

Likit Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre ile 25-Hidroksivitamin D₃ Ölçüm Belirsizliğinin Değerlendirilmesi

Evaluation of 25-Hydroxyvitamin D₃ Measurement Uncertainty with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Burcu Basat* **Müberra Vardar*** **Okan Dikker*** **Mustafa Şahin****

* Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İstanbul, Türkiye

** Hitit Üniversitesi, Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Çorum, Türkiye

Başvuru Tarihi: 27 Temmuz 2018

Kabul Tarihi: 03 Eylül 2018

Kısaltmalar: **1,25(OH)₂D** : 1,25-dihidroksikolekalsiferol, **25(OH) D**: 25-hidroksivitamin D, **CLIA 88**: Clinical Laboratory Implementation Amendments 1988, **CV**: Varyasyon Katsayısı, **DEQAS**: Vitamin D Dış Kalite Değerlendirme Programı, **GUM**: Guide to the expression of Uncertainty in Measurement, **ISO**: International Organization for Standardization, **JCTLM**: Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, **LC**: Likit Kromatografisi, **LC-MS/ MS**: Likit Kromatografi Tandem Kütle Spektrometrisi, **MS/MS**: Tandem Kütle Spektrometresi, **RMS_{bias}**: Root of Mean Square of Bias, **RSD**: Relatif Standart Deviasyon, **R_w**: Laboratuvar İçi Yeniden Üretilirlik, **SD**: Standart Deviasyon, **SRM**: Standart Referans Materyal, **TEa**: Tıbben Müsaade Edilen Toplam Hata, **u(bias)**: Laboratuvar Hatası, **uC**: Ortak Kombine Standart Belirsizlik Değeri, **u(C_{ref})**: Ölçüm Prosedüründen Kaynaklanan Bias, **u(R_w)**: Laboratuvar İçi Yeniden Üretilirlik Hatası, **VIM**: International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology

ÖZET

Amaç: Ölçüm belirsizliği, elde edilen test sonucunun kalitesinin kantitatif göstergesi olup, test sonucunun gerçek değeri ne ölçüde temsil ettiğini gösterir. Bu nedenle laboratuvarımızda likid kromatografi-tandem kütle spektrometre ile analizi yapılan 25 hidroksivitamin D₃ testi için ölçüm belirsizliğini hesaplamayı ve hesabının nasıl yapılacağını, bulgularımızı literatürdeki diğer sonuçlarla karşılaştırmayı, belirsizlik değerinin hastaların D vitamini durumu kararına olası etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Yazışma adresi: Mustafa Şahin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6073-563X>

Hitit Üniversitesi, Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Çorum, Türkiye

e-mail: mustafaistanbulx@hotmail.com

Gereç ve Yöntem: Likid kromatografi-tandem kütle spektrometre ile analiz edilen 25-hidroksivitamin D₃ için, Nordest kılavuzu baz alınarak oluşturulan ölçüm belirsizliği hesaplama modeli doğrultusunda, bir yıllık patolojik ve normal seviyelerdeki toplam 440 adet iç kalite kontrol verileri, 4 döngü, her döngüde 5 seviye olmak üzere 20 adet dış kalite kontrol verileri kullanılıp standart belirsizlikler hesaplanarak her birinin karesi alınıp toplandı ve bu değerlerin karekökü alınarak birleşik belirsizlik hesaplandı. Daha sonra da birleşik belirsizlik değeri k faktörü ile çarpılarak genişletilmiş ölçüm belirsizliği elde edildi.

Bulgular: Laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik %7.44, laboratuvar kaynaklı bias %16.01, ölçüm prosedüründen kaynaklı bias %0.82, bias komponentinin ölçüm belirsizliği %16.03, birleşik belirsizlik %17.67 ve genişletilmiş ölçüm belirsizliği %34.64 olarak hesaplandı.

Sonuç: 25-hidroksivitamin D₃ için total izin verilebilir hata +/- %25 olduğundan, çalışmamız sonucunda; 25-hidroksivitamin D₃ için genişletilmiş ölçüm belirsizliği değerimiz yüksek bulunmuştur. Bu değeri %25'in altına düşürmek için olası hataları kısıtlayacak hedefe yönelik çözümler aranmalıdır. Hastanın sonuçlarına ölçüm belirsizliği değerini eklemek, klinik karar verme noktasında hekimin gücünü ve laboratuvar sonuçlarına olan güveni artıracaktır.

Anahtar Kelimeler: 25-hidroksivitamin D₃; Likit kromatografisi-tandem kütle spektrometresi; Ölçüm belirsizliği

ABSTRACT

Purpose: The measurement uncertainty is a quantitative indicator of the quality of the test result obtained and indicates how the test results represent the actual value. For this reason, we aimed to calculate the measurement uncertainty for the 25-hydroxyvitamin D₃ assay, which was analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in our laboratory, to compare our findings with other results in the literature and to evaluate the possible effect of uncertainty value on patients' D vitamin status.

Materials and Methods: For 25-hydroxyvitamin D₃ analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, in the direction of the measurement uncertainty calculation model, which is based on the Nordest guide, standard uncertainties arising from 20 external quality controls, including 4 cycles, 5 levels per cycle, resulting from a total of 440 internal quality controls pathological and normal levels at one year, and the combined uncertainty was calculated by taking this value as a square root. Then the extended uncertainty of measurement was obtained by multiplying with the combined standard uncertainty value k factor.

