

## Klinik Biyokimya'da Yöntemlerin Kalite Kontrolü

Asuman H. GÜLER\*

### ÖZET

*Bir laboratuvarın verdiği sonuçların güvenilirliği, öncelikle o laboratuvarda kullanılan yöntemlerin belirli kurallara göre, kalite kontrolden geçmesine bağlıdır. Klinik biyokimyacı ister yeni bir yöntem oluştururken, isterse hazır kitleri değerlendirirken, bazı analitik işlemleri yapmak ve sonuçlarını değerlendirmek zorundadır. Ancak bundan sonra o yöntemin kabulü ve laboratuvarında kullanılması uygun olur. Burada bir klinik biyokimya laboratuvarında yeni kurulan yöntemlerin kalite kontrolünü yaparken nasıl bir yol izlenmesi gerektiği kısaca anlatılmaya çalışılmıştır. Aynı kriterler, hazır biyokimyasal kitlerin yöntemlerinin irdelenmesinde de kullanılmalıdır.*

### SUMMARY

#### Quality Control of the Methods in Clinical Biochemistry

*The accuracy of the results of a clinical laboratory, primarily depends on the quality control of the methods used, according to certain principles. When establishing a new method or evaluating the method of a commercial biochemical kit, clinical biochemists have to do some*

---

\* Doç. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

*analytical procedures and investigate their results. Unless then that method can be accepted and used appropriately in the laboratory. Here, in a clinical biochemistry laboratory, while working on a new method, the quality control procedures which one must follow up is tried to discuss. The same criteria should also be used when evaluating a commercial biochemical kit.*

Günümüzde klinik biyokimya laboratuvarları giderek hazır kitlelerle çalışmayı yeğlemektedirler. Bunun en önemli sebeplerinden birisi biyokimyacı olmayışları, ikincisi ise kitle çalışmanın daha kolay gelmesidir. Oysa kitle çalışmak genellikle birim test fiyatının yükselmesine sebep olur. Bu nedenle bazı yöntemler biyokimyacı tarafından kurulup, çalışılabilir. İşte burada, bir yöntem çalışmasında neler önemlidir, kalite kontrol nasıl yapılmalıdır, gibi sorulara yönelik konular tartışılmaya çalışılacaktır.

Her yöntemin kalite kontrolü için, aşağıda belirtilen işlemler sırasıyla yapılmalıdır:

**1- Cihazın Ayarı:** Cihazın ayarı denince genellikle anlaşılan sıfır ayarıdır. Bu ya havaya karşı ya da distile suya karşı yapılır. Bazen de önce hava sonra suya karşı çift ayar söz konusudur. Bazı cihazlarda bundan sonra, "düşük ve yüksek kontrol" adı verilen ayraçlarla ikinci bir ayar sistemi olabilir (Ör. alevli fotometreler)<sup>1</sup>.

**2- Kör Ayarı:** Cihazın sıfırlanmasından sonra tekrar köre göre sıfır ayarı yapılır. Bazı yöntemlerde körün absorbanı alınır (Bu yöntemlerde köre göre sıfırlama yapılmaz). Örneklerin absorban değerleri okunduktan sonra; "Gerçek Örnek<sub>Abs</sub> = Örnek<sub>Abs</sub> - Kör<sub>Abs</sub>" denkleminde hesaplanır. Bazı gelişmiş cihazlarda ise kör ve örnek aynı anda okunup sonuç otomatik olarak verilmektedir (Ör. "double-beam spectrophotometers")<sup>2</sup>.

