



TÜRK KLİNİK BİYOKİMYA DERGİSİ

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Türk Klinik Biyokimya Dergisi

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Cilt 17, Sayı 2, 2019 / Volume 17, No. 2, 2019

Kurucu Founder

Oya Bayındır

Sahibi ve Sorumlu Yazı İşleri Müdürü

Türk Klinik Biyokimya Derneği adına

*Owner and Responsible Manager on Behalf of Turkish Society
of Clinical Biochemistry*

Özkan Alataş (Eskişehir Osmangazi Üniv., Tıp Fakültesi, Eskişehir, Türkiye)

Baş Editör Chief Editor

Dilek Özmen (İzmir, Türkiye)

Editörler Editors

Ceyda Kabaroğlu (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)

Ece Onur (Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye)

Sezer Uysal (Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)

Ayşenur Yeğin (Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Antalya, Türkiye)

Yayın Kurulu Editorial Board

- Pınar Akan
- Halide Akbaş
- Figen Narin
- İmge Ergüder

Türk Klinik Biyokimya Dergisi; Index Copernicus Master List, Chemical Abstracts, TÜBİTAK-ULAKBİM
"Türk Tıp Dizini", Türk Medline ve Türkiye Atıf Dizini
(Türkiye Citation Index) kapsamında
yer almaktadır.

Yönetim Yeri

Erzene Mah. 116/2 Sok. No: 10 Bornova/İzmir
Tel: +90 232 343 82 71 Faks: +90 232 339 21 34
E-posta: tkbd@tkbd.org
Web sitesi: www.tkbd.org.tr

Yayının Türü

Dergi, Türk Klinik Biyokimya Derneği yayın
organıdır. Akademik, hakemli dergidir.
Yılda üç kez (Nisan - Ağustos - Aralık)
yayınlanır.

Danışmanlar
Editorial Advisory Board

Abdullah Arpacı, Hatay
Ali Rıza Şişman, İzmir
Aslı Pınar, Ankara
Aslıhan Karul, Aydın,
Asuman Orçun, İstanbul
Ayfer Çolak, İzmir
Ayşe Binnur Erbağcı, Gaziantep
Bahattin Avcı, Samsun
Banu Başok, İzmir
Beyhan Ömer, İstanbul
Burak Çimen, Mersin
Burcu Barutçuoğlu, İzmir
Can Duman, İzmir
Canan Çoker, İzmir
Derya Aldemir, Ankara
Dilek Çımrın, İzmir
Dilek Ülker Çakır, Çanakkale
Duygu Kumbul Doğuç, Isparta
Emel Altekin, İzmir
Emre Sarandöl, Bursa
Evin Ademoğlu, İstanbul
Fatma Taneli, Manisa
Figen Narin, İzmir
Filiz Akbıyık, Ankara
Giray Bozkaya, İzmir
Gültekin Yücel, Antalya

Güneş Ak, İzmir
Halide Akbaş, Antalya
Hülya Aybek, Denizli
Işıl Mutaş, İzmir
Mehmet Köseoğlu, İzmir
Metin Kılınç, Kahramanmaraş
Murat Örmən, İzmir
Neslihan Bukan, Ankara
Osman Çağlayan, Kırıkkale
Özlem Gülbahar, Ankara
Özlem Görüroğlu Öztürk, Adana
Özlem Yavuz, Düzce
Pınar Akan, İzmir
Pınar Tuncel, İzmir
Sara Habif, İzmir
Sebahat Özdem, Antalya
Sembol Türkmen Yıldırım, Giresun
Sevgi Eskiocak, Edirne
Tamer İnal, Adana
Tevfik Noyan, Ordu
Tuncay Küme, İzmir
Tülay Köken, Afyon
Zehra Serdar, Bursa

Basım Yeri

META Basım Matbaacılık Hizmetleri
+ 90 232 343 64 54 Bornova - İzmir
Basım Tarihi: 30/09/2019

Türk Klinik Biyokimya Dergisi

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Cilt 17, Sayı 2, 2019 / Volume 17, No. 2, 2019

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

- ♦ **Use of Reference Change Value for Dyslipidemia Follow up**
Dislipidemi Takibinde Referans Değişim Değerinin Kullanımı
Okan Diker, Mustafa Şahin 63

- ♦ **İlk Trimester Tarama Testi Parametrelerinin Kayseri Bölgesi için Güncel Medyan Değerleri**
The Current Median Values of First Trimester Screening Test Parameters for Kayseri Region
Nahide Ekici Günay..... 70

- ♦ **Evaluation of Analytical Performance of Clinical Chemistry Assays Using Six Sigma**
Altı Sigma Kullanılarak Klinik Kimya Testlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi
Gökhan Çakırca, Tülin Yazıcı 79

- ♦ **Hızlı, Hassas ve Kolay HPLC-UV 25(OH)D Tayini ve İmmün Ölçüm Yöntemi ile Karşılaştırılması**
A Simple, Sensitive and Rapid HPLC-UV Method for the Determination of 25(OH)D and Comparison of the Immunoassay Method
Özgür Baykan..... 85

◆ **Tiroid Fonksiyon Testlerinde Sirkadiyen Ritim Analizi**

Circadian Rhythm Analysis in Thyroid Function Tests

Belkız Öngen İpek, Mustafa Erinç Sitar95

◆ **Bir Soğuk Aglütinin Olgusu (IgG Kappa ve IgM Lambda Biklonal Gammopati)**

A Case of Cold Agglutinin (IgG Kappa and IgM Lambda Biclinal Gammopathy)

Arzu Oran..... 103

Editöre Mektup

◆ **Hatalı Trigliserid Yüksekliğine Neden Olan Gliserol Kontaminasyonu**

Falsely Elevated Triglyceride Levels due to Glycerol Contamination

Şerif Ercan..... 108

Use of Reference Change Value for Dyslipidemia Follow up

Dislipidemi Takibinde Referans Değişim Değerinin Kullanımı

Okan Dikker*

Mustafa Şahin**

* Department of Medical Biochemistry, University of Health Sciences, Okmeydanı Education and Research Hospital, Istanbul, Turkey

** Department of Medical Biochemistry, Hitit University, Erol Olcok Education and Research Hospital, Corum, Turkey

Başvuru Tarihi: 19 Mart 2019

Kabul Tarihi: 17 Mayıs 2019

Short title: Dislipidemide Referans değişim değeri

Abbreviations: ANOVA: Analysis of variance, CV: Coefficient of variation, CVA: Analytic coefficient of variation, CVI: Intra-individual coefficient of variation, CVG: Inter-individual coefficient of variation, II: Index of individuality, HDL-cholesterol: High-density lipoprotein-cholesterol, CVD: Cardiovascular diseases, LDL-cholesterol: Low-density lipoprotein-cholesterol, RCV: Reference change value, SD: Standard deviation

ABSTRACT

Aim: Lipid profile is used to determine the risk of cardiovascular diseases (CVD) and to monitor treatment. Reference change value (RCV) represents the clinical significance of the variation between the results of two consecutive tests and laboratory test results exceeding this value are associated with the individual's disease status. In our study, we aimed to calculate the RCV for lipid profile tests such as total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol, additionally, to assess the clinical use of the RCV in order to determine to the risk of CVD and monitoring their treatment.

Materials and Methods: The analytic coefficient of variation (CVA) was calculated from internal quality control results. The intra-individual coefficient of variation (CVI) and inter-individual coefficient of variation (CVG) were obtained from Westgard's website. For each test, the index of individuality (II) was calculated with the CVI/CVG ratio. To assess tests with index of individuality below 1, percentage of the RCV (RCV%) was used. The RCV% is calculated with the formula $z.21/2.[CVA^2+CVI^2]^{1/2}$.

Results: The RCV% results were calculated as 15% for total cholesterol, 47% for triglyceride, and 19% for HDL-cholesterol and LDL-cholesterol. The II was calculated as 0.388 for total cholesterol, 0.608 for triglyceride, 0.344 for HDL-cholesterol and 0.382 for LDL-cholesterol.

Conclusion: The results for RCV% values identified for lipid profile in the literature are similar to the results obtained in our study. In clinical practice, when the difference between two consecutive lipid profile tests exceed the RCV%, it should be interpreted as a significant change. The RCV% may be used to assess the CVD risk and the efficacy of dyslipidemia treatment.

Key words: Reference change value; lipid profile; dyslipidemia

Okan Diker :<https://orcid.org/0000-0002-9153-6139>
Mustafa Şahin :<https://orcid.org/0000-0001-6073-563X>

Yazışma adresi: Orhan Dikker
Department of Medical Biochemistry,
University of Health Sciences,
Okmeydanı Education and Research
Hospital, Istanbul, Turkey
e-mail: okandikker@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) için risk belirlemede ve tedavi takibinde lipit profilinden yararlanılır. Referans değişim değeri (RCV), ardışık iki test sonucu arasındaki değişikliğin klinik önemini ifade eder ve bu değeri aşan laboratuvar test sonuçları bireyin hastalık durumu ile ilişkilidir. Çalışmamızda total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol gibi lipit profili testlerine ait referans değişim değerini (RCV) hesaplamayı ve kardiyovasküler hastalıklar için risk belirleme ve tedavi takibinde RCV'nin klinik kullanımını değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: İç kalite kontrol sonuçlarından analitik varyasyon katsayısı (CVA) hesaplandı. Birey içi varyasyon katsayısı (CVI) ve bireyler arası varyasyon katsayısı (CVG) değerleri Westgard'ın web sitesinden elde edildi. Herbir test için bireysellik indeksi (BI), CVI/CVG oranı ile hesaplandı. BI değeri 1'in altında olan testlerin değerlendirilmesinde %RCV esas alındı. Elde edilen verilerle $\%RCV = (z \cdot 2.1 / 2 \cdot [CVA^2 + CVI^2]^{1/2})$ formülü ile hesaplandı.

