

# ANALİTİK YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

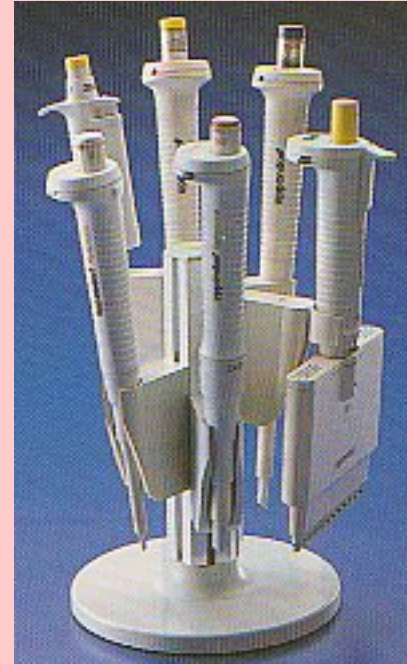
Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK

ADÜTF Biyokimya AD

2004

# Laboratuvarlarda yararlanılan analiz yöntemleri performans kalitelerine göre üç sınıfta toplanabilir:

- Kesin yöntemler
- Referans yöntemler
- Rutin yöntemler



Klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan yöntemler **rutin yöntemlerdir**.

**Rutin analiz yöntemlerinin;**

-en güvenilir

-en kısa zamanda

-en uygun maliyette sonuç verecek kalitede olması beklenir.

Klinik kullanılabilirliği kanıtlanmış olan analizleri bir laboratuvar da uygulamak için, öncelikle ölçüm yöntemleri metodolojik, performans, uygulama karakteristikleri ve maliyet açısından incelenir; daha sonra yöntem değerlendirme deneyleri yapılır.

# Yöntemin metodolojik karakteristikleri

- Analitik duyarlılık
- Analitik özgüllük
- Kimyasal reaksiyon tipi
- Reaksiyon koşullarının optimizasyonu
- Sonuçların klinik kullanıma uygunluğu
- Analitik prosedürün uygulanabilirliği

# Yöntemin performans karakteristikleri

- Kesinlik (tekrarlanabilirlik)
- Geri elde (recovery)
- Girişim (interferans)
- Doğruluk
- Tespit sınırı
- Analitik aralık
- Reaktif dayanıklılığı

# Yöntemin uygulama karakteristikleri

- Örnek tipleri
- Hasta örneği hacmi
- Analiz süresi
- Test sayısı/saat (bir saatteki test kapasitesi)
- Çalışma grubu sayısı
- Personel gereksinimi
- Cihaz gereksinimi
- Çevresel kirletme etkileri

# Yöntemin maliyet karakteristikleri

- Toplam satın alma maliyeti
- Test başına maliyet
- Her rapor için test maliyeti
- Verimlilik ve işçi maliyeti



# Yöntem değerlendirme deneyleri uygulama planı 1

## Ön değerlendirme deneyleri:

- Çalışma planının yapılması
- Standartlarla doğrusalılık ve çalışma grup içi değişkenliğin hesaplanması
- Protein içeren örneklerle çalışma grup içi ve günler arası değişkenliğin hesaplanması
- Geri elde ve interferans (girişim) deneyleri

# Yöntem değerlendirme deneyleri uygulama planı 2

## Son değerlendirme deneyleri:

- Günler arası değişkenlik derecesinin saptanması (aynı zamanda referans örnek kalite kontrol sisteminin oluşturulması)
- Güvenilen bir yöntem ile karşılaştırma
- Analitik geçerliliğin kabulü
- Gerekliyorsa klinik korelasyon deneylerinin yapılması (referans aralık, spesifik hasta grubu çalışmaları)