**3- Standart Çalışması:** Üç şekilde yapılmalıdır: a) Sulu, standart çözeltileri ile, c) Sulandırılmış örnekle, standart çözeltileri ile, c) Örnekle standart çözeltileri ile. Standart çalışmasında örnek olarak, hazır kontrol serumu veya hazırlanmış örnek havuzları kullanılabilir. Bunların her biri ile standart eğri grafiği çizilip, grafiklerde iki konu değerlendirilir<sup>3</sup>:

a) Eğrinin Doğrusallığı (lineeritesi): Yöntemin doğruluk derecesini (accuracy) gösterir. Bu nedenle önemlidir. Eğrinin maksimum hangi konsantrasyona kadar doğrusal olduğu sınanmalı ve belirtilmelidir.

b) Eğrinin Eğimi (slope): Yöntemin duyarlılığını gösterir. Günlük ufak varyasyonlar olabilir. Bu, o günkü deney koşullarına, cihazın kalibrasyonuna ve ölçüm yapılan küvetin yaşına bağlı olabilir.

Ticari kitlerde genellikle standartla çalışma yerine daha önceden belirlenmiş bazı çarpım faktörleri verilmektedir. İyi bir biyokimyacı, önce kendisi, o kitin araçlarını kullanarak standartla çalışmalı ve verilen faktörlerin doğruluğunu sınamalıdır. Ancak emin olunduktan sonra, kitde verilen faktörler standart yerine kullanılabilir. Çünkü, kitlerde verilen bu standart çarpım faktörleri, belli cihaz ve yöntemle göre saptanmış değerlerdir. Cihaza bağlı değişkenlik olabilir.

#### 4- Örnekler<sup>4</sup>:

a) Örneğin Hazırlanması: Örnekler ya direk ya da ekstraksiyon, konsantrasyon veya sulandırıldıktan sonra kullanılabilir. Ekstraksiyonda kontaminasyon ve madde kaybı riski vardır. Dilusyonda ise, sulandırma işleminin standartlarla orantılı yapılmasına dikkat edilmelidir.

b) Örnek Hacmi: Cihazın özelliğine göre belirlenir. Minimum hacim bir yerde minimum araç harcama demektir. Hem ekonomik açıdan avantajlıdır, hem de hastalardan alınan kan örneklerinin az olması daha az sorun doğurur (özellikle pediatrik olgularda). Ama, hacim azaldıkça hata payı artar. Ayrıca, cihaza göre deney hacminin azaltılması, test sonuçlarının güvenilirliğini azaltabilir.

**5- Kontrol Çalışması<sup>5</sup>**: Yöntemin doğruluğunu gösteren en önemli kriterlerdendir. Hergün, örneklerle bir kontrol çalışılmalıdır. Hazır ticari kontrol serumları ve sağlıklı insanlardan elde edilen "örnek havuzları" kontrol çalışmasında kullanılabilir. Ayrıca "sıfır, düşük ve yüksek kontrol" gibi, ölçümü yapılan maddenin değişik konsantrasyonlarda bulunduğu çözeltiler veya havuzlarda hazırlanıp kontrol olarak kullanılabilir.

Kontrollerde, örnekler gibi hazırlanmalı ve çalışılmalıdır. Normalde, rutin laboratuvarlarında, hergün çalışılan parametrelerin en azından bir kısmını içeren kontrol serumlarının çalışılması gerekir. Bu hem yöntemlerin hem de çalışanların verdikleri sonuçların doğruluğunu sınamaya yarar. Kontrol çalışması, bir yerde o laboratuvarın günlük sağlamasıdır.

**6- Standart Ekleme (Recovery) Çalışması<sup>6</sup>**: Belli miktarda örnek üzerine belli miktarlarda madde içeren standartların eklenmesi ile yapılır. Örnekteki bazal madde konsantrasyonu saptandıktan sonra bunun üzerine konsantrasyonu giderek artan standartlardan eklenerek, o maddenin her seferinde miktar belirtimi yapılır. Eklenen kadar bulunabiliyor mu? Elde edilirlilik yüzdesi ve ilişkin grafik çizilerek sonuçlar değerlendirilir.