Bulgular: %RCV sonuçları; total kolesterol için %15, trigliserit için %47, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol için %19 olarak hesaplandı. BI; kolesterol için 0,388, trigliserit için 0,608, HDL-kolesterol için 0,344 ve LDL-kolesterol için 0,382 olarak hesaplandı.

Sonuç: Literatürde lipit profili için belirtilen % RCV değerleri, çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzerdir. Klinik pratikte, iki lipit profili test sonucu arasındaki fark %RCV'yi aştığı zaman anlamlı bir değişiklik olarak yorumlanmalıdır. KVH riski ve dislipidemi tedavisi etkinliğini değerlendirmede %RCV kullanışlı olabilir.

Anahtar kelimeler: Referans değişim değeri; lipit profili; dislipidemi

ABSTRACT

Purpose: A parameter associated with the result of a measurement that characterises the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand is defined as measurement uncertainty (U). Measurement uncertainty is very important for the clinician to provide medical judgement, diagnosis and treatment. The aim of this study was to determine the measurement uncertainty of fT4, fT3 and TSH parameters in our laboratory.

Material and Methods: In this study, measurement uncertainty calculation was done using Nordtest guide model. Standard, combined and expanded uncertainty values were calculated with this model.

Results: Expanded uncertainty was calculated 17.93% for TSH. We found measurement uncertainty of fT4 and fT3 were % 8.83 and %9.13, respectively. Expanded uncertainty of fT4 was found to be higher when compared to %TEa values of Westgard.

Conclusion: All changes may affect the uncertainty in the laboratory. Therefore, it must be constantly monitored and uncertainty estimates should be improved by adding more data.

Key Words: Thyroid stimulating hormone, free thyroxine, free triiodothyronine, uncertainty.

INTRODUCTION

The variation in laboratory test results may be due to many things such as hormonal changes, sunlight (e.g. vitamin D), circadian rhythm, sleep, posture, physical activity, nutrition, stress, etc. (1). The laboratory tests for every individual can be seen to fluctuate randomly around a certain value. This situation is called the intra-individual variation. Random fluctuations between individuals are called the inter-individual variation. Mathematically these fluctuations are represented by the "coefficient of variation (CV)" and the intra-individual and inter-individual variations are shown by CV_i

and CV_G , respectively (2). Additionally, changes during analysis of the test in laboratories are called analytic variation (CV_A) and may affect the laboratory test results. In short, just as differences in serial measurements of a test for individuals may be due to progression of disease, amelioration of disease or treatment efficacy, they may also be due to biological and analytic variations.

The numerical value representing the clinical significance of the variation between the results of two consecutive tests is the reference change value (RCV) (3). This value is beneficial to identify clinically significant

differences between serial measurements when given along with patient results (4). Laboratory test results exceeding the RCV are associated with the individual's disease status.

Cardiovascular diseases (CVD) are the most important cause of mortality in developed countries. In America nearly 34% of all deaths under the age of 75 years are linked to CVD (5). Total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-cholesterol) and low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-cholesterol) levels are used routinely for risk determination in CVD. Total cholesterol and LDL-cholesterol levels, especially, are primarily recommended for assessment of CVD risk and treatment response. Additionally, it has been shown in many studies that reducing total cholesterol and LDL-cholesterol reduces mortality (6).

In our study, we aimed to calculate the RCV for lipid profile tests such as total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol, additionally, to assess the clinical use of the RCV in order to determine to the risk of CVD and monitoring their treatment.

MATERIALS AND METHODS

In our study, the internal quality control results for total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol tests studied in 2018 using a Beckman Coulter

AU5800 model autoanalyzer in the biochemistry laboratory of İstanbul Okmeydanı Training and Research Hospital were obtained from the laboratory information system. For each test, two-level internal quality control studies were performed with Beckman Coulter (Ireland, INV) brand control material and the acceptance or rejection criteria for internal quality control results used the Westgard rules (7). Standard deviation and means was calculated for the two-level controls. Later using the formula (Standard Deviation (SD)/Mean*100) formula, the CV values for the two-level control of each test was calculated. The mean CV for both levels of each test were used to calculate the CV_A value.

Tests related to the CV_I and CV_G values were obtained from the current database on the Westgard website (8). For each test the index of individuality (II) was calculated using the CV_I/CV_G formula (9). The RCV was taken as the basis for assessment of lipid profile tests with II value below 1.

The percentage of the RCV (RCV%) values was calculated using the formula $z \cdot 2^{1/2} \cdot [CV_A^2 + CV_I^2]^{1/2}$. The z constant in this formula was determined as 1.65 for the 95% confidence interval ($p < 0.05$) (10).

Lipid profile was studied with colorimetric methods using a Beckman Coulter brand AU5800 model autoanalyzer.

RESULTS

Table 1. Biological variation coefficients and individuality index values for tests
Tablo 1. Testler için biyolojik varyasyon katsayıları ve bireysellik indeksi değerleri

Lipid profile	Biological variation		II
	CV_I	CV_G	
Total cholesterol	5.95	15.3	0.388
Triglyceride	19.9	32.7	0.608
HDL-cholesterol	7.3	21.2	0.344
LDL-cholesterol	7.8	20.4	0.382

CV_I = Intra-individual coefficient of variation

CV_G = Inter-individual coefficient of variation

II = Index of individuality

Table 1 shows the CV_I and CV_G values obtained from the Westgard website (8) and the calculated II value for each analyte.

Table 2. Number, mean, SD, CV and CV_A of internal quality control data for the tests
Tablo 2. Testler için iç kalite kontrol verilerinin sayısı, ortalamaları, SD, CV ve CV_A değerleri

Internal Quality Controls	Control number (n)	Mean	SD	CV	Mean CV _A
Total cholesterol Control-1	423	150	4.67	3.11	3.10
Total cholesterol Control-2	465	284	8.79	3.09	
Triglyceride Control-1	408	147	6.98	4.74	4.94
Triglyceride Control-2	449	305	15.71	5.15	
HDL-cholesterol Control-1	522	36	1.45	4.02	4.14
HDL-cholesterol Control-2	521	68	2.91	4.27	
LDL-cholesterol Control-1	460	84	3.03	3.60	3.45
LDL-cholesterol Control-2	461	171	5.66	3.30	

Table 2 shows the control number, mean, SD, CV and mean CV_A value created from internal quality control data for each analyte.

Table 3. Calculated RCV% for lipid profile tests
Tablo 3. Lipid profile testleri için hesaplanan % RCV değerleri

	RCV%
Total cholesterol	15%
Triglyceride	47%
HDL-cholesterol	19%
LDL-cholesterol	19%

The RCV% value was calculated by inserting data from tables 1 and 2 into the $z.2^{1/2} \cdot [CV_A^2 + CV_I^2]^{1/2}$ formula.

Table 4. Assessment of virtual patient receiving dyslipidemia treatment with RCV% of consecutive test results
Tablo 4. Dislipidemi tedavisi alan hastanın ardışık test sonuçlarının % RCV'si ile değerlendirilmesi

Values of the virtual patient	Total cholesterol	LDL-cholesterol	HDL-cholesterol	Triglyceride
First visit-basal values (mg/dl)	280	205	48	120
Values after 2 months treatment (mg/dl)	180	130	55	100
Difference (mg/dl)	100	75	7	20
% change in test results	35%	36%	14%	16%
RCV%	15%	19%	19%	47%
Interpretation	Significant	Significant	Insignificant	Insignificant
RCV% exceeded	Present (35>15)	Present (36>19)	Absent (14<19)	Absent (16<47)

*RCV% data are specific to our laboratory and are not appropriate for use to assess results from other laboratories

Table 4 shows the consecutive test results for a virtual patient receiving dyslipidemia treatment and assessment according to the calculated RCV%. In the table, when the % change exceeded the RCV% value, the test results for the patient were assessed as changing significantly. In opposite situations, the variation in both test results was insignificant; in other words, due to variation.

DISCUSSION

Factors such as dyslipidemia (high total cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride levels and low HDL-cholesterol levels), smoking, sedentary lifestyle, obesity, family history, high blood pressure and glucose levels lead to increases in the risk of CVD (11). According to World Health Organization data, in European countries high lipid levels are the main factors in 8.7% of heart and vascular diseases (12). High blood pressure and high cholesterol levels are correctable risk factors and are observed in 80% of CVD (13). Additionally, the treatment that those with CVD should start is linked to many factors. These include factors like the patient's present lipid levels, medication use linked to comorbid diseases and side effects of medications (14).

Decision limits and population-based reference intervals are used to interpret lipid profile tests in CVD, as for other tests. However, using the RCV% to interpret the results of two consecutive tests can identify significant differences. As a result, in our study we calculated the RCV% for lipid profile tests. The RCV% we obtained indicates that differences larger than 15% for total cholesterol, 47% for triglyceride, and 19% for HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in serial measurements from our laboratory may show a significant change for these tests.

When the literature is investigated, some studies calculated the RCV% values for tests belonging to the lipid profile. A study researching the effects of intake of 300 ml water 1 hour before the phlebotomy

procedure calculated RCV% as 17.2% for total cholesterol, 56% for triglyceride, 22.1% for LDL-cholesterol and 21.7% for HDL-cholesterol (15). A study investigating the effects of long-term fasting and mild physical activity on laboratory tests identified 44.6% as RCV% for triglyceride (16). A study calculating RCV% for biochemical tests of subjects with regular aerobic training in the 19-22 year age group found it was 27% for total cholesterol and 66.4% for triglyceride (17). The results for RCV% values identified for lipid profile in the literature are similar to the results obtained in our study. The RCV% for the triglyceride test in our study was identified to have high values, similar to the literature. The high RCV% values for triglyceride may be due to larger effect of daily diet compared to other lipid tests and showing exogenous lipid intake due to high biological variability.