Results: The intra-laboratory reproducibility was 7.44%, the bias from the laboratory was 16.01%, the bias from the measurement procedure was 0.82%, the measurement uncertainty of the bias component was 16.03%, the combined standard uncertainty was 17.67% The uncertainty of measurement was calculated as 34.64%.

Conclusions: For 25-hydroxyvitamin D₃ the total allowable error is +/- 25%, as a result of our study; The expanded measurement uncertainty value for 25-hydroxyvitamin D₃ was found to be high. Targeted solutions should be sought to limit possible errors in order to reduce this value to less than 25%. Adding measurement uncertainty to the patient's outcome will increase confidence in the physician's strength and laboratory results at the point of clinical decision-making.

Keywords: 25-hydroxyvitamin D₃; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Measurement uncertainty

GİRİŞ

Ölçüm belirsizliği, Uluslararası Temel ve Genel Metroloji Terimleri Sözlüğü (VIM; International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology)'ne göre; 'ölçülen büyüklüğe mantıklı bir şekilde atfedilebilecek bütün değerlerin dağılımını karakterize eden ve ölçüm sonucu ile ilişkili olan bir paramet-

redir' şeklinde tanımlanmaktadır. Belirsizliğin bu tanımı ölçülen büyüklüğü mantıklı bir şekilde içereceğine inanılan tüm değerlerin içinde bulunduğu aralığa vurgu yapar (1,2). Ölçüm belirsizliği, elde edilen laboratuvar sonucunun kalitesinin kantitatif bir göstergesidir. Test sonucunun gerçek değeri hangi ölçüde temsil ettiğini gösterir. Ölçüm belirsizliği sayesinde farklı laboratuvarlarda elde

edilen test sonuçlarının karşılaştırılabilmesi de olanaklıdır. Klinik biyokimya laboratuvarlarında 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 (3). Dolayısıyla ölçüm belirsizliği hesaplanıp, ölçümle beraber verildiğinde; ölçümün hangi sınırlar içinde yer alabileceğini ve güven düzeyini yansıtır (4). Ölçüm belirsizliği; referans değerlerin belirsizliği ve ölçüm süreci ile ilgili tüm diğer belirsizliklerin bileşiminden kaynaklanır (5). Bunlar örnek işleme, matriks etkisi, interferanslar, pipetleme, kalibratörler, referans materyaller, kullanılan teknik donanım, çevresel etkenler, çalışan kişi gibi belirsizliklerdir (6).

ISO/IEC 17025 genel kalite yönetim standardına göre ve klinik laboratuvarların kalite yönetimini ifade eden ISO/IEC 15189 tıbbi laboratuvarlar kalite standardına göre; her laboratuvarın ölçüm belirsizliği için belirlenmiş bir yöntemi olmasını, hesaplarının yapılmasını ve raporlanmasa bile istenildiğinde verilmek üzere hazır bulundurulmasını istemektedir (7). Ölçüm belirsizliği, akredite olmak isteyen bir laboratuvarın hesaplaması gereken bir veridir. Herhangi bir testin ne zaman, nerede ve kim tarafından yapılırsa yapılsın aynı sonucu vermesini sağlamak için yapılan 'akreditasyon' kalitenin sürekliliğini ve güvenilirliğini disiplin altına almak amaçladır. Yapılan test başka bir laboratuvar veya ülkede yapılmış olsa dahi, belirlenmiş güvenilirlik aralıkları içinde aynı sonucun alınmasını sağlar (8). Akreditasyon sürecinde laboratuvar uzmanından teknik yeterliliğin sağlanması beklenir. Bu süreçte, ölçüm belirsizliği hesaplanması yanında, laboratuvar sonuçlarının kalite ve güvenilirliği için önemli olan diğer iki aşamada yerine getirilmelidir. Bunlar da metod validasyonu ve izlenebilirliğin tanımlanmasıdır. Ardından kalite kontrol çalışmaları ile takip edilmelidir (8,9).

D vitamini; kemik, bağırsak, böbrek ve paratiroid bezi üzerine etki göstererek kalsiyum ve fosfor metabolizmasını düzenleyen, yağda eriyen bir vitamindir (10). Yetersizliği durumunda çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde osteomalaziye yol açan kemik demineralizasyonuna neden olur (11).

Vitamin D düzeyini değerlendirmek için 1,25-dihidroksivitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) yerine genellikle 25-hidroksivitamin D₃ (25(OH)D₃) ölçümü yapılmaktadır. Çünkü 25(OH)D₃ daha uzun yarı ömre sahiptir ve dolaşımında yaklaşık 1000 kat daha fazla miktarda bulunmaktadır. 25(OH)D₃ ölçümünde yöntemler arası farklılıkların olması ve kalibratörlerde standardizasyon yokluğu tek bir kesim noktasının belirlenmesinde zorluk yaratmakta ve laboratuvarlar arası farklılıklara yol açmaktadır. Bu yüzden 25(OH)D₃ için ölçüm sonucu verilirken ölçülen veya hesaplanan ölçüm belirsizliği de verilmelidir (12). 25(OH)D₃'ün klinik olarak doğru ölçülmesi çok büyük önem arz etmektedir. Bunun için bir standartlaştırma gerekmektedir ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile vitamin D ölçümü Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) tarafından "referans metod" olarak kabul edilmiştir (13).