# Yöntem değerlendirme deneyleri uygulama planı 3

## **Uygulama:**

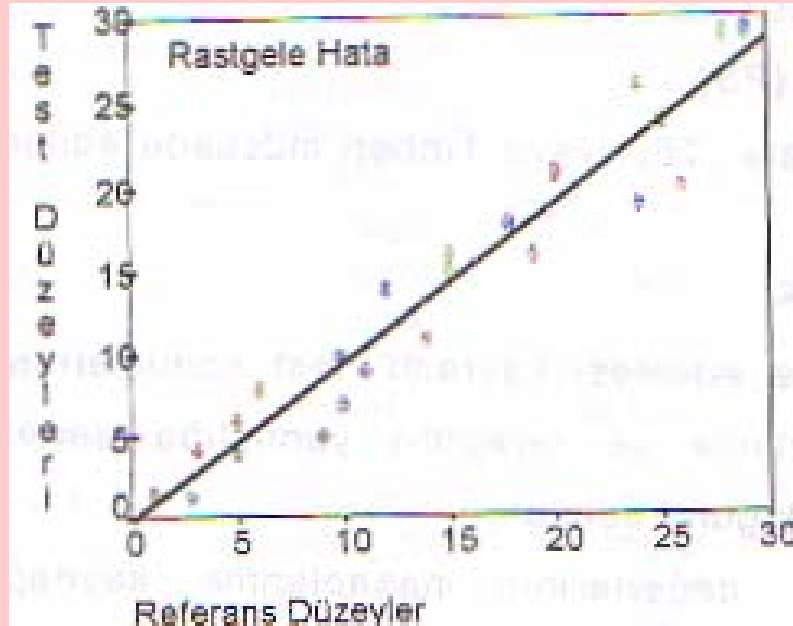
- Kalite kontrol sisteminin kurulması
- Laboratuvar çalışanlarının eğitimi
- Yöntemin rutin kullanıma sokulması
- Rutin performans izlenmesi

# Yöntem değerlendirme deneylerinde incelenen temel karakteristikler

<b>Temel karakteristikler</b>	<b>İlişkili olduğu hata</b>	<b>İstatistiksel ölçüt</b>
Belirsizlik	Rastgele hata (RE)	Standart sapma (s) Değişkenlik katsayısı (CV)
Doğruluk	Sistemik hata (SE) Sabit hata (CE) Oransal hata (PE) Diğer SE	Bias, geri elde (R)
Toplam hata	SE+RE	

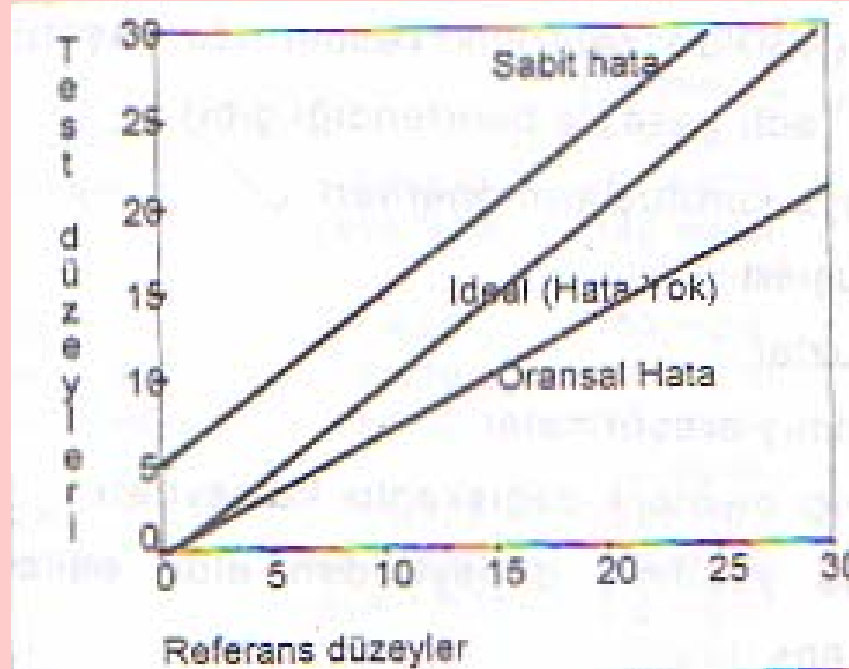
# Rasgele hatalar (RE)

Düzeltilemeyen ve kontrol edilemeyen birçok değişkene bağlı hatalar. Analizin kesinliğine etki ederler, standart sapmanın büyük olmasına neden olurlar.  $N > 30$  ise hataların birbirlerini götüreceği ve sonuçlar üzerine pek yansımayacağı kabul edilir.