In our study we used the biological variation values calculated by Westgard. For calculation of intra-individual and inter-individual biological variation, a certain number of biological samples could also be taken from a certain number of people (18). In some studies, researchers have used their own serial measurements in biological variation calculations. A study measuring prostate specific antigen levels took four samples from each individual at fourteen-day intervals from 26 healthy males and found the reference change value was 49.4%. Additionally, when assessing the increase in patient's test results, they stated it was necessary to examine whether the RCV% value was exceeded or not and interpretations should be made accordingly (19). Garner et al. in blood samples taken periodically from 22 healthy women monitored for breast cancer found the RCVs% were 32% and 72% for carcinoembryonic antigen and tissue polypeptide antigen tests, respectively (20).

In our study the II for the lipid profile tests were <1. For individuals with II index below 1, two consecutive results may exceed the RCV% but be within the population-based

reference interval. However, analytes with II value above 1 should be compared with the population-based reference interval (18). II is showed to be low in most routine biochemical tests. As a result, differences in repeated measurements of people may remain within the population reference interval and thus rather than comparing the analyte results with the reference interval it appears more appropriate to assess the difference in consecutive measurements; in other words, to use the RCV% value (21). Low II value for lipid profile tests shows that RCV% use may be beneficial for CVD risk and dyslipidemia treatment monitoring.

Comparison of an individual's test results with previous values may provide more valuable information than comparison with a classic population-based reference interval. As a results, reporting of the RCV% along with the population-based reference interval will contribute to interpretation of patient test results. Additionally, the RCV% for each test should be calculated and reported in laboratories. Knowing and reporting the

RCV% will reduce patient's concerns related to increasing or reducing test results.

CONCLUSIONS

In conclusion, when the difference in the results of two consecutive lipid profile tests exceeds RCV%, it should be interpreted as a significant change. The RCV% may be used for assessment of CVD risk and efficacy of dyslipidemia treatment. Prospective advanced studies about calculation of biological variations in a certain CVD patient population and related to the use of RCV% after specific treatments should be performed.

Ethics Committee Permission: The study received permission from Health Sciences University Okmeydanı Education and Research Hospital Ethics committee dated 18.12.2018 numbered 1068.

Conflict of Interest: The authors report no conflict of interest.

Financial Support: The authors report they received no financial support.

REFERENCES

1. Ricós C, Arbós MA. Quality goals for hormone testing. *Ann Clin Biochem.* 1990; 27:353-8.
2. Fraser FG. The nature of BV. In: Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington: AACC Press Washington, 2001:1-28.
3. Fraser CG. Changes in serial results. In: Biological variation: from principles to practice. Washington: AACC Press, 2001:67-90.
4. Ozturk OG, Paydas S, Balal M, Sahin G, Karacor ED, Ariyurek SY et al. Biological variations of some analytes in renal posttransplant patients: A different way to assess routine parameters. *J Clin Lab Anal* 2013; 27: 438-43.
5. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2013;127: e6-e245.
6. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, Dislipidemi Tanı ve Tedavi kılavuzu 2018-http://www.temd.org.tr/admin/uploads/tbl_gruplar/20180525144116-2018-05-25tbl_gruplar144111.pdf
7. Westgard JO, Groth T. Design and evaluation of statistical control procedures: Applications of a computer "quality control simulator" program. *Clin Chem* 1981; 27: 1536-45.
8. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (erişim tarihi: 31.10.2018)
9. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 758-64.
10. Biosca C, Ricós C, Lauzurica R, Galimany R, Hyltoft Petersen P. Reference change value concept combining two delta values to predict crises in renal post-transplantation. *Clin Chem.* 2001; 47:2146-8.
11. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Available from URL: [http:// www.who.int/mediacentre/ factsheets/fs317/en/inex.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/inex.html)
12. Murray CJL, Lopez AD Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study *Lancet* 1997; 349: 1498-1504.
13. Emberson JR, Whincup PH, Morris RW Walker M. Re-assessing the contribution of serum total cholesterol, blood pressure and cigarette smoking to the aetiology of coronary heart disease: impact of regression dilution bias. *European Heart Journal* 2003; 24: 1719-26.

14. Van Ganse E, Laforest L, Alemao E, Davies G, Gutkin S, Yin D. Lipid-modifying therapy and attainment of cholesterol goals in Europe: the Return on Expenditure Achieved for Lipid Therapy (REALITY) study. *Curr Med Res Opin.* 2005; 21: 1389-99.
15. S.F. Benozzi, G. Unger, A. Campion, G.L. Pennacchiotti, Fasting conditions: influence of water intake on clinical chemistry analytes, *Biochem Med (Zagreb)* 28 (2018) 1–8.
16. Šupak-Smolčić V, Antoncic D, Ozanić D, Vladilo I, Bilic-Zulle L. Influence of a prolonged fasting and mild activity on routine laboratory tests. *Clin Biochem.* 2015;48:85–8.
17. Nunes LA, Brenzikofer R, de Macedo DV. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110:191-198.
18. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1989; 27:409-37.
19. Training AN. Biological Variation and Reference Change Value (Rcv) of Prostate Specific Antigen (Psa) Levels in the Serum of. 2009;152–6.
20. Garner AE, Lewington AJ, Barth JH. Detection of patients with acute kidney injury by the clinical laboratory using rises in serum creatinine: Comparison of proposed definitions and a laboratory delta check. *Ann Clin Biochem* 2012; 49: 59-62.
21. Iglesias N, Petersen PH, Ricós C. Power function of the reference change value in relation to cut-off points, reference intervals and index of individuality. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:441–8.

İlk Trimester Tarama Testi Parametrelerinin Kayseri Bölgesi İçin Güncel Medyan Değerleri

The Current Median Values of First Trimester Screening Test Parameters for Kayseri Region

Nahide Ekici Günay

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Kliniği, Kayseri, Türkiye

Başvuru Tarihi: 24 Mart 2019

Kabul Tarihi: 29 Ağustos 2019

ÖZET

Amaç: Kayseri bölgesi için, ilk trimester tarama testinde kullanılan hormon parametrelerinin güncel medyan değerlerini hesaplamak, bu medyanları tarama testi raporlarında kullanılan yazılım programında kullanılan medyanlar ve benzer çalışmalarla bulunan diğer bölgelerin medyanları ile karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2018 yılında başvuran 1108 gebenin prenatal ikili tarama testi ölçümleri kullanıldı. Gebelerin demografik verileri ile birlikte sβ-hCG (serbest beta-human koryonik gonadotropin) ve PAPP-A (gebelikle ilişkili plazma protein A) düzeyleri kaydedildi. Rapor vermede kullanılan programa girilmiş olan haftalık medyan değerlerine göre hesaplanan medyanların katları (MoM) ile yeni hesaplanan medyanlara göre bulunan MoM değerleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Tarama testlerinde kullanılan free β-HCG'nin 12. gebelik haftası ile PAPP-A'nın 11 ve 12.hafta medyan değerleri, güncel medyanlardan anlamlı olarak farklı ve düşük olarak bulundu (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.001$). Güncel medyanlara göre hesaplanan MoM değerleri ise her iki parametre ve tüm haftalar için anlamlı olarak farklı ve yüksekti ($p<0.001$). Daha önce riskli olarak raporlanan toplam gebe sayısı 5 iken, yeni free βHCG medyan değerlerine göre daha önce risksiz olarak tesbit edilen 11.hafta gebelerinden 2, 12. hafta gebelerinden 5 ve 13. hafta gebelerinden 1 tanesi (toplam 8) gebe daha Down Sendromu için artan riskli gebelik olarak değerlendirildi. Programa göre PAPP-A değeri <0.5 MoM olarak raporlanan 159 gebe sayısı ise güncel medyanlardan sonra 128 olarak bulundu.

Elazığ bölgesi, parametrelerin medyanları bakımından tüm haftalarda Kayseri ile farksız iken en yüksek % biaslar PAPP-A bakımından Mersin, freeβ-hCG bakımından ise sırasıyla Van, Eskişehir, Mersin ve İstanbul bölgeleriyle farklı ve düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Sonuç: Bölgelere ait güncel medyan değerlerinin kullanılması prenatal tarama testlerinin performansını artıracaktır.

Anahtar sözcükler: ikili tarama testi; bölgesel medyan; prenatal tanı; serbest b-hCG; PAPP-A.

Yazışma adresi: Nahide Ekici Günay

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Çağış Kampüsü/Balıkesir
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Kliniği, Kayseri, Türkiye
e-mail: edihan30@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0002-3041-7427

ABSTRACT

Aim: To determine the current median values for hormone parameters used in first trimester screening test for Kayseri province and to compare the median values with those in the software used for reporting of screening test and those detected for other regions found with similar studies.

Material and Methods: The data from first trimester screening tests of 1108 pregnant women admitted in 2018 were used in the study. Free β -hCG (free, beta human chorionic gonadotropin) and PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein A) levels were recorded together with demographic characteristics for pregnant women. We compared MoM values calculated based on weekly median values in the software and newly calculated MoM values.

