSAb) kullanılmaktadır. Bu yüzden sensitivite ve spesifitenin çok arttığı (sırası ile ~%95-97 ve %100'e kadar) belirtilmektedir (8, 9). Ancak üçüncü jenerasyon yöntemleri henüz yeterince geniş kullanım alanına sahip değildir. "The National Academy of Clinical Biochemistry" tarafından hazırlanan *Laboratory Medicine Practice Guidelines*'a göre IgG tipi tiroid reseptör antikolarının

saptanması için RIA yönteminin kullanılması önerilmektedir (10–12). Diğer taraftan manuel RIA testi yerine kolaylıkla otomatize edilebilen ve doğruluk yanı sıra hızla sonuç veren yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Elektrokemilüminesans (ECLIA) başta olmak üzere immün temelli ölçüm yöntemleri bu konuda geniş kullanım potansiyeline sahip görünmektedir (11).

Bu çalışma ile TRAb testi için yaygın olarak kullanılan immün ölçüm temelli iki analiz yöntemi ile elde edilen hasta sonuçlarını karşılaştırmak, yöntemlerin analitik performanslarını ve klinik karar limitlerini değerlendirmek amaçlanmıştır. Ayrıca tiroid reseptör antikorları için klasik kılavuzlarda kullanımını önerilen manuel RIA yöntemi yerine otomatize edilebilen immün ölçüm temelli bir yönteminin kullanım potansiyeli araştırılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada 15 Ocak-15 Şubat 2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Endokrinoloji Birimi'ne rutin "TSH reseptör antikor" tetkiki için gelen toplam elli beş hasta örneği değerlendirildi. Örnekler analiz edilinceye kadar -20°C derecede saklandı.

Serum örnekleri öncelikle radyoimmün ölçüm yöntemiyle (*ImmunoTech RRA Anti-R TSH RIA kiti*, France) manuel olarak çalışıldı. MRC International Reference Preparations: 90/672'nin önerisine uygun olarak standardize edilmiş bir materyal ile (*Ntbsc 90/672*) kalibre edildi (13,14). Ölçümler gama sayıcıda (Cobra Packard) yapıldı. Yöntemin doğruluk ve kesinliğini belirlemek için negatif (0 IU/L) ve pozitif (4 IU/L) internal kalite kontrol materyali en az on kez farklı çalışmalarda çalışılarak analiz edildi.

Klinik karar limitinin üstünde, altında ve sınırda sonuç içeren hasta örnekleri daha sonra elektrokemilüminesans immün ölçüm (ECLIA) yöntemi ile (Roche, Germany) otoanalizörde (Cobas e601, Germany) çalışıldı. ECLIA yöntemi içinde 2 noktalı kalibrasyon gerçekleştirildi. İki seviyeli -düşük- (3,16 IU/L) ve -yüksek- (14,6 IU/L) internal kalite kontrol materyali çalışılarak sonuçların izin verilen aralıkta olup olmadığı değerlendirildi.

Kit üreticileri tarafından belirtildiği şekilde Graves hastalığı tanısında RIA yöntemi için kestirim noktası 1.0 IU/L, borderline değer 1.1-1.5 IU/L; ECLIA yöntemi için kestirim noktası 1.75 IU/L, borderline değer 1.22-1.58 IU/L olarak kabul edildi.

Ölçüm yönteminin toplam hatası (TE), rastgele ve sistematik hata değerlerinin toplamını ifade eden "TE= Bias (%) + 1,65 x CV (%)" formülü üzerinden hesaplanarak, TONK's kuralı ile testin referans aralığına uygun olarak belirlenen "izin verilebilir toplam hata" değerine göre değerlendirildi (15). TRAb testinin aynı zamanda antikor varlığı için pozitif/negatif sonuç vermesinden dolayı yöntem değerlendirmesi kalitatif ölçüm yöntemleri için önerilen yanlış negatif ve pozitif oranları değerlendirilerek ölçüldü.

İstatistiksel değerlendirme

Yöntemler arası korelasyon ve yöntemler arası tutarlılığın karşılaştırılması için SPSS istatistik programı (SPSS 20 for Windows®) ve MS Excel 2013 (MS Office'13 for Windows®) kullanıldı. Korelasyon grafiklerinde "x" eksenine referans olarak kullanılan RIA yönteminin sonuçları, "y" eksenine ise test edilen ECLIA yönteminin sonuçları yerleştirilerek değerlendirme yapıldı. Tukey-mean difference- (Bland-Altman) testinde ise "x" eksenine her iki yöntemin ortalaması, "y" eksenine ise test edilen yöntemin bu ortalamadan yüzde farkı yerleştirilerek değerlendirme yapıldı (16, 17).