# Sistemik hatalar (SE)

Analiz sonucunu sabit ve belirli düzeyde değiştiren, nedeni bilinen ve ölçülebilir kesin değerlere sahip hatalar. Sabit hata (CE) ve oransal hata (PE) olmak üzere iki tiptir. Analiz sonucunun doğruluğunu etkilerler.



# Büyük hatalar

Yanlış deney planlama ve hesaplama ile ilgili.  
Deney tekrarlanmalı veya sonuçlar iptal edilmeli.  
Çoklu ölçümlerde şüpheli değerin atılması için Q testinden yararlanılır.

$[Q_{\text{hesaplanan}} = |X_{\text{şüpheli}} - X_{\text{şüpheli değere en yakın değer}}| / (\text{Max} - \text{Min})] > Q_{\text{kriter}}$  ise, şüpheli değer verilen güven seviyesinde atılabilir.

# Karar için gerekli ölçülebilir değerler

- Performans standartları: Kabul edilebilir performans için standartlar
- Deney protokolu: Laboratuvar koşullarında performansın saptanabilmesi için deneysel protokol
- Karşılaştırma kriteri: Saptanan performansın performans standartları ile karşılaştırılması kriteri



# Performans standartları 1

Tıbben müsaade edilen toplam hata ( $TE_a$ ) veya tıbben müsaade edilen hatadır ( $E_A$ ).

-Her analit için farklıdır

-Hatanın tıbben müsaade edilmesi kavramı, analiz sonuçlarının tıbbi kararda (tanı, izleme, tedavi) yanlışlığa sebep olmayacak sınırlarda olduğunu açıklar

-Müsaade edilen hata değerlerinin hesaplanma kaynağı hakkında çok sayıda görüş vardır

-Tıbbi karar düzeyi ( $X_c$ ) temel alınarak hesaplanır

# Performans standartları 2

Örnek: Glukoz için performans standartları

<b>Performans standardı</b>	<b>Tıbbi karar düzeyi (<math>X_c</math>)</b>	<b>Tıbbi karar</b>
6,0 mg/dl	50 mg/dl	Hipoglisemi
14,0 mg/dl	140 mg/dl	Bozuk açlık glukozu
20,0 mg/dl	200 mg/dl	Bozuk tolerans eğrisi
30,0 mg/dl	300 mg/dl	İnsülin tedavisi

# Deney protokolu

<b>Analitik hata tipleri</b>	<b>Değerlendirme deneyleri</b>	
	<b>Ön deneyler</b>	<b>Son deneyler</b>
Rastgele hata (RE)	Çoklu analizler Grup içi •Standartlarla •Gerçek örneklerle	Çoklu analizler Gruplar arası •Gerçek örneklerle
Sistemik hata (SE) Sabit hata (CE) Oransal hata (PE) Diğer SE	İnterferans Geri elde Doğrusallık	Yöntem karşılaştırma (güvenilirliği bilinen bir yöntemle)

# Karşılaştırma kriteri (karar kriteri)

Hesaplanan analitik hata, tıbben müsaade edilen analitik hata ( $E_A$ ) ile karşılaştırılır.