Results: Median values for β -hCG on week 12 and for PAPP-A on week 11 or 12 in the screening tests were significantly lower than current median values ($p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). MoM values calculated according current median values were significantly higher in both parameters at all time points ($p<0.001$). The number of pregnant women reported to be at risk was 5 previously while of the pregnant women who were reported to have no risk, additional 8 pregnant women were considered as at risk for Down syndrome according to new median values for free β -hCG including 2 pregnant women from week 11, 5 pregnant from week 12 and 1 pregnant women from week 13. The number of pregnant women reported to have PAPP-A value <0.5 MoM was 159 according to median values used in the software but it was decreased to 128 according to current median values. Elazığ province did not differ from Kayseri province regarding median values at all values while highest percent bias were found in Mersin regarding PAPP-A. For free β -hCG, median values for Kayseri were found to be significantly lower from Van, Eskişehir, Mersin and İstanbul provinces at all weeks ($p<0.001$).

Conclusion: The use of current median values will improve performance of prenatal screening tests.

Key Words: first trimester screening test; regional median; prenatal diagnosis; free β -hCG; PAPP-A.

GİRİŞ

İlk trimester tarama testi olarak da bilinen ikili test, Down sendromu ve Trizomi 18 adı verilen kalıtsal hastalıklara sahip fetüsleri saptamak amacıyla gebeliğin 11-13. haftasında yapılan bir tarama testidir.

En yaygın kromozom bozukluğu olan Down sendromunun prevalansı populasyonlara göre değişiklik göstermektedir. Bu oran her 10.000 doğum için Amerika'da 14.47, İrlanda'da 13.1, Hollanda'da 7.7, İngilterede 6.1 ve Türkiye'de ise 9.07 olarak bildirilmiştir (1-3).

İkili test, trofoblastlarca sentezlenen PAPP-A ve sinsityotrofoblastlar tarafından sentezlenen free β -hCG düzeyleri, anne yaşı ve fetal NT'nın bir prenatal risk hesaplama sistemi aracılığı ile kombine edilerek o gebeliğe özgü risk oranının verilmesi prensibine dayanır. Testte yüksek riskli sonuçların çıkması fetal anomalinin kanıtı değildir. Riskin düşük çıkması da fetal anomali olmadığını garanti etmez. Tanı koydurucu olmayan bu test, yüksek fiziksel veya zeka engelli bebek doğurma riskini belirleyerek

kesin tanıya götüren ileri invaziv tanısal testlere yönlendirmeyi sağlar (4).

Amniosentez, koryon villus biyopsisi ve kordosentez yüzde yüz doğrulukta fetal kromozomal anöplodiyi belirler. Ancak, amniyosenteze bağlı gebelik kayıplarının 1/100 ile 1/500 arasında olduğu bildirilmiştir. Amniyosentez ve koryon villus biopsisi ilişkili komplikasyonlar arasında amniyotik sıvı sızıntısı, anneden bebeğe enfeksiyon geçişi, Rh sensitizasyonu, düşük ayak, kalça çıkığı ve akciğer problemleri rapor edilmiştir (5).

İlk trimester biyokimyasal belirteçlerinin kromozomal anomali taramasına ek olarak gebelik komplikasyonlarını da öngörebileceği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (6, 7). Düşük PAPP-A düzeylerinin erken doğum ve preeklamsi gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (8, 9).

Merkezler arasında maternal serum test parametrelerinin ölçüm değerlerinde görülen farklılıklar nedeniyle sonuçlar medyanların katları (multiples of median, MoM) şeklinde raporlandırılır. Free β -hCG ve PAPP-A ölçüm değerleri, ölçüm metodları, toplumsal gene-

tik farklılıklar ve gestasyonel yaş ile birlikte değişebilir (10). Medyan değerlerinin farklı bölge popülasyonlarında birbirinden farklı olabilmektedir. Aynı zamanda hesaplanan bölge medyanlarının firma tarafından önceden belirlenen medyan değerlerinden farklı olabildiğinin gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır (11).

Doğum öncesi tarama laboratuvarının temel görevlerinden biri, başka bir kaynaktan elde edilen medyan değerlerin toplum medyanları ile uyumlu olduğunu ortaya koymaktır. Hatalı medyan değerleri laboratuvar performansını etkiler. Raporlamada kullanılan yazılım programında laboratuvarın hizmet verdiği bölgeye spesifik ve güncel medyan değerlerin kullanılması gerekmektedir.

Tarama yöntemlerinde kullanılan topluma spesifik medyanlarının güncel ve güvenilir olması, gebelik komplikasyonlarına erken yaklaşım ve girişimsel değerlendirmelerle ilişkili normal fetüs kaybının azalması bakımından da önemlidir.

Bu çalışmada amacımız, gebelikte ilk trimester tarama parametrelerinin bölgemiz popülasyonu için medyan değerlerini belirleyerek, bulunan medyanların Prisca medyanları ile uyumlu olup olmadığına karar vermektir. Ayrıca Prisca medyanlarına göre riskli gebelikleri yeni bölgesel medyan değerleri yoluyla yeniden değerlendirerek karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu retrospektif çalışmada 2018 yılı boyunca Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doğumevi Kliniğine başvuran 11 -13 gebelik haftalarındaki (11 hafta+ 0 gün ve 13 hafta+6 gün) gebelerin prenatal ikili serum tarama testi ölçümleri kaydedildi. Ultrasonografik fetal Crown Rump Length (CRL) ölçümleri gebelik haftalarının belirlenme kriteri olarak belirlendi. Priska programında artan riskli olarak raporlanmış gebeler ile hormon düzeyleri açısından riskli çıkan gebeler (β -hCG düzeyi 2.5 MoM ve üzeri PAPP-A, uE3 ve AFP 0.5 MoM ve altı) çalışmadan dışlandı. İkiz gebeler, gestasyonel diabetes tesbit edilmiş ve daha önceden

diabetes tanısı almış olan gebeler, in vitro fertilizasyon yöntemi kullanılan gebeler ve sigara içen gebeler de çalışmadan dışlandı. İkili tarama testinde artan riski olan vakaların değerlendirilmesi Down Sendromu için 1/250 olarak belirlendi.

Immulite 2000 XPi Immunoassay System (Siemens, Los Angeles, ABD) kullanılarak solid faz, kemiluminesans immunometrik sandviç yöntemi ile serum free β -hCG ve PAPP-A ölçümleri gerçekleştirildi.

Gebelerin yaşı, kilosu, gebelik haftası, diyabet, sigara içme durumu, fetal ense saydamlığı (NT), CRL değerleri, ikili tarama serum parametreleri olan free β -hCG ve PAPP-A ölçüm değerleri ile birlikte PRISCA 5.0 (Prenatal Risk Hesaplama, TYPOLOG Software/ GmBH, Hamburg, Almanya) paket programda değerlendirildi. Gebelerin free β -hCG ve PAPP-A düzeyleri ile aynı gebelik haftası için Priska programı tarafından Türkiye'deki beş ayrı merkezin verilerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuş normal popülasyon medyan havuzu değerleri kullanılarak verilen MoM değerleri kaydedildi. Daha sonra gebelerin medyan değerleri bulunarak yeni MoM değerleri hesaplandı. Priska programında verilen medyan ve hastalara ait MoM değerleri, bulunan güncel medyan ve MoM değerleri ile karşılaştırılarak yüzde biaslar hesaplandı. Yeni hesaplanan bölgesel medyan değerleri ve Immulite 2000 analizörü ile parametreleri çalışılan ve aynı programı kullanan Eskişehir, Mersin, Elazığ, Van, Bursa ve İstanbul bölgelerinin medyan değerlerinin araştırıldığı çalışmaların medyanları karşılaştırıldı.

Değişkenlerin normallik varsayımları Kolmogorov-Smirnov testi ve Q-Q Plot grafikleri ile test edildi. Verilere ait mean, medyan, minimum-maksimum ve çeyrek açıklığı (IQR) değerleri tanımlayıcı istatistikler kullanılarak hesaplandı. Her bir gebelik haftası için hesaplanan medyan değerleri ile bilgisayar programından elde edilen medyan değerleri arasındaki fark One-Sample Wilcoxon Signed Rank test ile değerlendirildi. Elde edilen güncel medyanlar ve Priska programında verilen medyanlar arasındaki yüzde bias, Microsoft Office 2010, Microsoft, Redmond,

WA, USA kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

medyanlar arası % bias=((Priska medyan-Güncel medyan)*100)/(Priska medyan)

Güncel medyanlar ile diğer bölgelerin benzer çalışmaları arasındaki medyanların bias yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı:

bölgeler arası % bias=((Kayseri medyan-diğer bölge medyan)*100)/(Kayseri medyan)

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma, medyan, minimum-maksimum olarak ifade edildi. İstatistiksel analizlerde SPSS 21 (SPSS Inc Chicago, IL) paket programı kullanıldı. Bölgeler arası medyanların karşılaştırılmasında, Analyse-it Version 2.20 paket programı ile non-parametrik Sign test kullanılarak veriler arasındaki fark değerlendirildi. $p < 0,05$ anlamlı fark olarak kabul edildi.

Çalışmadan önce, gebelerin klinik kayıtlarını gözden geçirmek için Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Etik Komitesi'nin onayı alındı.

BULGULAR

Birinci trimester tarama testi sonuçları artan risk olarak raporlanmamış olan toplam 1108 gebe çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların gebelik haftalarına göre demografik verileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Haftalara göre free β HCG için hesaplanan bölge medyan değerleri Priska programı tarafından sağlanan medyan değerleri ile karşılaştırıldığında 11 ve 13. Hafta için anlamlı fark yoktu. 12. hafta için ise free β HCG medyan değerleri anlamlı olarak farklı ($p < 0,001$) ve Priska programı medyan değerinin güncel medyan değerine göre yüksek (free β HCG için % bias= 20,1) bulundu. PAPP-A bakımından haftalara göre Priska programında kullanılan medyan, yeni hesaplanan bölge medyanları karşılaştırıldığında ise 11 ve 12. haftalar için anlamlı olarak farklı ve yüksek idi (11. Hafta PAPP-A için % bias=19,2 ve 12.hafta için % bias= 16) (Tablo 2).