Yöntemler arası sistematik fark ve onun % 95 güven aralığı regresyon denklemi ve regresyon çizgisi etrafındaki saçılmanın standart sapmasından (Sy/x) hesaplandı (NCCLS EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples. Approved guideline, 2nd edition, 2002). Uç değerler dışlandıktan sonra, regresyon denkleminde "x" yerine TRAb'ın kestirim değeri ile borderline değerinin üst sınırının ortalaması olan 1.25 konularak, bu düzeydeki sistematik fark saptandı. Ortalamanın standart hatası (SEM) ise Sy/x'in olgu sayısının kareköküne bölünmesinden (Sy/x: N^{0.5}) elde edildi. Bulunan sistematik fark değerine ±2 SEM (ortalamanın standart hatası) eklenerek farkın %95 güven aralığı bulundu.

TRAb testinin tanısal geçerliliği, RIA yöntemi referans kabul edilerek ECLIA yönteminin sonuçları ile 4 gözlü ve borderline sonuçları için gözlü karşılaştırma tabloları ile değerlendirildi. Tanısal sensitivite, spesifisite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve testin geçerliliği-gücü hesaplandı.

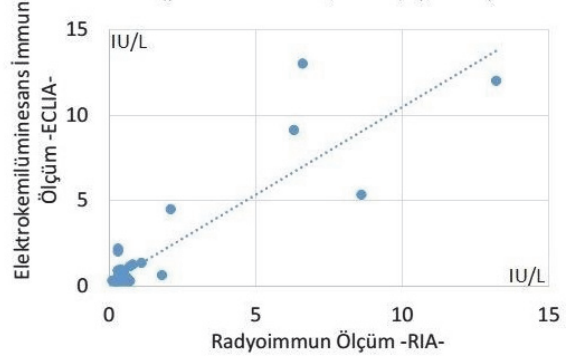
BULGULAR

RIA yönteminin doğruluk ve kesinliğini belirlemek için en az on kez çalışılan internal kalite kontrol materyalinin ortalaması 4.26 IU/L, standart sapması 0.34, Biası (%): 6.5, CV'si (%): 8.07 olarak belirlendi. Yöntemin total hatası 19.81 (%) olarak bulundu. TRAb testi için izin verilebilir toplam hata değeri TONK's kuralı ile % 50 olarak hesaplandı. RIA yönteminin total hatası izin verilebilen toplam hatadan düşük olduğundan, kullanılan RIA yöntemi hasta sonucu verilebilecek geçerliliği kanıtlanmış bir yöntem olarak değerlendirildi. Diğer taraftan Tonk kuralına göre hesaplanan %50 izin verilebilen toplam hata değerinin çok büyük olması, testin geçerliliğinin kanıtlanması için ek değerlendirmeler yapılmasının uygun olacağı görüşüne varıldı.

TRAb testi analiz yapıldıktan sonra test sonucunun kantitatif değeri, kestirim noktasının üstünde yada altında olarak değerlendirilir ve klinisyene kalitatif sonuç raporlanır. Klinisyen tarafından pozitif/negatif şeklinde değerlendirilen bu test için yöntem değerlendirilmesinde ayrıca, kalitatif sonuç veren yöntemlerin geçerliliği değerlendirme ölçütlerine uygun olarak yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuç verme oranları belirlendi. Negatif ve pozitif referans materyal ve/veya kalite kontrol materyali ile yapılan ve en az on kez tekrarlanan ölçümlerde, radyoimmün ölçüm yönteminin yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç verme oranı %0 olarak bulundu.

Regresyon analizine geçmeden önce, her iki yöntemle elde edilen aynı numunelere ait TRAb değerlerinin farklarının mutlak değerlerinin ortalaması 1.20 olarak saptandı. 55 örnekten sadece ikisinde ise iki yöntem arasındaki fark ortalamasının dört katı ve üzerinde farklı bulundu. Yapılan regresyon analizi sonucunda, iki yöntem arasında iyi bir korelasyon olduğu saptandı ($r=0,8$). Şekil 1

de her iki yöntem sonuçları için elde edilen regresyon analiz grafiği gösterilmiştir.