Biz bu çalışmamızda LC-MS/MS ile analiz edilen 25(OH)D₃ için, Nordest kılavuzunda tanımlanan Avrupa akreditasyon kılavuz/12/, Eurolab Teknik Rapor No: 1/3/ ve ISO/DTS 21748 Rehberi baz alınarak oluşturulan ölçüm belirsizliği hesaplama modeli doğrultusunda, bir yıllık iç ve dış kalite kontrol verilerinden faydalanarak belirsizlik hesabının nasıl yapılacağını ve hangi değerde olduğunu bulmayı, bulgularımızı literatürdeki diğer sonuçlarla karşılaştırmayı ve ölçüm belirsizliği değerinin hastaların D vitamini durumu kararına olası etkilerini değerlendirmeyi amaçladık (14).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için, T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan 23.02.2016 tarih ve 423 sayılı kararı ile etik kurul onayı alındı. Çalışmada, hastanemiz Tıbbi Biyokimya laboratuvarında bulunan LC-MS/MS ile analiz edilen 25(OH)D₃ için, yukarıdan aşağıya ölçüm belirsizliği tahmininde rehberlik sağlayan Nordest kılavuzunda tanımlanan Avrupa akreditasyon kılavuz/12/, Eurolab Teknik Rapor No:1/3 ve ISO/DTS-21748 Rehberi/8 baz alınarak oluşturulan ölçüm belirsizliği hesaplama modeli kullanıldı (14).

Çalışma Verilerinin Elde Edilmesi

Laboratuvarda 25(OH)D₃ için günlük iki seviye iç kalite kontrol materyali kullanılarak iç kalite kontrol çalışması yapılmaktadır. Çalışma için, Ocak 2016 ve Kasım 2016 tarihleri arasında patolojik ve normal seviyelerdeki kontrol materyalleri olmak üzere çalışılmış 444 adet iç kalite kontrol sonucu laboratuvar bilgi sisteminden alındı.

Laboratuvarda, her 3 ayda bir dahil olunan D vitamini dış kalite değerlendirme programı (Vitamin D External Quality Assessment Scheme, DEQAS) gereğince, beş seviye kontrol materyali kullanılarak dış kalite kontrol çalışması yapılmaktadır. Çalışma için Ekim 2015 ve Ekim 2016 tarihleri arasında çalışılmış 4 döngü, her döngüde 5 seviye olmak üzere 20 adet dış kalite kontrol sonucu DEQAS programından elde edildi.

D Vitamini Ölçümü

Plazma Vitamin D düzeyleri; Zivak marka, Tandem Gold 325-MS model, ZA-20001-0000-00 seri numaralı, 2014 üretim tarihli ve Amerika Birleşik Devletleri menşeli, LC-MS/MS cihazında likid-kromatografi-kütle spektrometri yöntemiyle Zivak 25(OH)D₂- D₃ kiti kullanılarak ölçüldü.

Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması

Laboratuvar İçi Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması (uRw)

Bunun için 11 aylık iç kalite kontrol verileri kullanıldı. Normal ve patolojik seviyedeki

kontrol materyallerininin %CV (varyasyon katsayısı) değerleri hesaplandı. %CV ise (ölçümün standart sapması/ölçüm ortalaması) x 100 formülü ile hesaplandı.

İki seviyeli kontrol, her kontrol seviyesi ve değişen lot numarası için ayrı ayrı ortalama, standart sapma (SD) ve relative standart deviasyon (RSD) hesaplandı. Farklı konsantrasyon seviyelerinde elde edilen sonuçların birbirleri ile birleştirmenin kolay olması nedeniyle hesaplamalarda standart sapmanın rölatif değerleri [Rölatif standart sapma: RSD = %CV (varyasyon katsayısı)] tercih edildi. Standart sapma ve rölatif değerler arasındaki ilişki

Bias Komponentinin Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması (ubias)

Bias için belirsizlik bileşeni standart referans materyal (SRM), geri kazanım veya laboratuvarlar arası karşılaştırmadan hesaplanan biastan elde edilir. Biz bunun için dış kalite kontrol verilerini kullandık. Güvenilir zaman aralığında en az 6 katılım önerilir. Dış kalite kontrol verilerinden belirsizliğin u(bias) komponentinin hesabında RMS bias ve u(Cref) değerleri kullanılır.

Laboratuvardan Kaynaklanan Bias Hesaplanması (RMS_{bias})

Referans materyalden farklı olarak ölçtüğümüz değerden kaynaklanan belirsizliktir. Yani laboratuvarımızda çalışıp gönderdiğimiz dış kalite kontrol sonuçlarımızın "bias" larından kaynaklanan belirsizliği verir. Bunun hesabı her bir dış kalite kontrol dönemi için,

$$R_w = \sqrt{((\text{normal kontrol materyali \%CV})^2 + (\text{patolojik kontrol materyali \%CV})^2) / 2}$$

RSD = 100 x (ölçümün standart sapması/ ölçümün Ortalaması) şeklindedir.

$$\text{Bu koşullarda; } uRw^2 = (uRw^2_{\text{Kontrol-1}} + uRw^2_{\text{Kontrol-2}}) / 2 \quad (15)$$

$$\% \text{ bias} = [(\text{hedef değer} - \text{sonuç değer}) / \text{hedef değer}] * 100$$

$$u(\text{bias}) = \sqrt{RMS \text{ bias}^2 + u(Cref)^2}$$

Hedef Değer: Dış kalite kontrol programına katılıp aynı grupta yer alan laboratuvarların sonuçlarının ortalamasıdır (Aşırı uç değerler program tarafından gruptan çıkarılmaktadır).