Hesaplanan yeni medyanlar kullanılarak haftalara göre yeni MoM değerleri karşılaştırılması Tablo 3'te gösterilmiştir. Buna göre free β HCG ve PAPP-A için gebelerin Priska programında verilen haftalık MoM ortalamaları, güncel MoM ortalamalarına göre tüm haftalar için anlamlı farklı ve düşük olarak bulundu ($p < 0,001$). MoM'lar bakımından yüksek yüzde bias farkı free β HCG için 12. Hafta gebelerinde gözlenirken, bu fark PAPP-A için en yüksek olarak 13 gebelik haftasında bulundu.

Yeni free β HCG MoM değerlerine göre gebe verileri Priska programına girerek incelendiğinde daha önce risksiz olarak tesbit edilen 11. hafta gebelerinden 2, 12. Hafta gebelerinden 5 ve 13. hafta gebelerinden 1 tanesi olacak şekilde toplam 8 gebe Down Sendromu için artan riskli gebelik olarak değerlendirildi.

Kayseri bölgesine ait medyan değerleri Eskişehir, Mersin, Elazığ, Van, Bursa ve İstanbul merkezli yapılan benzer çalışmalarda bulunan medyan değerleri ile karşılaştırıldığında, tüm haftalar için PAPP-A medyan değerleri Eskişehir ve Elazığ medyan değerlerinden farksız iken, Mersin ve Bursa bölgeleri ile tüm haftalarda farklı olarak bulunmuştur. İstanbul bölgesindeki PAPP-A için anlamlı farklılık 11. gebelik haftasında iken, Van bölgesinde 12. ve 13. haftalarda gözlenmiştir (Tablo 4).

Free β -hCG için 11,12 ve 13. haftalardaki medyan değerleri Elazığ ve Bursa bölgelerinden farksız iken, Eskişehir, Van ve İstanbul bölgelerinde 12. hafta medyan değerleri anlamlı olarak farklı idi (Tablo 5).

İncelenen benzer çalışmalar içerisinde Elazığ bölgesi, hem PAPP-A hem de free β -hCG medyanları bakımından tüm haftalarda Kayseri ile farksız olan tek bölge olarak tespit edildi. Kayseri bölgesi medyan değerleri bakımından en yüksek % biaslar PAPP-a bakımından Mersin, free β -hCG bakımından ise sırasıyla Van, Eskişehir, Mersin ve İstanbul bölgeleri medyanları ve düşük olarak bulunmuştur ($p < 0,001$) (12-17).

Tablo 1. İkili tarama testi için çalışmaya dahil edilen gebelerin demografik verileri
Table 1. Demographic data of pregnant included in the study for the double screening test

		Median $\pm$ SE	IQR	Minimum-Maksimum
11. hafta (n=245)	Yaş (yıl)	26,10 $\pm$ 0,51	9,8	16,4-42,7
	Ağırlık (kg)	64,00 $\pm$ 1,28	20	43-111
	NT (MoM)	0,88 $\pm$ 0,08	0,24	0,41-2,86
	CRL (mm)	51,29 $\pm$ 0,04	6,8	40,5-55,1
	PAPP-A (ng/mL)	1,60 $\pm$ 0,21	1,08	0,327-8,470
	PAPP-A (MoM)	1,03 $\pm$ 0,07	0,59	0,22-4,35
	Free β-hCG (ng/mL)	39,7 $\pm$ 0,3	34,4	9,79-177
12. hafta (n=546)	Free β-hCG (MoM)	1,16 $\pm$ 0,68	0,73	0,21-4,39
	Yaş (yıl)	27,32 $\pm$ 0,6	9,4	15,9-45
	Ağırlık (kg)	64,00 $\pm$ 1,28	9,2	45-120
	NT (MoM)	0,83 $\pm$ 0,18	0,24	0,40-1,72
	CRL (mm)	62,21 $\pm$ 0,03	5,3	55,2-69,7
	PAPP-A (ng/mL)	2,52 $\pm$ 0,28	1,86	0,523-9,340
	PAPP-A (MoM)	0,96 $\pm$ 0,04	0,7	0,24-3,63
13. hafta (n=317)	Free β-hCG (ng/mL)	30,3 $\pm$ 0,2	27,3	2,10-163
	Free β-hCG (MoM)	1,24 $\pm$ 0,03	0,69	0,21-4,19
	Yaş (yıl)	26,1 $\pm$ 0,5	6,7	16-42
	Ağırlık (kg)	67,9 $\pm$ 0,2	18,1	41-108
	NT (MoM)	0,77 $\pm$ 0,19	0,31	0,46-1,34
	CRL (mm)	74,68 $\pm$ 0,04	4,9	68,8-82
	PAPP-A (ng/mL)	3,81 $\pm$ 0,31	3,74	0,451-15,800
	PAPP-A (MoM)	1,00 $\pm$ 0,02	0,64	0,150-3,190
	Free β-hCG (ng/mL)	28,3 $\pm$ 0,28	23,6	7,40-157
	Free β-hCG (MoM)	1,26 $\pm$ 0,08	0,68	0,15-5,98

SE: Standart hata, **IQR:** Interquartile range, **Free β -hCG:** Serbest Human Koryonik Gonadotropin, **PAPP-A:** Pregnancy Associated Plasma Protein-A, **CRL:** Crown rump length, **NT:** Ense kalınlığı **MoM:** Multiples of medians

Tablo 2. İkili test hormonlarının yeni hesaplanan ve Prisca programında verilen medyanlarının karşılaştırılması
Table 2. Comparison of the median of the double test hormones given in the newly calculated and Prisca program

Free β-hCG (ng/mL)					
Gebelik haftası	n	Güncel median	Priska median	p	% bias
11	245	39,7	43,3	0,317	8,3
12	546	30,3	37,9	<0,001	20,1
13	317	28,3	32	0,191	11,6
PAPP-A (ng/mL)					
Gebelik haftası	n	Güncel median	Priska median	p	% bias
11	245	1,60	1,98	<0,001	19,2
12	546	2,52	3	<0,001	16,0
13	317	3,81	4,23	0,75	9,9

Free β -hCG; Serbest Human Koryonik Gonadotropin **PAPP-A;** Pregnancy Associated Plasma Protein-A

Tablo 3. İkili test hormonlarının yeni hesaplanan ve Prisca programından verilen MoM değerlerinin karşılaştırılması
Table 3. Comparison of MoM values obtained from Prisca program and newly calculated from double test hormones

Free β-hCG (ng/mL)					
Gebelik haftası	n	Güncel MoM (mean)	Priska MoM (mean)	p	% bias
11	245	1,16	0,98	<0,001	-18,4
12	546	1,24	1,01	<0,001	-22,8
13	317	1,26	1,12	<0,001	-12,5
PAPP-A (ng/mL)					
Gebelik haftası	n	Güncel MoM (mean)	Priska MoM (mean)	p	% bias
11	245	1,19	1,03	<0,001	-15,5
12	546	1,15	0,96	<0,001	-19,8
13	317	1,23	1,00	<0,001	-23,0

MoM; multiples of median, Free β -hCG; Serbest Human Koryonik Gonadotropin, PAPP-A; Pregnancy Associated Plasma Protein-A.

Tablo 4. PAPP-A'nın Kayseri bölgesi medyan değerlerinin diğer bölgelerin medyan değerleri ile karşılaştırılması
Table 4. Comparison of median values of PAPP-A in Kayseri region with median values of other regions

	11. gebelik haftası (Kayseri medyan=1,60) n =245	P	% bias	12.gebelik haftası (Kayseri medyan=2,46) n =546	p	% bias	13.gebelik haftası (Kayseri medyan = 3,54) n =517	p	% bias
Eskişehir n11= 403 n12=722 n13=488	1,64	0,772	-2,50	2,54	0,775	-0,79	3,72	0,737	2,36
Mersin n11= 69 n12=155 n13=79	2,2	<0,001	-57,50	3	<0,001	-19,05	5,1	<0,001	-33,86
Elazığ n 11= 178 n 12=231 n 13=156	1,8	0,073	-12,50	2,75	0,607	-9,13	4,33	0,895	-13,65
Van n 11=205 n 12=601 n 13=486	1,57	0,177	1,88	2,12	<0,001	15,87	3,06	<0,001	19,69
Bursa n 11=292 n 12=515 n 13=562	1,37	<0,001	14,38	1,99	<0,001	21,03	3,19	<0,001	16,27
İstanbul n 11=369 n 12=772 n 13=431	2	<0,001	-25,00	2,73	0,783	-8,33	3,94	0,096	-3,41

Tablo 5. Free β -hCG'nin Kayseri bölgesi median değerlerinin diğer bölgelerin median değerleri ile karşılaştırılması
Table 5. Comparison of median values of free β -hCG in Kayseri region with median values of other regions

	11.gebelik haftası (Kayseri median = 39,7) n = 245	p	% bias	12.gebelik haftası (Kayseri median = 30,3) n = 546	p	% bias	13.gebelik haftası (Kayseri median = 28,3) n = 317	p	% bias
Eskişehir n11 = 403 n12 = 722 n13 = 488	42,9	0,408	-8,06	37,2	<0,001	-22,77	29,9	0,995	-5,65
Mersin n11 = 69 n12 = 155 n13 = 79	29,8	<0,001	24,94	32,7	0,842	-7,92	25,4	<0,001	10,25
Elazığ n 11 = 178 n 12 = 231 n 13 = 156	41,05	0,949	-3,40	34,4	0,160	-13,53	27,05	0,164	4,42
Van n 11 = 205 n 12 = 601 n 13 = 486	39,9	0,662	-0,50	38,6	<0,001	-27,39	30,72	0,579	-8,55
Bursa n 11 = 292 n 12 = 515 n 13 = 562	39,4	0,516	0,76	34,1	0,255	-12,54	29,7	0,916	-4,95
İstanbul n 11 = 369 n 12 = 772 n 13 = 431	44,1	0,941	-11,08	36,6	<0,001	-20,79	30,1	0,887	-6,36

TARTIŞMA

İlk trimester taramasının ana amacı, hastalara fetal Down Sendromu için risk değerlendirmesini sağlamaktır. Kromozomal hastalıklar için artan risk olarak raporlanan sonuçlar kesin tanısı için ileri girişimsel testlere yönlendirmesi bakımından önemlidir. Bunun yanı sıra anormal ikili tarama serum belirteçleri hamileliğin olumsuz sonuçları ile ilişkilidir ve bu anormalliklerin bilgisi hasta danışmanlığı ve yönetimi konusunda değerlidir.