## **Yaygın kullanılan karar kriterleri:**

-Tıbben müsaade edilen hata kriterine göre

- $3 \times s \leq E_A$  ise yöntem kontroldedir
- $4 \times s \leq E_A$  ise yöntem kontroldedir (maliyet açısından da uygun)

-Biyolojik değişkenlik kriterine göre

- $2 \times s \leq CV_{\text{birey içi}}$  ise yöntem kontroldedir
- $2 \times s \leq CV_{\text{grup}}$  ise yöntem kontroldedir

Yaygın kullanılan analitler için CLIA 88'e (Clinical Laboratory Improvement Amendments Act 1988) göre önerilen performans kriterleri

<b>Analit</b>	<b>X<sub>c</sub></b>	<b>Kabul edilen perf. kriteri</b>	<b>Müsaade edilen hata</b>	<b>Max. standart sapma</b>
ALT	50 U/L	±%20	10	2,5
Ca	10,8 mg/dl	±1,0 mg/dl	1,0	0,25
Glukoz	140 mg/dl	±%10	14	3,5
Total Kol.	200 mg/dl	±%10	20	5,0
Kreatinin	3,0 mg/dl	±%15	0,45	0,11
TG	160 mg/dl	±%25	40	10

# Yöntem değerlendirme deneyleri

Deney protokolunda belirtilen sırada ön değerlendirme ve son değerlendirme deneyleri yapılır.

## Ön değerlendirme deneyleri:

- Rastgele hatanın (RE) saptanması için çoklu ölçümler
- Sistemik hataların (SE) saptanması için interferans, geri elde, doğrusallık (rapor edilebilir aralık) deneyleri

## Son değerlendirme deneyleri:

- Rastgele hata için çoklu ölçümler
- Sistemik hata için yöntem karşılaştırmaları

# Ön değerlendirme deneyleri 1

**Çoklu ölçümler:** Rastgele hatayı (RE) saptamak için yapılır.

1. Süre : Grup içi, gruplar arası, günler arası
2. Örnek sayısı : En az 20 örnek
3. Örnek matrisi : Hasta örneği matrisi
4. Analit konsantrasyonu: Tıbbi karar düzeyi ( $X_c$ )
5. Hesaplanan ölçütler: Aritmetik ortalama, s, CV

# Ön değerlendirme deneyleri 2

**Çoklu ölçümler için örnek: Glukoz**

$$X_c = 140 \text{ mg/dl}$$

$$E_A = 14 \text{ mg/dl}$$

Sonuçlar: Aritmetik ortalama = 139 mg/dl,  $s = 2,3$  mg/dl,  
 $\%CV = 1,6$  (N=20) ise

$RE = 4 \times s = 4 \times 2,3 = 9,2 \text{ mg/dl} < E_A = 14 \text{ mg/dl}$   
olduğuna göre performans yeterlidir.



# Ön değerlendirme deneyleri 3

**İnterferans deneyleri:** İnterferans oluşturan bileşiklerden gelen sabit hatanın (CE) veya biasın hesaplanması amacıyla yapılan deneylerdir.

*Bias, ortalama sistematik hata veya ölçülen konsantrasyonlar ile gerçek konsantrasyonlar arasındaki farkların ortalamasıdır.*

# Ön değerlendirme deneyleri 4

**İnterferans deneyleri için örnek:** Glukoz için kreatinin interferansı

Örnek hazırlama:

1.örnek: 1,0 ml serum + 0,1 ml su (bazal konsantrasyon için)

2.örnek: 1,0 ml serum + 0,1 ml 50 mg/dl kreatinin standardı

3.örnek: 1,0 ml serum + 0,1 ml 100 mg/dl kreatinin standardı

# Ön değerlendirme deneyleri 5

Hesaplamalar:

Eklenen kons. = St. kons. x [ml st. / (ml st. + ml serum)]

İnterferans = Kons.<sub>(test)</sub> - Kons.<sub>(bazal)</sub>

(CE = bias = Kons.<sub>(test)</sub> - Kons.<sub>(bazal)</sub>)

Ölçülen glukoz	Eklenen Krea.	İnterferans
140 mg/dl	-	-
144 mg/dl	4,5 mg/dl	4 mg/dl
151 mg/dl	9.1 mg/dl	11 mg/dl

(Glukoz için:  $X_c = 140$  mg/dl       $E_A = 14$  mg/dl)

# Ön değerlendirme deneyleri 6

Karar:

4,5 mg/dl kreatinin eklendiğinde;

$CE = \text{bias} = \text{interferans} = 4 \text{ mg/dl} < E_A = 14 \text{ mg/dl}$   
olduğundan performans yeterlidir.