Sonuç Değer: Dış kalite kontrol örneğinin laboratuvarımızda ölçülen değeridir.

RMS_{bias} hesaplanırken farklı % bias karelerinin ortalamasının karekökü alınır.

$$RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum (bias_i)^2}{n}}$$

n = dış kalite kontrol değerlendirme sayısı

Çalışmada 1 yıl içinde tüm dönemlerden elde edilen veriler (%biasların kareleri) toplanıp, dış kalite kontrol değerlendirme sayısına bölünüp karekökleri alınarak RMS bias hesaplandı.

Ölçüm Prosedüründen Kaynaklanan Bias Hesaplanması u(Cref)

Sertifikalı referans materyalden veya dış kalite kontrol sonuçlarındaki gerçek veya beklenen değerden hesaplanarak elde edilen belirsizlik bileşeni olarak tarif edilir. Dış kalite kontrol verilerinden u(Cref) değerinin hesaplanmasında rölatif standart sapma (%SR) değeri kullanılabilir. %SR=(ölçümün standart sapması/ölçüm ortalaması) x100 formülü ile hesaplandığı için %SR=%CV denilebilir. Belirsizliğin u(Cref) değerinin hesabında her bir parametre için dış kalite kontrol verilerinden elde edilen ortalama %CV değerlerinin ortalaması, aynı method ve aynı cihazı kullanan laboratuvar sayısının kareköküne bölündü.

$$u(Cref) = \text{Grup \%CV}_{ortalama} / \sqrt{n}$$

n=aynı method ve aynı cihazı kullanan laboratuvar sayısı

Kombine Standart Belirsizliğin Hesaplanması

Standart belirsizlik bileşenlerinin tamamından faydalanılarak ortak kombine standart belirsizlik (combined standart uncertainty) değeri hesaplandı.

$$uc = \sqrt{(uRw)^2 + (u(bias))^2}$$

uc=Standart ölçüm belirsizliği.

Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması (U)

Kombine standart belirsizlik değeri k faktörü ile çarpılarak genişletilmiş belirsizlik değeri hesaplandı. k değeri %95 güven aralığını temsil eden 1.96 olarak alındı.

$$U = 1.96 \times uc$$

$$U = 1.96 \times \sqrt{(uRw)^2 + (u(bias))^2}$$

BULGULAR

25(OH)D₃ ölçüm belirsizliği için ilk komponenti olan laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik (uRw) hesaplaması yapıldı. Bunun için iç kalite kontrol verileri kullanılarak hem her değişen lot numarası hem de her kontrol seviyesi (hem normal seviye hem patolojik seviye) için ayrı ayrı hesaplanan Xort, SD ve %RSD değerleri Tablo 1'de gösterildi. Farklı konsantrasyon seviyelerinde elde edilen sonuçları birbirleri ile birleştirmenin en kolay yolu %RSD olduğundan bu verilerden hem normal seviye hem patolojik seviyelerini birleştirebilmek adına ortak %RSD hesaplandı. Bunun için ortak Lot (%RSD)² = (Lot 1(%RSD)² + Lot 2 (%RSD)²)/2 formülü kullanıldı. Normal seviye kontrol için bu değer %7.3 bulunurken patolojik seviye kontrol için %7.6 bulundu (Tablo 1).

Bulunan %7.3 ve %7.6 olan değerler, laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik (uRw) hesabında kullanılan formülde $uRw^2 = (uRw^2_{seviye1} + uRw^2_{seviye2})/2$ yerine konulduğunda $uRw^2 = (7.3^2) + (7.6^2)/2 = \%55.5$ ve $uRw = \%7.44$ olarak hesaplandı. 25(OH)D₃ ölçüm belirsizliği için ikinci komponent olan bias ölçüm belirsizliği $u_{bias}^2 = u_{Cref}^2 + RMS_{bias}^2$ formülünden yararlanılarak hesaplandı. Bunun için dış kalite kontrol verilerinden faydalanıldı. Öncelikle Tablo 2'de gösterilen bir yıl içindeki tüm dönemlerden elde edilen dış kalite kontrol verilerinden %biasların kareleri toplanıp, dış kalite kontrol değerlendirme sayısına (burada değerlendirme sayısı 4

döngü 5 seviyeden 20'dir.) bölünüp, karekökleri alınarak RMS_{bias} 16.01 olarak hesaplandı.

Belirsizliğin $u(C_{ref})$ değerinin hesabında her bir parametre için dış kalite kontrol verilerinden elde edilen ortalama %CV değerleri, aynı method ve aynı cihazı kullanan laboratuvar sayısının kareköküne bölündü.