İlk trimesterde yapılan ultrasonografik ölçümler ileri dönemlere göre daha doğru ve avantajlı bilgiler verir. Çalışmalarda prenatal tarama testlerinden ikili testin anöploidi tespit oranı, ikinci üç ayda yapılan üçlü test tarama testine göre yüksek olarak verilmektedir. (%72-8'ya %56-77)(18). İkili test değerlendirilme programında kullanılan ve yüksekliği Down sendromu için artan riskin belirlenmesinde belirleyici olan ense saydamlığı risk belirlemesini etkileyen ölçümsel bir faktördür. Ayrıca ense kalınlığı ölçümlerinin artışı ile gebeliğin diğer olumsuz sonuçları, doğuştan kalp defektleri ve kistik higroma ile ilişki olduğu bilinmektedir. Programa girilen önceki Down sendromlu bebek doğumu ve nazal kemik yokluğu risk üzerinde yüksek etkiye sahiptir (10). Benzer şekilde, ikili test parametrelerinden olan PAPP-A'nın düşük seviyelerinin kromozom olarak normal bebeklerde ölü doğum, bebek ölümü, intrauterine büyüme geriliği, erken doğum, pre-eklemasi gibi gebelik ilişkili durumlar ile bağlantısı gösterilmiştir (19, 20).

Medyan değerlerinin risk hesaplama üzerine önemli bir etkisi vardır. Çalışma yapılan toplumun güncel medyanından yüksek medyanların kullanılması hatalı düşük MoM değerleri raporlanmasına neden olur. Nitekim, bu çalışmada olduğu gibi güncel medyanlar üzerinden değerlendirilen yeni MoM değerleri tüm hafta grupları ve her iki parametre için yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0,001$). Priska medyanlar kullanıldığında tesbit edilen artan

riskli gebe sayısı 5 iken, her iki parametre için güncel medyanlar kullanılarak yeniden raporlanan ve artan risk (cutt-off>1/250) olarak değerlendirilen gebe sayısı toplam 13 olmuştur.

PAPP-A için $<0,5$ MoM düzeyleri gebelik bağlantılı komplikasyonlar ile ilişkilidir. Bizim araştırmamızda olduğu gibi Priska programı medyanlarına bağlı olarak düşük olarak raporlanması gebelik kaynaklı komplikasyonlar ile hatalı olarak risk yönetimi yapılmasına sebep olabilecektir. Bu çalışmada $<0,5$ MoM PAPP-MoM düzeyine sahip gebe sayısı Priska medyanlar ile verildiğinde 159 gebe iken, güncel medyanlar ile hesaplandığında bu sayı 128 olarak bulunmuştur.

Prenatal ikili testlerin medyanlarının araştırıldığı bölgesel çalışmalar ülkemizde yapılmaktadır.

Kayseri bölgesi medyanlarının hesaplanması ve benzer çalışmaların yapıldığı diğer bölgeler arası medyan değerlerinin karşılaştırılması bu çalışma ile Kayseri bölgesi için ilk defa raporlanmıştır. Aynı cihazlar ve aynı prenatal risk tanımlama yazılım programı ile değerlendirilmelerine rağmen farklı gebe medyan değerleri göstermeleri, her bölgenin gebe hormon varyasyonlarına sahip olabileceği ve bu yüzden her laboratuvarın kendi güncel medyan değerlerini belirlemesinin önemini göstermektedir. Nitekim risk değerlendirilmesinde kullanılan β -hCG hormonunun etnik ve bölgesel farklılıklar gösterdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (21).

Bölgesel medyan değerlerinin belirlenmesi prenatal tarama testlerinin performansını artıracaktır.

Teşekkür

İstatistiklerinin yapılması aşamasında sağladığı yol gösterici yardım için Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya bölümünden Dr. Hamit Hakan Alp'e teşekkürlerimizi sunuyoruz.

KAYNAKLAR

1. de Graaf G, Vis JC, Haveman M, van Hove G, de Graaf EAB, Tijssen JGP, et al. Assessment of prevalence of persons with Down syndrome: a theory based demographic model. *J Appl Res Intellect Disabil*. 2011; 24:247-62.
2. Parker SE, Mai CT, Canfield MA, Rickard R, Wang Y, Meyer RE, et al. Updated National Birth Prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(12):1008-16.
3. Acikbas I, Tomatir AG, Akdag B, Koksai A. Retrospective analysis of live birth prevalence of children with Down syndrome in Denizli, Turkey. *Genet Mol Res*. 2012 Dec 19;11(4):4640-5.
4. Cuckle H. Prenatal Screening Using Maternal Markers. *J Clin Med*. 2014;3(2):504-20.
5. Akolekar, R, Beta, J, Picciarelli, G, Ogilvie C, and D'Antonio F. Procedure-Related Risk of Miscarriage Following Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2015. 45(1):16-26.
6. Yaron Y, Heifetz S, Ochshorn Y, Lehavi O, Orr-urtregre A. Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2002;22: 778-782
7. James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B. High risk pregnancy. Saunders, Philadelphia, 1995. p. 614-5.
8. XC Goetzinger KR, Singla A, Gerkowicz S, Dicke JM, Gray DL, Odibo AO. Predicting the risk of pre-eclampsia between 11 and 13 weeks' gestation by combining maternal characteristics and serum analytes, PAPP-A and free β -hCG. *Prenat Diagn* 2010;30: 1138-42.
9. Kirkegaard I, Uldbjerg N, Petersen OB, Tørring N, Henriksen TB. PAPP-A, free β -hCG, and early fetal growth identify two pathways leading to preterm delivery. *Prenat Diagn* 2010;30: 956-63.
10. Fetal Medicine -Basic Science and Clinical Practice 2nd Edition. Charles Rodeck, Martin Whittle. London: Churchill Livingstone, 2008.
11. Noreen, AN, Bin Sharif, Akhtar H, Quratulain AI. Determination of Medians of Biochemical Maternal Serum Markers. *Pak Armed Forces Med J* 2018; 68 (2): 185-90.
12. Şanlı DB, Kartkaya K. Determination of the median levels of first trimester screening test parameters in our region. *Perinatal Journal* 2012;20(1):6-11.
13. Polat N, Yazıcı G Polat Y, Ünlü A. The Median Free -hCG and PAPP-A Levels in Mersin Area and Their Association with Pregnancy Complications. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2005; 3(3): 117-23.
14. Ayyıldız H, Kalaycı M, Yılmaz M, Bozkurt M, Kaya M. İkili tarama testi parametrelerinin bölgesel medyan değerlerinin belirlenmesi. *Nobel Med* 2018; 14(2): 49-53.
15. Alp HH, Huyut Z, Çokluk E, Şekeroğlu MR. Median Values of Double and Triple Prenatal Screening Tests: A Van Scale Restrospective Study. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2018; 16(1): 17-24.
16. Üstündağ Y, Huysal K, Kurdoğlu Ü, Satır G, Atalay MA. Determination of the Median Levels of Double Test Screening Parameters in Bursa Region. *Türk Klinik Biyokimya Derg*. 2010; 8(3): 91-97.
17. Sucu V, Yıldırım S, Vardar M, Mihmanlı V. Determination of the Median Levels of Double and Triple Screening Test Parameters in our Hospital. *Abant Med J* 2018;7(2):35-40.
18. Malone FD, Canick JA, RH Ball, DA Nyberg, Comstock CH, Bukowski R, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's Syndrome. *N Engl J Med* 2005; 353:2001-2011.
19. Öztürk Ö, Karşahin E, Alanbay İ, Serdar M, Öztürk M, Ercan M et al. Fetal Ense Kalınlığı, Serbest β -HCG ve PAPP-A'nın 1. Trimester Test Sonuçlarına Etkisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg*. 2010; 8(2):69-74.
20. Patil M, Panchanadikar TM, Wagh G. Variation of Papp-a level in the first trimester of pregnancy and its clinical outcome. *J Ostet Gynaecol India*. 2014; 64: 116-119.
21. Vranken G, Reynolds T, van Nueten J. Medians for second trimeter maternal serum markers: geographical differences and variation caused by median multiples of median equations. *J Clin Pathol*. 2006; 59: 639-644.

Evaluation of Analytical Performance of Clinical Chemistry Assays Using Six Sigma

Altı Sigma Kullanılarak Klinik Kimya Testlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Gökhan Çakırca

Tülin Yazıcı

Department of Medical Biochemistry, Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Education and Research Hospital, Şanlıurfa, Turkey

Başvuru Tarihi: 11 Haziran 2019

Kabul Tarihi: 23 Ağustos 2019

ABSTRACT

Aim: Six sigma is a quality management tool used to evaluate analytical process performance. We evaluated the performance of biochemical and immunological tests on a Roche Cobas 8000 device in our laboratory using sigma metrics.