"Recovery" çalışması da değişik şekillerde örnekler hazırlayarak (ekstraksiyon, konsantrasyon, sulandırılmış veya direk), bunlarda sınanmalıdır. Ayrıca örneğe dışardan eklenecek maddelerin "recovery" üzerindeki etkileri (ör. pH değişiminin etkisi) incelenmelidir. Sonuçta hangi örnekte veya hangi madde ilave edildiğinde en iyi "recovery" varsa, o tercih edilir. Zaten "recovery" çalışması, bir yerde örneğin hazırlanma şeklini de böylece belirlemiş olur.

## 7- "Precision" (İsabet Derecesi) Belirleme Çalışması<sup>7-9</sup>:

a) Deney İçi (within-run, intraassay) "Precision": Cihazın stabilitesini göstermesi açısından önemlidir. Aynı gün, aynı örnek 10-20 veya 30 kez çalışılır ve her biri için  $\bar{X} \pm SS$  ve % CV (değişkenlik katsayısı, "coefficient of variation") hesaplanır.

b) Deneyler Arası (between-run, interassay) "Precision": Bir örnek havuzu hazırlanıp, ufak şişelere ayrılır. Sonra bu havuzdan 10 gün veya 20 gün süreyle, günde bir kez çalışılır. Sonuçta  $n = 10$  ve  $n = 20$  için,  $\bar{X} \pm SS$  ve % CV değerleri hesaplanır. Genellikle deneyler arası % CV değerleri, deney içi % CV değerlerine kıyasla iki kat fazla bulunmaktadır. Deneyler arası "precision" daha çok örneğin stabilitesini gösterir. Ama bir testin isabet derecesinin yüksek olması için genelde her iki varyasyon katsayısının da küçük olması istenir.

8- İnterferans<sup>10,11</sup>: Örnekte analizi yapılacak madde dışında başka maddeler de vardır. Bunlar, ölçümü istenen maddenin varoldan fazla veya düşük bulunmasına yol açabilirler. Ölçümü yapılan her maddeyi interfere eden maddeler ayırılır. Bunların etkileri araştırılmalı ve o yöntemdeki interferans dereceleri belirlenmelidir. Bu amaçla katyonik ve anyonik maddelerin, albumin, sulandırıcı ve çözücü maddelerin, hemoliz ve pH değişiminin interferans etkileri araştırılır.

9- Sensitivite<sup>3</sup>: Bir yöntemin duyarlı olup olmadığını gösteren başlıca üç kriter vardır:

a) Standart eğrinin eğimi ve değişkenlik derecesi,

b) LOD (limit of detection) değeri: Kör sinyalinin standart sapmasının 2 veya 3 katıdır. Sıfıra göre 10 kez ( $n = 10$ ) kör absorbansı alınarak  $\bar{X} \pm SS$  değerlerinden kabaca hesaplanabilir.

c) LOQ (limit of quantitation) değeri: Kör sinyalinin standart sapmasının yaklaşık 10 katı kadardır.

Son iki değer bir yöntemin performansını gösteren kriterlerdir. Bu nedenle analitik bir çalışmada mutlaka belirlenmelidirler.

10- "Accuracy"<sup>12,13</sup>: Bir yöntemin kabul veya red edilmesinde birincil faktördür. Doğru ölçüm yapamayan yöntem reddedilir. "Accuracy" yi belirleyen kriterler, aslında yukarıda anlatılanlardan belirlenmektedir. Bir yöntemin doğru sonuç verdiğini söyleyebilmek için, o yöntemde: - Standart eğrinin lineer olması, karşılaştırılan iki yöntem arasındaki t testi farkının az olması, daha da iyisi önemsiz olması, LOD ve LOQ değerlerinin ufak olması (kör etkisinin az olduğunu gösterir), matriks interferansının az olması, "recovery" sonuçlarının yüksek olması, deneyde kullanılan tamponun etkisinin minimal olması gerekir.

Sonuç olarak, belirli bir cihazda, belirli bir analitik yöntemin doğruluk derecesinin yüksek olması o yöntemin kabulünü sağlar.