$u(C_{ref}) = \%CV_{ortalama} / \sqrt{n}$ formülündeki veriler yerine konulduğunda 0.82 olarak hesaplandı.

u_{bias} için bulduğumuz belirsizlik bileşenleri $u_{bias}^2 = u_{C_{ref}}^2 + RMS_{bias}^2$ formülü ile standart belirsizlik değerine dönüştürüldü. $u_{bias}^2 = (0.82)^2 + (16.01)^2$ $u_{bias} = 16.03$ değeri tablo 3'te gösterildi. 25(OH)D₃ için standart belirsizlik bileşenlerinin tamamından faydalanarak ortak kombine standart belirsizlik değeri (uc) oluşturuldu. $uc = \sqrt{(uRw^2 + u_{bias}^2)}$ formülünden yararlanarak standart belirsizlik bileşenleri yerine konulduğunda $uc = \sqrt{(7.45)^2 + (16.03)^2} = \%17.67$ olarak hesaplandı (Tablo 3).

Kombine standart belirsizlik değeri k faktörü ile çarpılarak genişletilmiş belirsizlik değeri (U) hesaplandı. k değeri %95 güven aralığını temsil eden 1.96 olarak alındı. $U = 1.96 \times uc = 1.96 \times 17.67 = \%34.64$ değeri bulundu (Tablo 4).

Genişletilmiş ölçüm belirsizliği hasta raporuna iki şekilde yazılabilir (16).

1- Test sonucu (birim) \pm belirsizlik değeri (birim) / referans aralık değerleri şeklinde yazılabilir (Tablo 5). Örneğin: 25(OH)D₃ sonucu 30 ng/mL olan bir hasta için $30 \pm (30 \times 0.34 = 10.2)$ ng/mL şeklinde sonuç verilebilir.

2- Genişletilmiş ölçüm belirsizlik değerine göre testlerin sınır değerleri; (sınır değer x U) olarak hesaplanıp ve sonuçların raporlanması Tablo 6'deki gibi yapılabilir.

Tablo 1. 25(OH)D₃ İç Kalite Kontrol Verileri
Table 1. Internal Quality Control Data of 25 (OH) D₃

	Normal Seviye	Patolojik Seviye	Kontrol Sayısı
Lot 1 (X ORTALAMA)	24.9	83.5	186
Lot 1 (SD)	1.35	5.81	
Lot 1 (%RSD)	5.42	6.95	
Lot 2 (X Ortalama)	14.9	42.3	36
Lot 2 (SD)	1.31	3.48	
Lot 2 (%RSD)	8.79	8.2	
Ortak Lot (%RSD)	7.3	7.6	

Tablo 2. 25(OH)D₃ Dış Kalite Kontrol Verileri
Table 2. External Quality Control Data of 25 (OH) D₃

1. Döngü/1.seviye			1. Döngü /2.seviye			1. Döngü/3.seviye			1. Döngü /4.seviye			1. Döngü /5.seviye		
n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV
154	-6.3	9.9	154	12.9	11.7	154	-8.2	7.7	154	-11.1	10.6	154	-12.9	10
2.döngü/1.seviye			2.döngü/2.seviye			2.döngü/3.seviye			2.döngü/4.seviye			2.döngü/5.seviye		
n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV
157	-14.1	10.3	157	13.4	10	157	26	9.5	157	-3.8	10.4	157	-38	9.5
3.döngü/1.seviye			3.döngü/2.seviye			3.döngü/3.seviye			3.döngü/4.seviye			3.döngü/5.seviye		
n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV
153	6.3	10.6	153	14.4	9.8	153	4.5	12.3	153	5.9	10.4	153	7.4	11.1
4.döngü/1.seviye			4.döngü/2.seviye			4.döngü/3.seviye			4.döngü/4.seviye			4.döngü/5.seviye		
n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV	n	%bias	%CV
152	-0.2	8.9	152	16.3	10.6	152	15.1	9.3	152	22.9	8.8	152	26.7	11.1

Tablo 3. 25(OH)D₃ için RMS, uC_{ref}, u_{bias} ve %Belirsizlik değerleri
Table 3. RMS, uC_{ref}, u_{bias} and % Uncertainty values for 25 (OH) D3

RMS _{bias}	uC _{ref}	u _{bias}	uc
16.01	0.82	16.03	17.67

Tablo 4. 25(OH)D₃ için Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği ve Total İzin Verilebilir Hata
Table 4. Extended Measurement Uncertainty for 25 (OH) D3 and Total Allowable Error

	Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği	Total İzin Verilebilir Hata
25-Hidroksivitamin D3	%34.64	%25

Tablo 5. 25(OH)D₃ için Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği Değerinin Rapor Edilmesi
Table 5. Reporting of Extended Measurement Uncertainty Value for 25 (OH) D3

	Genişletilmiş ölçüm belirsizliğinin rapor edilmesi
25(OH) D ₃ Vitamin	Test sonucu +/- (0.34 x Test sonucu)

Tablo 6. Referans Aralıkların Genişletilmiş Belirsizliğe Göre Gösterimi
Table 6. Demonstration of Reference Intervals by Extended Uncertainty

	Referans aralığın alt değeri	Genişletilmiş belirsizliğe göre düzenlenmiş alt değer	Referans aralığın üst değeri	Genişletilmiş belirsizliğe göre düzenlenmiş üst değer
25(OH) D ₃ Vitamin	20	20 +/- (6.8)	50	50 +/- (17)