Materials and Methods: Six-month (September 2018 to February 2019) data on internal quality control (IQC) and external quality control (EQC) were extracted for each assay. The precision and bias were calculated for IQC and EQC, respectively. The sigma values for each assay were calculated using precision, bias, and total allowable error (TEa) ratios of CLIA 2019.

Results: Sigma values of ALB, GLU, Ca, Cl, CREA, Na, K, TP, urea, and complement C3 were below 3. ALT, AST, Amylase, P, GGT, HDL-C, CHOL, LDH, LDL-C, T-BIL, UIBC, UA, CRP, complement C4, IgA, and IgM were between 3 and 6 sigma. Sigma values of CK, D-BIL, lipase, and IgG were greater than 6.

Conclusion: Because most sigma values were above 3, the analytical performances of assays in our laboratory were acceptable. However, parameters with sigma values less than 3 should be strictly monitored.

Keywords: Six sigma; analytical process performance; quality assessment; CLIA 2019.

Gökhan Çakırca : <https://orcid.org/0000-0003-1526-5899>
Tülin Yazıcı : <https://orcid.org/0000-0001-8535-0437>

Yazışma adresi: Gökhan Çakırca
Department of Medical Biochemistry,
Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Education
and Research Hospital, Şanlıurfa, Turkey
e-mail: cakirca.gokhan@gmail.com

ÖZET

Amaç: Altı sigma, analitik süreç performansını değerlendirmek için kullanılan bir kalite yönetim aracıdır. Bu çalışmada, sigma ölçümlerini kullanarak laboratuvarımızdaki Roche Cobas 8000 cihazında biyokimyasal ve immünolojik testlerin performansını değerlendirdik.

Gereç ve Yöntem: Biyokimyasal ve immünolojik testlerinin altı aylık (Eylül 2018 - Şubat 2019), iç kalite kontrol (İKK) ve dış kalite kontrol (DKK) verileri çıkarıldı. Sigma değerleri, İKK verilerinden elde edilen varyasyon katsayısı (CV), DKK verilerinden elde edilen bias ve CLIA 2019'un toplam izin verilebilir hata (TEa) oranları kullanılarak hesaplandı.

Bulgular: ALB, GLU, Ca, Cl, CREA, Na, K, TP, üre ve kompleman C3'ün sigma değerleri 3'ün altındaydı. ALT, AST, Amilaz, P, GGT, HDL-C, CHOL, LDH, LDL-C, T-BİL, UIBC, UA, CRP, kompleman C4, IgA ve IgM testlerinin sigma değerleri 3-6 aralığında bulundu. CK, D-BİL, lipaz ve IgG'nin sigma değerleri 6'dan büyük idi.

Sonuç: Sigma değerlerinin çoğu 3'ün üzerinde olduğu için, laboratuvarımızda biyokimyasal ve immünolojik testlerin genel olarak analitik performansı kabul edilebilir. Bununla birlikte, sigma değeri 3'ten küçük olan testler sıkı kalite kontrol kurallarıyla izlenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Altı sigma; analitik işlem performansı; kalite değerlendirme; CLIA 2019.

INTRODUCTION

Information provided by clinical laboratories has a major impact on patient management and safety, and thus it is important to provide reliable laboratory results to physicians (1). The testing process consists of three main stages: preanalytical, analytical, and postanalytic. Errors in these stages may adversely affect test results. Therefore, strict quality control (QC) practices in the clinical laboratory are essential for the safety and care of patients (2).

QC includes internal quality control (IQC) and external quality control (EQC). IQC is performed daily and provides continuous monitoring of the analytical system. EQC is run once per month and provides an objective evaluation of laboratory performance using an external agency. However, the exact number of defects or errors in the laboratory cannot be evaluated by running EQC and IQC. This problem can be solved by employing sigma metrics calculated from total error (TE), precision (CV), and bias (3).

Sigma metric levels represent a specific value of defects (or errors) per million (dpm) opportunities. For example, six sigma focuses on regulating a process to six standard deviations, corresponding to 3.4 dpm. Lower sigma levels represent more errors and less confidence in test results (4). Sigma metrics provide a scientific basis for

selection of test-specific QC procedures in clinical laboratories and creates a more quantitative study framework. Thus, false rejection and control costs in the laboratory can be reduced (5). This study investigated the analytical performance of biochemical and immunological tests using six sigma metrics and to establish the correct QC strategy for each test.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This study was performed in the clinical biochemistry laboratory of Sanliurfa Mehmet Akif Inan Training and Research Hospital, Sanliurfa, Turkey, which has a 500-bed capacity. Approval for this study was obtained from Harran University Ethics Committee.

The EQC and IQC data from 34 routine biochemical and immunological analytes were extracted for a period of 6 months from September 2018 to February 2019. A COBAS 8000 device (Roche Diagnostics) was used to test biochemical and immunological assays: albumin (ALB), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), amylase, aspartate aminotransferase (AST), calcium (Ca), cholesterol (CHOL), creatine kinase (CK), Chloride (Cl), creatinine (CREA), direct bilirubin (D-BİL), γ -glutamyl transferase (GGT), glucose (GLU), high density lipoprotein cholesterol

(HDL-C), iron, lactate dehydrogenase (LDH), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), lipase, magnesium (Mg), sodium (Na), phosphorus (P), potassium (K), total bilirubin (T-BIL), total protein (TP), triglyceride (TG), unsaturated iron-binding capacity (UIBC), urea, uric acid (UA), C-reactive protein (CRP), immunoglobulins (IgG, IgA, IgM), complement C3 and C4.

Sigma calculation

Two-level IQC materials (PeciControl ClinChem Multi 1 and 2, Roche Diagnostics) provided by the manufacturer of the device were assayed daily prior to analyses of blood samples. The coefficients of variation (CV %) of all assays were calculated from the 6-month IQC data as follows: $CV\% = (\text{standard deviation} \times 100) / \text{mean}$ (6).

Trueness (bias %) for each assay was calculated for each month separately from the EQC data with the following formula: $\text{Bias \%} = (\text{our lab mean} - \text{mean of peer group}) \times 100 / \text{mean of peer group}$ (7). The arithmetic average of bias% was used to calculate sigma values.

The total errors (TEs) of parameters were selected from the Clinical Laboratories Improvement Act of 2019 (CLIA 2019) guidelines (8). There were no TE targets for the Ca, lipase, D-BIL, and K parameters in the CLIA guidelines, so TE values of the Ricos biological variation database (9) were obtained.

The sigma metrics for above-mentioned assays were determined as follows: $\text{Sigma metric} = (\text{TE\%} - |\text{Bias\%}|) / \text{CV\%}$ (10). Sigma value was determined for both the level 1 and 2 of IQC. Sigma values are generally categorized into unacceptable (<3 sigma), good ($3 \leq \text{sigma} < 6$), and world class (≥ 6 sigma) (11,12).

RESULTS

Bias%, CV%, and sigma values of clinical chemistry and immunological tests are shown in Table 1. A sigma value > 6 was

found for CK, D-BIL, lipase, and IgG for both levels of IQC. Iron and Mg showed a sigma value of >6 for IQC-1 and 5.83 and 5.80 for IQC-2, respectively. ALP and TG showed a sigma value of >6 for IQC-2 and 5.03 and 5.62 for IQC-1, respectively. Sigma values of ALT, AST, Amylase, P, GGT, HDL-C, CHOL, LDH, LDL-C, T-BIL, UIBC, UA, CRP, C4, IgA and IgM for both levels of IQC were in the range of 3 to 6. Sigma values of ALB, Ca, Cl, CREA, GLU, Na, K, TP, urea and C3 for both levels of IQC were lower than 3. The QC strategy for future studies according to sigma values are provided in Table 2 (5,13).

DISCUSSION

In laboratories, sigma metrics can be used to assess the performance of tests or analyzers and to establish optimal QC rules and practices (14). Laboratories can determine which assays are world-class (>6 sigma) quality and which assays are unacceptable (<3 sigma). Assays with low sigma values should be improved with a strict QC strategy. This provides an improvement over the classic rule ($\text{control} \pm 2 \text{ SD}$), which is considered of equal quality for all analytes (15).

In the present study, sigma metrics were calculated to evaluate the quality performance of 34 assays on the Roche Cobas 8000 device. CLIA 2019 TE targets, bias, and precision were used to calculate the sigma values of the assays. We observed sigma values < 3 for ALB, Ca, Cl, CREA, GLU, Na, K, TP, urea, and C3 at both QC levels. In Singh et al. (16), who used the Olympus AU400 instrument, a sigma value lower than 3 was observed for urea, Na, and K using the TE values of CLIA 1988. Bozkaya et al. (17) calculated sigma metrics for 13 assays on the Olympus AU680 analyzer using CLIA 1988 TE targets and showed that sigma levels for urea, Na, K, and Cl tests were lower than 3. Another study showed that sigma values for urea, Na, K, and Cl were below 3 using the TE values of CLIA 1988 in the Beckman-Coulter AU 5800 autoanalyzer (5).