9,1 mg/dl kreatinin eklendiğinde;

$CE = \text{bias} = \text{interferans} = 11 \text{ mg/dl} < E_A = 14 \text{ mg/dl}$   
olduğundan performans yeterlidir.

# Ön değerlendirme deneyleri 7

**Geri elde deneyleri:** Oransal hatanın (PE) hesaplanması amacıyla yapılır.

**Örnek:** Kalsiyum için geri elde deneyleri

Örnek hazırlama:

1.örnek: 2,0 ml serum + 0,1 ml su (bazal konsantrasyon ölçümü için)

2.örnek: 2,0 ml serum + 0,1 ml 15 mg/dl kalsiyum standardı

3.örnek: 2,0 ml serum + 0,1 ml 100 mg/dl kalsiyum standardı

# Ön değerlendirme deneyleri 8

Hesaplamalar:

$$\text{Eklenen kons.} = \text{St. kons.} \times [\text{ml st.} / (\text{ml st.} + \text{ml serum})]$$

$$\text{Geri elde kons.} = \text{Kons.}_{(\text{test})} - \text{Kons.}_{(\text{bazal})}$$

$$\text{Geri elde \% 'si} = (\text{Geri elde kons.} / \text{Eklenen kons.}) \times 100$$

$$[\text{PE} = (|\text{Ortalama geri elde \% 'si} - 100|/100) \times X_c ]$$

# Ön değerlendirme deneyleri 9

<b>Ölçülen kons.</b>	<b>Eklenen kons.</b>	<b>Geri elde kons.</b>	<b>Geri elde %'si</b>
6,43 mg/dl	-	-	-
7,10 mg/dl	0,71 mg/dl	0,67 mg/dl	%94
10,8 mg/dl	4,76 mg/dl	4,37 mg/dl	%92
Ortalama			%93

(Kalsiyum için:  $X_c = 10,8$  mg/dl

$E_A = 1,0$  mg/dl)

# Ön değerlendirme deneyleri 10

Karar:

$PE = (|Ortalama\ geri\ elde\ \% 'si - 100|/100) \times X_c = (|93 - 100|/100) \times 10,8 = 0,07 \times 10,8 = 0,76\ mg/dl < E_A = 1,0\ mg/dl$  olduğundan performans yeterlidir.