Şekil 1. Radyoimmün ölçüm ve elektrokemilüminesans immün ölçüm yöntemleri arasındaki lineer regresyon analiz grafiği ($y=1.0284x + 0.1983$, $R^2=0.8$, $S_y/x=1.04$)

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün, iki yöntem arasındaki doğruluk farkını (bias) değerlendirirken, testin tıbbi karar düzeyinin kullanılmasını da önermesi nedeni ile, yöntem farklılıkları tıbbi karar limitlerinde ayrı ayrı hesaplandı (NCCLS EP9-A2). RIA yöntemi ile elde edilen test sonuçlarında Graves hastalığı ve Graves dışı tiroid hastalıkları (borderline sonuçlar) için 1 ve 1,5 IU/L olmak üzere iki ayrı tıbbi karar limiti kabul edildi. TRAb testi için belirlenen bu iki farklı tıbbi karar düzeyinin orta noktası olan 1,25 IU/L değeri saptanan regresyon denklemine göre ($y = 1.0284x + 0.1983$) ECLIA testi için elde edilecek sonucun 1,48 IU/L olduğu belirlendi. Klinik karar düzeyi dikkate alınarak yöntemler arasındaki sabit hata değerinin 0,23 IU/L (Sabit hata= 1,48 - 1,25) olduğu bulundu.

Ayrıca RIA'da ölçülen her bir değer için regresyon denklemindeki (x) yerine konması ile elde edilecek sonuçlarla, diğer ölçüm yöntemi (ECLIA) ile ölçülen değerler arasındaki farkların standart sapmasından ECLIA yöntemi için rastgele hata (S_y/x) 1,04 olarak hesaplandı. Standart hatanın ortalaması ile, elde edilen tüm sonuçlar için rastgele hata dağılımı $0,29$ ($2SEM = 2*(1,04/\sqrt{53})$) olarak bulundu. ECLIA yönteminin sabit ve rastgele hataların tümünü ifade eden total hatası $0,52$ IU/L ($Bias \pm 2SEM = 0,23 + 0,29 = 0,52$) olarak saptandı. Tıbbi karar düzeyi olan 1,25

IU/L'de elde edilen bir sonucun ECLIA yöntemi ile 0,52 IU/L farklı bulunduğu saptandığından, bu yöntemin RIA yöntemine göre yüzde hata oranının (Bias %) 41,6 (%) olduğunu hesaplandı.

Her iki yöntem ile elde edilen sonuçların Graves ve/veya Graves dışı tiroid hastalığı varlığı için tanısız karşılaştırma tablosu aşağıdaki gibidir (Tablo I).

Borderline sonuçları bulunan 5 olgu çalışma dışında bırakıldığında (n=50), elde edilen karşılaştırma verileri ise Tablo II'de yer almaktadır. Bu koşullarda yöntemin sensitivitesi: %83,3, spesifitesi: %95,4, pozitif prediktif değeri (PPD): % 71,4, negatif prediktif

değeri (NPD): % 97,6 olarak hesaplandı. Testin geçerliliği ise %94 olarak bulundu.

Borderline sonuçların bulunduğu grup Graves hastalığı dışında bir tiroid hastalığı olarak kabul edildiğinde ise, tanısız karşılaştırma tablosu aşağıdaki gibiydi (Tablo III). Bu koşullarda yöntemin sensitivitesi: %83,3, Spesifitesi: %95,7, PPD: %71,4, NPD: %97,8 olarak hesaplandı. Testin geçerliliği: %94,3 olarak bulundu.

Her iki yöntemin Tukey-mean difference (Bland-Altman) testinde ise düşük düzeylerdeki farkın daha yüksek olduğu, konsantrasyon yükseldikçe farkın nispeten azaldığı belirlendi.

Tablo I. TRAb Tanısız Karşılaştırma Tablosu

n = 53		RIA ¹		
		(+)	(-)	BL ³
ECLIA ²	(+)	5	2	0
	(-)	1	42	0
	BL ³	0	2	1

¹RIA : Radyo İmmün Assay;

²ECLIA: Kemilüminesans İmmün Assay

³BL : Grave's Dışı Tiroid Hastalığı; (+): Grave's Hastalığı; (-): Tiroid Hastalığı Olmayan

Tablo II. Borderline Hasta Gözardı Edilmiş Tanısız Karşılaştırma Tablosu

n = 50		RIA ¹	
		(+)	(-)
ECLIA ²	(+)	5	2
	(-)	1	42

¹RIA : Radyo İmmün Assay

²ECLIA : Kemilüminesans İmmün Assay; (+) : Grave's Hastalığı; (-) : Tiroid Hastalığı Olmayan