TARTIŞMA

Belirsizlik, bir ölçüm ya da deney sonucu ile birlikte verilen ve ölçülen büyüklüğe atfedilmesi mümkün değerleri içinde bulunduran aralıktır. Ölçüm belirsizliği ise, elde edilen test sonucunun kalitesinin kantitatif göstergesidir. Başka deyişle, sonucun, gerçek değeri ne ölçüde temsil ettiğini gösterir. Sonuçla birlikte ölçüm belirsizliği de verilirse, sonucu kullananlara ölçümün kalitesi hakkında bilgi aktarılmış olur (17). Klinik laboratuvarlarda belirsizliği göstermek için genellikle kesinlik kavramını kullanma alışkanlığı mevcuttur. Kesinlik kavramı, belirsizliği ifade etse de kimyasal ölçümlerde daha çok bileşen etkisi değerlendirilerek daha kapsamlı belirsizlik hesaplamaları yapılmalıdır (18). Kemik, barsak, böbrek ve paratiroid bezler gibi pek çok organ üzerine çeşitli etkileri olan D vitamini ölçümünde yöntemler arası farklılıkların olması ve kalibratörlerde standardizasyonun yokluğu tek bir kesim noktasının belirlenmesinde zorluk oluşturmakta ve laboratuvarlar arası farklılıklara yol açmaktadır. Bu yüzden 25(OH)D₃ ölçüm sonucu verilirken

ölçülen veya hesaplanan ölçüm belirsizliği de verilmelidir (12).

Çalışmamızda LC-MS/MS ile analiz edilen 25(OH)D₃ için, Nordest kılavuzunda tanımlanan Avrupa akreditasyon kılavuz/12, Eurolab Teknik Rapor No: 1/3/ ve ISO/DTS 21748 Rehberi/8 baz alınarak oluşturulan ölçüm belirsizliği hesaplama modeli doğrultusunda, genişletilmiş ölçüm belirsizliğini %34.64 olarak bulduk. Toplam hata, ölçüm prosedüründeki sistematik ve rastgele hatanın toplamına eşittir (19). Tıbben müsaade edilen toplam hata (TEa) analitik bir kalite gereksinimi olup, tek bir test sonucu veya tek bir ölçüme ait belirsizlik (rastgele hata) ve bias (sistematik hata) tolere edilebilir sınırlarda ayarlar. Clinical Laboratory Implementation Amendments, 1988 (CLIA'88) kriterleri, ölçümü yapılan maddenin yasal olarak izin verilen maksimum hata sınırlarını belirtmiştir. Bir analit için toplam hata o analit için TEa sınırları içerisinde ise sistemin tanılabilir yeterliliği tatminkardır denilebilir (20). 25(OH)D₃ için ölçüm belirsizliği sonucu, CLIA'88 kriterlerine göre +/- %25 olarak belirlenmiştir. Buna göre laboratuvarımızda

LC-MS/MS ile analiz edilen 25(OH)D₃ testi için bulunduğumuz %34.64 olan genişletilmiş ölçüm belirsizliği CLIA88 kriterlerine uygun değildir. Yaptığımız literatür incelemesinde LC-MS/MS ile 25(OH)D₃ ölçüm belirsizliğine ait herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Ancak 25(OH)D₃ ölçümünün farklı yöntemlerle yapıldığı ölçüm belirsizliği çalışmalarında ise bizim çalışmamızdan farklı sonuçlar gözledik. Demir ve ark. kemilüminesans immün ölçüm yöntemi ile yaptıkları çalışmada, 25(OH)D₃ ölçümü için genişletilmiş ölçüm belirsizliğini %24 olarak bulmuşlardır (21). Cavalier ve arkadaşları 25(OH)D₃ ölçüm belirsizliği için Roche Elecsys cihazında düşük, orta ve yüksek düzeyde serum havuzu kullanarak yaptıkları çalışmada rölatif belirsizlik değerlerini sırasıyla %22.4, %20.9, %14.8 olarak bulmuşlardır (22). Ölçüm belirsizliği değeri, olası D vitamini eksiklik grubuna eklendiği veya çıkarıldığında elde edilen yeni değerlere göre hastaların tanısız yaklaşımları şiddetli eksiklikten yeterli düzeye kadar olan aralıklarda değişim gösterebilecektir. Örneğin; sonucu 14 ug/L olan bir kişinin eksiklik durumu bizim bulunduğumuz ölçüm belirsizliği değerine ($14 \pm 4,7$ ug/L) göre klinik olarak şiddetli eksiklik ya da 17 ug/L sonucu olan bir kişinin eksiklik durumu yine bizim bulunduğumuz ölçüm belirsizliği değerine ($17 \pm 5,7$ ug/L) göre klinik olarak yeterli yorumlanabilir. Ong ve arkadaşları dört farklı ölçüm sisteminin doğruluğunun incelendiği bir çalışmada çoğu yöntemin izin verilebilir hata kriterini karşılamadığını belirtmişlerdir (23). Bunun nedeni olarak da, D vitamin bağlayıcı protein ekstraksiyon yöntemlerinin, 25(OH)D₃ ve metabolitleri ile çapraz reaksiyonunun ve matriks interferansının farklı olması ve standardizasyon yokluğu kabul edilmiştir. Diğer önemli hususlardan biri de 25(OH)D₃ "eksikliği" veya "yetersizliği" tanısını koymada analitik varyasyonun yanı sıra biyolojik varyasyon da göz önünde bulundurulmalıdır. Binkley ve arkadaşları yaptığı çalışmada, 25(OH)D₃ için biyolojik varyasyon %20, sistematik bias ise %17 olarak belirtilmiştir (24). Biz ise çalışmamızda biyolojik varyasyona bağlı belirsizliği ele almadık. Binkley ve arkadaşları laboratuvarların ölçüm ortalamaları arasındaki farkın %50'ye ulaşabildiğini, laboratuvarın kullandığı yöntem ve kesim sınırına