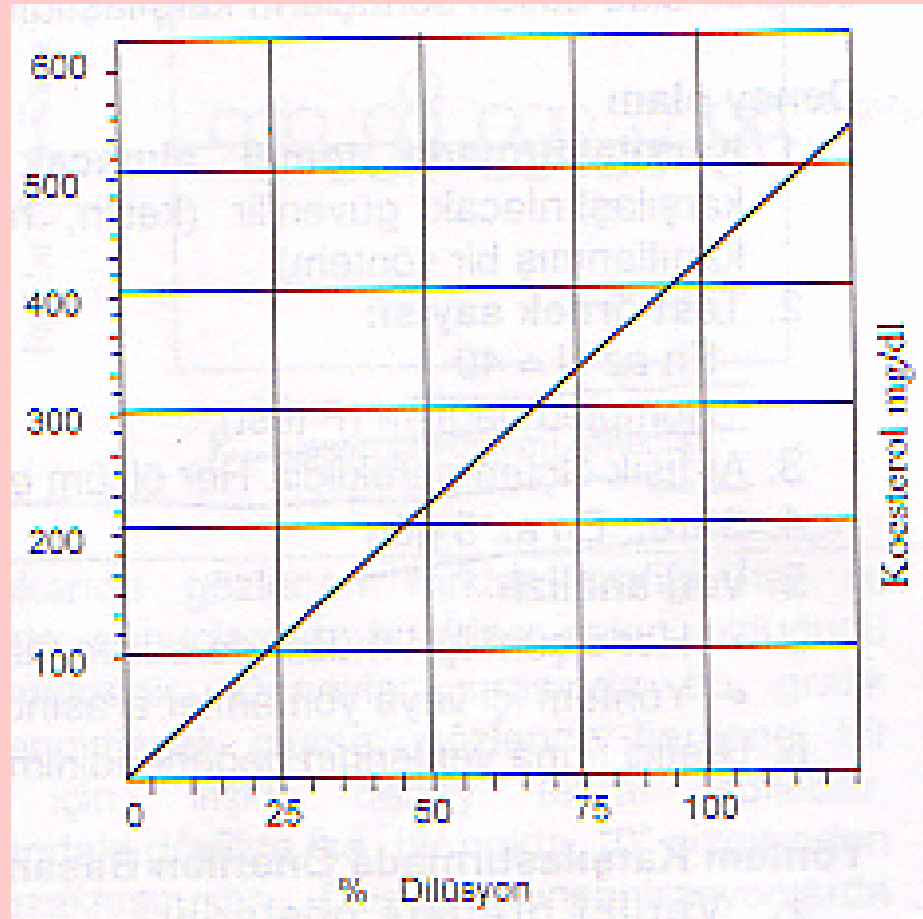
# Ön değerlendirme deneyleri 11

## **Doğrusallık (rapor edilebilir aralık) deneyleri:**

Doğrusallıktan sapmaya neden olan hataların (bias) hesaplanması amacıyla yapılır.

Olası en düşük ve en yüksek konsantrasyonlardaki örneklerden çeşitli dilüsyonlar (en az 5 örnek) hazırlanır. Bunların hepsinde analit konsantrasyonu ölçülür. x-eksenine dilüsyonlar, y-eksenine karşılık gelen konsantrasyonlar yazılır. Çizilen grafikten doğrusallıktan ayrıldığı dilüsyon ve konsantrasyon saptanır.

# Ön değerlendirme deneyleri 12



# Son değerlendirme deneyleri 1

## **Çoklu ölçüm deneyleri (günler arası değişkenlik ölçümü):**

1.Cihazın tekrarlanabilirlik performansının değerlendirilmesi

-20 çalışma günü, günde 2 grup, her analiz örneği çift çalışılmalıdır

-Tek cihazda, aynı kalibratör ve aynı kalibrasyon süresiyle çalışılmalıdır

-Ön değerlendirme deneylerinde hesaplandığı gibi hata hesaplanır.

# Son değerlendirme deneyleri 2

## 2.Üretici verilerine göre kanıtlama

-Minimum yaklaşım: 20 gün süre ile tek reaktif lotunda, aynı kalibrasyon süresinde, aynı cihaz ve tek operatör ile deneyler yapılır.

-Diğer yaklaşım: 20 gün süre ile farklı reaktif lotları, farklı kalibrasyonlar, farklı operatörler ve cihazlar ile fakat aynı kalibratör ile deneyler yapılır.

-Çoklu cihaz sonuçları: Diğer yaklaşımda olduğu gibi her cihazda havuz verileri 20 gün veya daha fazla süre toplanır. Nested varyans analizi ile değerlendirilir.

# Son değerlendirme deneyleri 3

## **Sistematiik hata için son değerlendirme deneyleri (yöntem karşılaştırma deneyleri):**

Deney planı:

- Yeni test yöntemi ile karşılaştırılacak (kesin, referans veya daha önce kullanılan ve güvenilirliği kanıtlanmış) yöntem seçilir
- En az 40 örnek çalışılır
- Her ölçüm en az iki kez yapılmalıdır
- En az 5 gün çalışılır
- Veri analizi yapılır ve üretici firma verileri değerlendirilir

# Son değerlendirme deneyleri 4

Yöntem karşılaştırma verilerinin analizinde yararlanılan istatistiksel teknikler:

-F-Test

-Korelasyon katsayısı (r)

-t-Test istatistiği

-Regresyon istatistiği

# Son değerlendirme deneyleri 5

F-Test:

İki yöntemin varyansları arasındaki farkın anlamlılığı test edilir.