**11- Normal Değerler (ve Sınırlar)<sup>14</sup>:** Klinik biyokimyada "normal değerler" terimi üç değişik anlama gelebilir: İstatistiksel açıdan "Gaussian" dağılım olasılığı, epidemiyolojik açıdan "en sık rastlanan", klinik açıdan da "patolojik olmayan". Bu nedenle, artık normal değerler yerine IFCC (International Federation of Clinical Chemistry)'nin önerdiği "referans değerler" terimi tercih edilmektedir. Gene kaynak ve kitlerde verilen referans değerler belli bir topluma ve belli bir yönteme göre saptanan değerlerdir. Bu nedenle yeni bir yöntemde ve kitteki referans değerler o laboratuvarın koşullarına ve yöntemin uygulanacağı topluma göre belirlenmeli ve standartlaştırılmalıdır<sup>15</sup>.

Özetlersek; bir yöntemi değerlendirirken yukarda anlatılan tüm verilerin çalışılmış ve incelenmiş olmasına dikkat edilmelidir. Ticari biyokimyasal kitlerin yöntemleri de benzer şekilde kalite kontrolden geçirilmeli ve ondan sonra kabul edilmelidir. Aksi takdirde o analitik yönteme ait eksik noktalar kalabilir. Bu ise test sonuçlarının güvenilirliğini azaltır.

#### KAYNAKLAR

1. MASON, W.B.: Flame Photometry. In: Clinical Chemistry, Principles and Technics (eds. Henry, R.J., Cannon, D.C., Winkelman, J.W.). 2nd ed., Harper and Row. Publishers, Hagerstown, 1974, p. 49-63.
2. CARAWAY, W.T.: Photometry. In: Textbook of Clinical Chemistry (ed. N.W. Tietz). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, p. 55-78.
3. MACDOUGALL, D., CRUMMETT, W.B.: Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. Anal. Chem., 52: 2242-9, 1980.
4. ARONSON, T., VERDIER, C., GIOTH, T.: Factors influencing the quality of analytical methods-a system analysis, with computer simulation. Clin. Chem., 20: 738-48, 1974.
5. GILBERT, R.K.: Progress and analytical goals in clinical chemistry. Am. J. Clin. Pathol., 63: 960-73, 1975.
6. HARRIS, E.K., KANOFKY, P., SHARARJI, G., COTLOVE, E.: Estimating biological components of variation. Clin. Chem., 16: 1022-7, 1970.
7. ROSS, J.W., FRASER, M.D.: Clinical laboratory precision. Am. J. Clin. Pathol., 78: 578-86, 1982.
8. WESTGARD, J.O., FALK, H., GIOTH, T.: Influence of a between-run component of variation, choice of control limits and shape of error distribution on the performance characteristics of rules for internal quality control. Clin. Chem., 25: 394-400, 1979.

9. GERRITREN, W.E.: Analytical precision in clinical chemistry and medical decisions. *Am. J. Clin. Pathol.*, 73: 183-95, 1980.
10. TIETZ, N.W. (ed.): *Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1986, p. 417-23.
11. STATLAND, B.E., WINKELL, P.: Sources of variation in laboratory measurements. In: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 16th ed. (ed. J.B. Henry). Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1979, p. 3-28.
12. WESTGARD, J.O.: Precision and accuracy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 13: 283-330, 1981.
13. WESTGARD, J.O., CAREY, R.N., WORLD, S.: Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clin. Chem.*, 20: 825-33, 1974.
14. ALSTRÖM, T., GRASBECK, R., HJELM, M.: Recommendation concerning the collection of reference values in clinical chemistry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 35/144: 1-45, 1975.
15. LOGAN, J.E.: Criteria for kit selection in clinical chemistry. In: *Clinical Biochemistry: Contemporary Theories and Technics*. Vol. 1 (ed. H. Spiegel). Academic Press, New York, 1981, p. 43.

Doç. Dr. Asuman H. GÜLER

U.Ü. Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Görükle / BURSA