göre bir laboratuvarında normal aralıkta bulunan değerlerin bir başka laboratuvarında yetersiz olarak değerlendirilebildiğini bildirmiştir (24, 25). Hastalarda "25(OH)D₃ 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 (26). Çalışmamızda 25(OH)D₃ için bulunduğumuz ve CLIA'88 kriterlerine göre yüksek çıkan ölçüm belirsizliği değerimizin, hesaplamada kullanılan iki kaynak olan dış kalite ve iç kalite kontrol sonuçlarını değiştirebilecek nedenlere bağlı olarak yüksek çıktığını düşünmekteyiz. Dış kalite kontrole ait olanlardan; hedef değer izlenebilir olmayışı, hedef değer belirsizliğinin ulaşılabilir olmayışı, yeterli sıklıkta dış kalite kontrol çalışılmayışı, materyallerin konsantrasyon ve matriks açısından örneklerle özdeş olmama ihtimali ve diğer muhtemel kısıtlamalar nedeniyle; ayrıca iç kalite kontrol programını etkileyebilecek analizörün bulunduğu odanın sıcaklığı, basıncı ve nemindeki hafif değişimler, analizördeki test ölçümlerini etkileyebilecek elektrik voltaj değişiklikleri ya da yanlış pipetleme ve ayrıca personelin kromatogramda yaptığı herhangi manuel bir grafik düzenlemesi gibi faktörlerden dolayı yüksek bulunduğumuzu düşünmekteyiz. Bu değeri %25'in altına düşürmek için yukarıdaki olası hataları kısıtlayacak hedefe yönelik çözümler aranmalıdır. Örneğin; sistematik hatadan gelen ölçüm belirsizliğini azaltmak için hedef değeri; katılan laboratuvarların sonuçlarının ortalamasından elde etmek yerine, bir sekonder referans materyal ile karşılaştırmak ve bunu izlenebilir kılmak, ayrıca rastgele hatadan gelen ölçüm belirsizliğini azaltmak için de yöntemin analitik performans özelliklerini laboratuvar koşullarında iyi değerlendirmek, iç kalite kontrol verilerini iyi yorumlamak, personele hizmet içi eğitimler vermek gerekir, böylece bu değer hedef değer altına çekilebilmesi mümkün olur. Ölçüm belirsizliğini tanımlamada, uluslararası bir fikir birliği olmayışından dolayı, bu hesaplamada pek çok farklı hesaplama şekli mevcuttur. VIM2, Guide to the expression of Uncertainty in Measurement (GUM)1 , ISO/IEC ve son olarak VIM3 belgeleriyle sunulan

bilgiler bu hesabın nasıl yapılacağı yönünde metrolojik olarak teknikler sunmaktadır. Ancak hesaplamının nasıl yapılacağına dair henüz bir fikir birliği bulunmamaktadır (27). Ölçüm belirsizliği hesabının zor olması ve bu konuda henüz bir fikir birliği bulunmaması nedeniyle çeşitli kılavuzlar yayınlanmaktadır (28, 29). Biyokimyasal metodlar için ölçüm belirsizliği hesaplama yaklaşımları dış kalite kontrol, iç kalite kontrol ve method validasyon çalışmalarından elde edilen verilere odaklanmış durumdadır (30). Nordest kılavuzu ile tanımlanan ölçüm belirsizliği hesabı diğer ölçüm belirsizliği hesapları gibi kalite kontrol ve validasyon çalışmalarına ait verileri kullanmakta olup, asıl amacı bu hesabın daha kolay yapılabilmesi için kullanıcılara yaygın, anlaşılabilir ve pratik bir uygulama sunmaktır (29). Krouwer'a göre ticari kitler GUM'un belirsizlik standartlarına uygun değildir. Ayrıca Krouwer, yöntemin doğruluğu değerlendirilirken referans yöntem ile ticari ölçümler karşılaştırıldığında bazı sonuçların dağılımın dışında kaldığını ve bunun da geniş bir total analitik hata limiti oluşturduğunu söylemektedir ve GUM'un bu uç değerlere müdahalesinin olası olmadığını belirtmektedir. Krouwer, GUM'un çok dar bir aralığı alması sonucu elde edilen belirsizlik ile klinisyenlerin birçok vakayı atlayabileceği görüşündedir. Krouwer'a göre, ölçümün doğruluğuna katkıda bulunan her hata kaynağının detaylarını ele alan bir matematiksel model oluşturulmalıdır (31). Max Feinberg ve arkadaşlarının çalışmasında belirttikleri Tip A ve Tip B belirsizlik değerlendirmelerine yer veren EURACHEM rehberi, esas olarak metodla ve cihazla ilgilenebilir (32). Bu rehberde örneklemeden, personelden ve çevresel etkilerden gelen belirsizlikler hesaba

katılmaz çünkü değerlendirilmelerin zorluğu nedeniyle belirsizliği olduğundan düşük tahmin etmektedir. Bu durumda ölçüm yapan için diğer belirsizlik bileşenlerinin etkisi bir soru işareti olarak kalmaktadır. Tüm bu hesaplamalara rağmen belirsizlik kesin bir değer değil, sadece olasılıktır. Çünkü belirsizliğe yol açan tüm faktörleri göz önünde bulundurmamak ve bu faktörlerden sayısal bir değer elde etmek oldukça güçtür. Laboratuvardaki tüm değişiklikler belirsizliği etkileyebildiği için de belirsizlik sürekli olarak izlenmeli ve belirsizlik tahminleri daha fazla veri eklenerek sürekli iyileştirilmelidir.