Tablo III. Borderline Hastaların Graves Dışı Kabul Edildiği Tanısız Karşılaştırma Tablosu

n = 50		RIA ¹	
		(+)	(-)
ECLIA ²	(+)	5	2
	(-)	1	45

¹RIA : Radyo İmmün Assay; ²ECLIA : Kemilüminesans İmmün Assay;

(+) : Grave's Hastalığı; (-) : Tiroid Hastalığı Olmayan

TARTIŞMA

Graves Oftalmopatisi insidansı %0,16 olarak belirtilmiştir.(18) Bu gibi daha nadir olan hastalıkların tanısını koymak için önce tanıyı akla getirmek ve sonra uygun laboratuvar

testini istemek gerekir. Hastalığın patofizyolojisinde bir çok etken rol oynayabilirken Graves Hastalığı otoimmünite ile ilişkilidir ve otoantikörler önemli rol tutar. Tiroid otoantikörleri çok farklı fizyolojik aktiviteye sahip

olabilirler. Graves hastalığı tanısı bakımından en patognomik olan tiroid stimulan hormon (TRAb) antikorlarıdır (19). Gebelikte Graves hastalığı ortaya çıktığında erken dönemde bakılan TRAb, gestasyonel tirotoksikozdan Graves hastalığını ayırt etmede yardımcıdır. Graves hastası olan bireylerin fetusları da risk altındadır. Eğer annede Graves hastalığı daha önce radyoaktif iyot ile veya cerrahi olarak tedavi edilmişse gebeliğin ilk trimesterinde ve 20-24. haftada TRAb ölçümü istenmelidir (20). TRAb ölçüm endikasyonları arasında; egzoftalmi, pretibial miksödem, nodüllü Graves ile nodüler toksik guatr ayrımı, non-otoimmün tirotoksikoz ayırıcı tanısı ve antitiroid tedavi sonrası Graves hastalığının remisyonu açısından karar vermenin de bulunması ölçüm yönteminin analitik performansının önemine işaret etmektedir. Bu çalışmada iki farklı ölçüm yönteminin analitik performansı belirlenerek, tanısal ayırt etme güçleri değerlendirilmiştir.

En son 2002 yılında güncellenen Amerika ve Avrupa klinik kimya cemiyetlerinde kabul gören kılavuzlarda Graves kesin tanısı için yapılan TRAb analizinde RIA yönteminin kullanımı önerilmektedir. Piyasada kullanılan radyoimmün ölçüm yöntemleri genellikle yarışmalı immün ölçüm prensibine dayanmaktadır. Yöntemde örnek, kontrol ve kalibratörler TSH reseptörü kaplanmış tüplerde inkübe edilirler. Hasta serumunda bulunan TRAb, ¹²⁵I-işaretli TSH'nin reseptör kaplanmış tüplere bağlanmasını inhibe etme yeteneklerine göre bir değerlendirme sağlar (21, 22). Bu yöntemin manuel bir yöntem olmasının getirdiği zorluk ve reaktiflerinin içerdiği radyo aktivite nedeni ile laboratuvar için Türk Atom Kurumu'ndan özel çalışma izni gerektirmesi daha pratik ve kolay uygulanabilir farklı ölçüm yöntemleri geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Ancak geliştirilen yöntemlerin otomatize edilerek kolay uygulanabilir olması yanı sıra yeterli tanısal ve analitik performansa sahip olmaları büyük önem taşımaktadır.

Bir analiz yönteminin doğruluğunun tespiti için testin niteliğine ya da laboratuvarın koşullarına göre farklı metotlar uygulanabildiği bilinmektedir (23, 24). Tercih sırasına göre yöntemin doğruluğu; yöntem karşılaştırma