$F_{hes} < F_{tablo}$  ise varyanslar arasında anlamlı farklılık yok

$F_{hes} > F_{tablo}$  ise varyanslar arasında anlamlı farklılık var

# Son değerlendirme deneyleri 6

Korelasyon katsayısı ( $r$ ):

Kovaryansın total varyansa oranıdır; test yönteminin karşılaştırma yöntemindeki değişiklikleri izleme kapasitesini gösterir.

$r = 1$  ise mükemmel pozitif korelasyon var

$r = -1$  ise mükemmel negatif korelasyon var

$r = 0$  ise korelasyon yok



# Son değerlendirme deneyleri 7

t-Test istatistiği

İki yöntem ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığı test edilir.

$S_d \rightarrow$  farkların standart sapması

$t_{hes} < t_{tablo}$  ise iki yöntem ortalamaları arasında fark yoktur

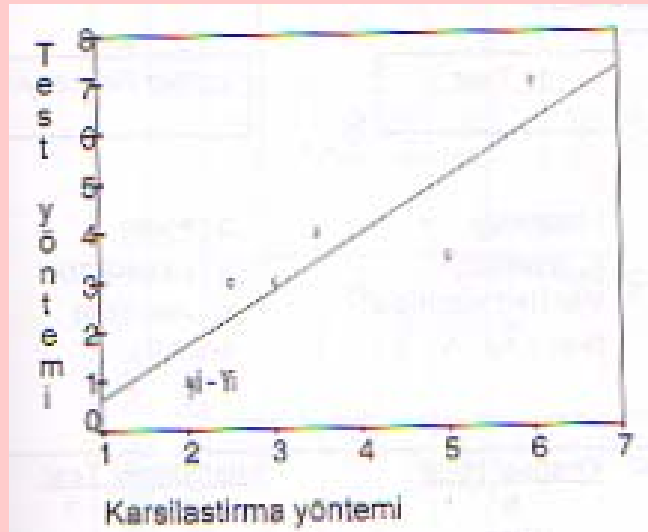
$t_{hes} > t_{tablo}$  ise iki yöntem ortalamaları arasında fark vardır

# Son değerlendirme deneyleri 8

## Regresyon istatistiği

-Lineer regresyon veya en kuuk kareler analizi:

Ölçümler arasındaki ilişkinin (llen düzeye ile gerçek düzeye arasındaki farkın) kareleri toplamının en kuuk değerde tutulması ile çizginin  $Y_i = a + bX_i$  denklemine uyması beklenir



# Son değerlendirme deneyleri 9

-Regresyon istatistik ölçütleri:

$Y_i = a + bX_i$  regresyon denklemi

$b \rightarrow$  eğim

$a \rightarrow$  y-ekseni kesişim noktası

$S_{y/x} \rightarrow$  regresyon standart hatası (ölçülen düzey ile regresyon denklemine göre olması gereken düzey arasındaki farkların standart sapması)

Bias: Regresyon denkleminde tıbben önemli karar düzeyindeki X değeri regresyon denkleminde yerine konarak Y değeri hesaplanır.  $\text{Bias} = Y - X$

# Son değerlendirme deneyleri 10

Hatalar ve etkiledikleri istatistiksel ölçütler:

Rastgele hata (RE):  $r$ ,  $S_d$ ,  $S_{y/x}$

Sabit hata (CE):  $a$ , bias

Oransal hata (PE):  $S_d$ ,  $b$ , bias

# Son değerlendirme deneyleri 11

Hata tiplerine göre karar kriterleri:

<u>Analitik hata tipi</u>	<u>Kriterler</u>
Rastgele hata (RE)	$4 \times s_d < E_A$
Sabit hata (CE)	$ \text{Bias}  < E_A$
Oransal hata (PE)	$\frac{ R - 100 }{100} \times Y_0 < E_A$
Sistemik hata (SE)	$ (a + bX_c) - X_d  < E_A$
Toplam hata (TE)	$4 \times s_d +  (a + bX_c) - X_d  < E_A$