Sonuç olarak, 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)D₃ gibi farklı yöntemlerle çalışılan ve ölçüm belirsizliğinin tedavi kararını değiştirebileceği testler için belirsizlik çalışmaları yapılmalıdır.

Çalışmamız sonucunda; 25(OH)D₃ için genişletilmiş ölçüm belirsizliği değeri CLIA'88 kriterlerine göre yüksek bulunmuştur. Bu yüksek değer, daha çok dış kalite kontrolden gelen olmak üzere ve ayrıca iç kalite kontrol programlarını etkileyecek sebeplerden oluştuğunu düşünmekteyiz. Bu değeri %25'in altına düşürmek için olası hataları kısıtlayacak hedefe yönelik çözümler aranmalıdır. Laboratuvarlar olarak amacımız hedeflenen %TEa değerini geçmeyecek biçimde sonuç vermek ve tüm bu konularla ilgili klinisyenleri bilgilendirmek olmalıdır. Tüm bunların ışığında yaptığımız bu çalışmamızın konu ile ilgili diğer araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. LGC Workshop Document [editorial]. EURACHEM Çalıştayı. İstanbul, 2006
2. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide; 3rd Ed. 2000
3. Taylor BN, Guyatt CE. National Institute of Standards and Technology (NIST) Technical Note 1297. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. USA: Washington, Government Printing Office 1994;1-2
4. Tietz NW. A model for a comprehensive measurement system in Clinical Chemistry 1979;833-9
5. Isabel T, Marc DL, Erik VB. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry 2004;23:8
6. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th ed. St Louis: MO Saunders Elsevier, 2008
7. ISO 15189:2007 Medical Laboratories, Particular

- requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes. ISO, 2007
8. Bakır F, Laleli Y. TS EN ISO/IEC 17025 Kapsamında Akreditasyona Teknik Hazırlık. Türk Biyokimya Dergisi 2006;31:96-101
 9. Haeckel R, Püntmann I. Validation of measurement procedures. In vitro veritas 2001;2:20
 10. Jameson JL, Weetman AP. Diseases of thyroid gland. (Çeviri: Y. Sağlıkler). İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2004:2060-75
 11. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clin Proc 2006;81:353-73
 12. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Osteoporoz ve Metabolik Kemik Hastalıkları Tanı ve Tedavi Kılavuzu, Miki Matbaacılık, İstanbul 2016;119-9
 13. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D₃ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 2004;50:1415-7
 14. Magnusson B, Naykki T, Hovind H, Krysell M. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. NORDTEST; 2004, NordTest Report No: TR 537
 15. Bal C, Serdar MA, Torun Güngör O, Çelik HT, Abuşoğlu S, Uğuz N ve ark. Biyokimya parametrelerinin ölçüm belirsizliğinin hesaplanması. Turk J Biochem 2014;39(4):538-43
 16. Üstüner F. Metrolojik İzlenebilirlik Kavramlarının Analitik Kalite Kontrolüne Uyarlanması. Aslan D (Editör). Klinik Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi Kursu Kitabı. İzmir, 2010:95-100.
 17. Bakır F, Laleli Y. TS EN ISO/IEC 17025 Kapsamında akreditasyona teknik hazırlık. Turk J Biochem 2006;31(2):96-101.
 18. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM/CITAC, 2000.
 19. Petersen PH, Fraser CG. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine: 10 years on from the Stockholm consensus conference. Accred Qual Assur 2010;15:323-30
 20. Tağa Y, Aslan D, Güner G, Kutay ZF. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. Ankara: Türk Biyokimya Derneği Yayınları; 2000:46-89.
 21. Demir M, İnce FD. İmmünassay Yöntemi ile 25-Hidroksivitamin D₃ Ölçüm Belirsizliğinin Değerlendirilmesi. Türk Klinik Biyokimya Derg 2014;12(3):107-14
 22. 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.
 23. 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.
 24. Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK. Correlation among 25-hydroxy-vitamin D assays. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(5):1804-8.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Aytekin M, Cevlik T, Emerk K. Describing an ideal model for calculating the uncertainty of measurements in a clinical laboratory. Clin Biochem 2009; 42(4-5):321-2.
 28. 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.
 29. Magnusson B, Naykki T, Hovind H, Krysell M. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, NordTest Report TR 537. NORDTEST, Finland, 2004.
 30. Barwick V. Evaluating measurement uncertainty in clinical chemistry. UK National Measurement Systems: Report no: LGC/R/2010/17, 2012.
 31. Krouwer JS. Critique of the Guide to the expression of uncertainty in measurement method of estimating and reporting uncertainty in diagnostic assays. Clin Chem 2003;49(11):1818-21.
 32. Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. Anal Bioanal Chem 2004;380:502-14.