deneyleri ile (elimizde referans bir yöntem olma koşulu ile); referans materyal ile doğruluk deneyleri; eksternal kalite kontrol ile doğruluk değerlendirme ile; eksternal kalite kontrolün bulunmadığı durumlarda internal kalite kontrol materyali ile doğruluk değerlendirme ve en son çare olarak kimyasal standartlar kullanılarak yapılan geri kazanım deneyleri ile belirlenebilir. Yöntemin rastgele hata değerini veren tekrarlanabilirlik deneyleri çalışma içi ve çalışmalar arası olacak şekilde ayrı ayrı yapılmalıdır. Rastgele hata oranının belirlenmesinde çalışmalar arası tekrarlanabilirlik değerinin dikkate alınması daha sıkı bir denetim olanağı sağlar. Kantitatif metotlar için doğruluk ve tekrarlanabilirlik ayrı ayrı bakılırken, kalitatif testlerde testin doğası gereği doğruluk ve tekrarlanabilirlik beraber değerlendirilir (25). Bizim çalışmamızda klasik kılavuzlarda belirtildiği şekilde doğruluk analizleri için bir referans yöntem olarak RIA yöntemi alınmış ve birinci basamakta tercih edilen hasta bazlı yöntem karşılaştırma deneyleri ile ECLIA yönteminin doğruluğu ve total hatası belirlenmiştir. Kullanılan referans yöntem olan RIA'nın geçerliliği ise referans materyaller kullanılarak kanıtlanmıştır. Her iki yöntemin total hataları hesaplanırken çalışmalar arası tekrarlanabilirlik deney sonuçları hesaba katılmıştır.

Uluslararası kabul gören yöntem karşılaştırma koşullarını belirten kılavuzlarda analitik değerlendirme için en az 40 olgu toplanması, bunların belli bir oranının referans aralığının dışında olması ve karşılaştırmanın en az beş farklı güne yayılması önerilmektedir. Ayrıca yöntemler arasındaki korelasyon için regresyon analizinin yapılması ve regresyon çizgisinin etrafındaki saçılmanın (Sy/x) bulunması istenmektedir (NCCLS EP9-A2). Bu şekilde iki yöntem arasındaki ilişkinin matematiksel denklemle ifade edilmesi ve bu ilişki düzeyinin %95 güven aralığı ile ifade edilmesi sağlanabilir. Testin izin verilen total hatası (TEa) ile karşılaştırılarak yöntemler arasındaki farkın anlamlı olup olmadığına karar verilmesi daha anlamlı bir değerlendirme sağlar. Bizim çalışmamız da bu kılavuzlara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın bir kısıtlılığı olarak, RIA reaktifleri

nin sınırlı raf ömrü olması ve toplumda otoantikör pozitif olgu görülme sıklığının çok düşük olması nedeni ile, hasta örnek sayısı klinik karar limitlerine göre gruplar arasında eşit olarak dağılamamıştır. Çalışmaya sonucu karar limitinin üstünde olan 8 ve karar limitine yakın fakat, karar limitinden küçük (borderline) sonucu olan 1 adet örnek dahil edilebilmiştir. Böylece toplamda ancak 9 hasta pozitif/borderline olgu olarak değerlendirmeye alınabilmiştir. İleriki çalışmalarda pozitif olgu sayısının artırılması daha güvenilir sonuçların eldesini destekleyecektir.

İmmunolojik yöntemlerin doğası gereği, total hatanın fotometrik ve türbidimetrik yöntemlere kıyasla yüksek olması yanı sıra tekrarlanabilirlik sorunu olduğu da bilinmektedir. WHO tarafından, RIA yöntemi için çalışma içi tekrarlanabilirlik (%CV) değeri < %15 olarak belirtilmiştir. Referans materyal ile gerçekleştirilen laboratuvarlar arası reseptör bağlama test sonuçlarında tekrarlanabilirlik değeri (%CV) %14,5 olarak bulunmuştur (The World Health Organization- <http://apps.who.int/iris/handle/10665/70583>). Rastgele hatayı ifade eden % CV değeri yanı sıra yöntemin sistematik hata olasılığı da göz önüne alındığında TRab testinin total izin verilebilir hata oranının %50'lere kadar varması doğal karşılanmalıdır. Ancak total hatası yöntem gereği yüksek olan böyle bir testin manuel yöntemlerle çalışılmasının getirdiği ek hata kaynaklarının olasılığı unutulmamalıdır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre referans yöntem olan RIA yöntemi ile ECLIA yöntemi arasında iyi düzeyde korelasyon olduğu bulunmuştur. Ancak bland-altman analizinde görüldüğü gibi, düşük düzeylerde farkın daha belirgin olduğu, konsantrasyon yükseldikçe farkın nispeten azaldığı belirlenmiştir. Bu durum olasılıkla alt noktalardaki kesinliğin daha düşük olmasından kaynaklanabilir. Referans aralığının ve borderline sınırının bu değerlere yakın olduğu göz önüne alındığında, bu durumun özellikle farklı analitik yöntemlerle izlenen hastaların takibinde uygunsuzluklar yaratabileceği göz önüne alınmalıdır. Borderline sonuçlar göz ardı edildiğinde veya Graves dışı kabul edildiğinde ECLIA yönteminin geçerliliğinin daha yüksek olduğu söylenebilir.

Diğer taraftan, TRab gibi kalitatif olarak yorumlanan testleri değerlendirirken testin geçerliliği yani testin genel gücü ve negatif prediktif değerinin yüksek olması beklenir. ECLIA yöntemi, yüksek total hata oranına rağmen yüksek test geçerliliği, yüksek negatif prediktif değeri, otoanalizörde uygulanabilmesi ve manuel yöntemlere göre daha düşük rastgele hata değerleri ile çalışabilmesinden ötürü tercih nedeni olabilir. Fakat bu yöntemin otoanalizör, sarf malzeme, reaktif, operatör ve teknik destek ihtiyaçlarının çok olması sebebiyle ayrıca maliyet açısından değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev.* 2000 Apr; 21(2): 168-99.
2. Bunevicius R, Prange AJ. Psychiatric manifestations of Graves' hyperthyroidism: pathophysiology and treatment options. *CNS Drugs.* 2006 Jan; 20(11): 897-909.
3. Fahrenfort JJ, Wilterdink AM, van der Veen EA. Long-term residual complaints and psychosocial sequelae after remission of hyperthyroidism. *Psychoneuroendocrinology.* 2000 Feb; 25(2): 201-11.
4. Laurence M. Demers. General Clinic Tests. In: Wu A, editor. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests.* 4th ed. Saunders/Elsevier; 2006. p. 1045-6.
5. Cockerham KP, Chan SS. Thyroid eye disease. *Neurol Clin.* 2010 Aug; 28(3): 729-55.
6. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee MC, Klein I, et al. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr Pract.* 17(5): 456-520.
7. Davies TF, Roti E, Braverman LE, DeGroot LJ. Thyroid controversy--stimulating antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov; 83(11): 3777-85.
8. Massart C, Sapin R, Gibassier J, Agin A, D'Herbomez M. Internethod variability in TSH-receptor antibody measurement: implication for the diagnosis of Graves disease and for the follow-up of Graves ophthalmopathy. *Clin Chem.* 2009 Jan; 55(1): 183-6.
9. Theodoraki A, Jones G, Parker J, Woolman E, Martin N, Perera S, et al. Performance of a third-generation TSH-receptor antibody in a UK clinic. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Jul; 75(1): 127-33.
10. Shewring G, Smith BR. An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1982 Oct; 17(4): 409-17.
11. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jan; 84(1): 90-7.

12. Schott M, Feldkamp J, Bathan C, Fritzen R, Scherbaum WA, Seissler J. Detecting TSH-receptor antibodies with the recombinant TBII assay: technical and clinical evaluation. *Horm Metab Res.* 2000 Oct; 32(10): 429–35.
13. Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical applications. *Clin Chim Acta.* 2000 Mar; 293(1-2): 1–29.
14. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. *Clin Chem.* 1996 Jan; 42(1): 160–3.
15. Badrick T. Quality leadership and quality control. *Clin Biochem Rev.* 2003 Aug; 24(3): 81–93.
16. Bland JM, Altman DG. Agreed statistics: measurement method comparison. *Anesthesiology.* 2012 Jan 29; 116(1): 182–5.
17. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between measurement. *Biochimica Clinica* 1987; 11: 399-404.
18. Hiromatsu Y, Eguchi H, Tani J, Kasaoka M, Teshima Y. Graves' ophthalmopathy: epidemiology and natural history. *Intern Med.* 2014 Jan; 53(5): 353–60.
19. Laubner K, Weber WA, Seufert J. [Graves' ophthalmopathy from the internist's perspective]. *Ophthalmologie.* 2011 May; 108(5): 410–6.
20. De Groot L, Abalovich M, Alexander EK, Amino N, Barbour L, Cobin RH, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Aug; 97(8): 2543–65.
21. Bolton J, Sanders J, Oda Y , et al. Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA. *Clin Chem* 1999; 45: 2285-2287 .
22. Shewring G and Smith BR. An improved radioreceptor assay for TSH receptor. *Methods Enzymol* 1982; 17: 409-17.
23. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, et al. Bioanalytical method validation- a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical research.* 2000. p. 1551–7.
24. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends Anal Chem.* 2004 Sep; 23(8): 535–52.
25. Westgard JO, Carey RN, Wold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clin Chem.* 1974 Jul; 20(7): 825–33.

Yazışma adresi:

Ferhat Demirci
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD, İzmir, Türkiye
Tel: 232 4124401
E-posta: drferhat5505@hotmail.com