Table 1. Bias%, TEa %, CV% and sigma values of the tests
Tablo 1. Testlerin % Bias, % TEa, % CV ve sigma değerleri

Parameter	TE (%)	Average Bias (%)	IQC-1		IQC-2	
			CV (%)	Sigma	CV (%)	Sigma
ALB (g/L)	8	2.17	3.31	1.76	2.73	2.14
ALP (U/L)	20	2.49	3.48	5.03	2.89	6.06
ALT (U/L)	15	2.10	3.44	3.75	2.73	4.73
Amylase (U/L)	10	1.18	2.24	3.94	2.29	3.85
AST (U/L)	15	1.79	3.36	3.93	2.44	5.41
Ca (mg/dL)	2.55 ^a	1.53	2.48	0.41	2.42	0.42
CHOL (mg/dL)	10	1.36	2.73	3.16	2.30	3.76
CK (U/L)	20	1.71	2.83	6.46	2.74	6.68
Cl (mmol/L)	5	1.51	2.18	1.60	1.91	1.83
CREA (mg/dL)	10	3.47	3.62	1.80	3.50	1.87
D-BIL (mg/dL)	44.5 ^a	1.17	4.42	9.80	3.42	12.67
GGT (U/L)	15	1.87	3.12	4.21	2.67	4.92
GLU (mg/dL)	8	2.34	2.12	2.67	2.24	2.53
HDL-C (mg/dL)	20	5.60	2.68	5.37	4.22	3.41
Iron (µg/dL)	15	2.81	1.96	6.22	2.09	5.83
LDH (U/L)	15	1.43	2.46	5.52	2.46	5.52
LDL-C (mg/dL)	20	1.76	4.51	4.04	4.73	3.86
Lipase (U/L)	37.88 ^a	3.79	2.72	12.53	2.72	12.53
Mg (mg/dL)	15	2.29	2.02	6.29	2.19	5.80
Na (mmol/L)	5	0.95	1.61	2.52	1.63	2.48
P (mg/dL)	10	2.62	2.42	3.05	2.36	3.13
K (mmol/L)	5.61 ^a	0.96	1.69	2.75	1.66	2.80
T-BIL (mg/dL)	20	1.91	5.00	3.62	3.82	4.74
TP (g/L)	8	1.56	2.56	2.52	2.40	2.68
TG (mg/dL)	15	0.78	2.53	5.62	2.12	6.71
UIBC (µg/dL)	20	3.99	5.01	3.20	4.97	3.22
Urea (mg/dL)	9	2.75	3.36	1.86	3.05	2.05
UA (mg/dL)	10	1.49	1.98	4.30	1.98	4.30
CRP (mg/L)	30	3.22	4.53	5.91	4.62	5.80
Complement C3 (g/L)	15	1.85	5.75	2.29	6.44	2.04
Complement C4 (g/L)	20	4.67	4.28	3.58	3.92	3.91
IgA (g/L)	15	3.21	3.49	3.38	2.57	4.59
IgG (g/L)	20	1.93	2.65	6.82	2.93	6.17
IgM (g/L)	20	2.17	5.17	3.45	4.55	3.92

a= Ricos desirable TE

Table 2. Internal quality control strategy for future works based on sigma values (5,13).

Tablo 2. Sigma değerlerine dayalı sonraki çalışmalar için iç kalite kontrol stratejisi (5,13).

Sigma value	Assay performances	Number of controls	Measurements	Recommended rule
> 6	World class	2	1	1_{3S}
4-6	Suited for purpose	2	1	$1_{2.5S}$
3-4	Marginal	2	2	$1_{3S} / 2_{2S} / R_{4S} / 4_{1S}$
<3	Unacceptable	3	2	$1_{3S} / 2_{2S} / R_{4S} / 4_{1S}$

Compared to the above studies, the number of tests with sigma values below 3 were higher in our study. This can be explained by the fact that CLIA 2019 standards are more stringent than CLIA 1988 standards. Using ALT as an example, the TEa targets for CLIA

1988 and CLIA 2019 were 20% and 15%, respectively. Hens et al. (15) stressed that the use of different TE standards leads to variable sigma values that make it difficult to interpret clinical chemistry assays. In addition, differences in QC data collection

(e.g., time interval), differences in choosing the source of bias, selected IQC criteria, the concentrations of the controls, as well as different manufacturers, analyzers, methods, and reagents may explain the different sigma values across studies (10,12,15,18). The performance of the method should be improved primarily for tests with sigma values < 3 . For these tests, three levels of quality control with the $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}$ rule should be performed twice a day. In addition, we should periodically calculate sigma values to observe changes in test quality by applying these stringent QC procedures. Besides, sigma levels of assays may increase the use of different analyzers and methods (12).

In our study, amylase, CHOL, P, UIBC, complement C4, IgM (both controls); ALT, AST, T-BIL, and IgA (IQC-1); and HDL-C and LDL-C (IQC-2) were between 3 and 4 sigma. For these tests, the $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}$ rule should be used to ensure accurate test results.

For assays such as GGT, LDH, UA, and CRP (both controls); ALP, HDL-C, LDL-C, and TG (IQC-1); and ALT, AST, iron, Mg, T-BIL, and IgA (IQC-2) between 4 and 6 sigma, QC monitoring should be performed using the $1_{2.5s}$ rule.

A simple 1_{3s} rule should be used for tests with sigma values > 6 (CK, D-BIL, lipase, and IgG (both controls); iron and Mg (IQC-1); and ALP and TG (IQC-2)). For these tests, quality control strategies do not need to be strict and patient results can be reported safely. In this way, control costs and turnaround time (TAT) can be reduced by minimizing false rejection and re-runs.

The use of EQA peer group report in the calculation of bias is the main limitation of our study. Freidecky et al. (19) emphasized that EQA results should be based on comparison with reference method goal values.

CONCLUSIONS

In our laboratory, D-BIL with a sigma value of 12.67 showed the best performance, while Ca had the lowest sigma value of 0.41. Tests with high sigma metric values may use simple IQC rules, while tests with low sigma metric values should be monitored with strict IQC rules. Therefore, each laboratory should establish an IQC strategy for each test using sigma metrics.

REFERENCES

1. Cakirca G. The Evaluation of Error Types and Turnaround Time of Preanalytical Phase in Biochemistry and Hematology Laboratories. *Iran J Pathol* 2018;13(2):173-8.
2. Plebani M, Sciacovelli L, Marinova M, Marcuccitti J, Chiozza ML. Quality indicators in laboratory medicine: a fundamental tool for quality and patient safety. *Clin Biochem* 2013;46(13-14):1170-4.
3. Nanda SK, Ray L. Quantitative application of sigma metrics in medical biochemistry. *J Clin Diagn Res* 2013;7(12):2689-91.
4. Westgard S, Bayat H, Westgard JO. Analytical Sigma metrics: a review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(2):020502.
5. Mao X, Shao J, Zhang B, Wang Y. Evaluating analytical quality in clinical biochemistry laboratory using Six Sigma. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(2):020904.
6. Hill P, Uldall A, Wilding P. Fundamentals for external quality assessment (EQA). Available at: <http://www.ifcc.org/ifcc!les/docs/fundamentals-for-eqa.pdf>. Accessed February 12th 2016.
7. EQAS Program User Guide. Version 12.2015 Available at: <http://www.qcnet.com/Portals/0/PDFs/EQASUserGuide.pdf>. Accessed February 5th, 2018.
8. US Department of Health and Human Services. Clinical laboratory improvement amendments of 1988 (CLIA) proficiency testing regulations related to analytes and acceptable performance 2019. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2019-02-04/pdf/2018-28363.pdf>. Accessed March 18, 2019.
9. Westgard QC. Quality requirements: desirable biological variation database specifications 2019. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Accessed March 18, 2019.
10. Westgard SA. Utilizing global data to estimate analytical performance on the Sigma scale: A global comparative analysis of methods, instruments, and manufacturers through external quality assurance and proficiency testing programs. *Clin Biochem* 2016;49(9):699-707.

11. Zhang C, Zhao H, Wang J, Zeng J, Wang Z. The application of six sigma techniques in the evaluation of enzyme measurement produces in China. *Clin Lab* 2015;61(5-6):461-5.
12. Gülbahar Ö, Kocabıyık M, Çıracı MZ, Demirtaş C, Uçar F, Bayraktar N, et al. The use of six sigma methodology to evaluate the analytical performances of clinical chemistry analyzers. *Turk J Biochem* 2018;43(1):1-8.
13. Westgard JO, Westgard SA. Quality control review: implement ing a scientifically based quality control system. *Ann Clin Biochem* 2016;53(Pt 1):32-50.
14. Schoenmakers CH, Naus AJ, Vermeer HJ, van Loon D, Steen G. Practical application of Sigma Metrics QC procedures in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(11):1837-43.
15. Hens K, Berth M, Armbruster D, Westgard S. Sigma metrics used to assess analytical quality of clinical chemistry assays: importance of the allowable total error (TEa) target. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(7):973-80.
16. Singh B, Gowami B, Gupta VK, Chawla R, Mallika V. Application of sigma metrics for the assessment of quality assurance in clinical biochemistry laboratory in India: a pilot study. *Ind J Clin Biochem* 2011;26(2):131-5.
17. Bozkaya G, Murat Aksit M, Aksit MZ. Evaluation of clinical chemistry tests in emergency laboratory by sigma metrics. *Turk J Biochem* 2018;43(1):9-14.
18. Cao S, Qin X. Application of Sigma-metrics in assessing the clinical performance of verified versus non-verified reagents for routine biochemical analytes. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(2):020709.
19. Friedecky B, Kratochiva J, Budina M. Why do different EQA schemes have apparently different limits of acceptability? *Clin Chem Lab Med* 2011;49(4):743-5.

Hızlı, Hassas ve Kolay HPLC-UV 25(OH)D Tayini ve İmmün Ölçüm Yöntemi ile Karşılaştırılması

A Simple, Sensitive and Rapid HPLC-UV Method for the Determination of 25(OH)D and Comparison of the Immunoassay Method

Özgür Baykan

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Başvuru Tarihi: 14 Temmuz 2019

Kabul Tarihi: 23 Ağustos 2019

ÖZET

Amaç: D vitamini eksikliği, ülkemizde yaygın görülen bir halk sağlığı sorunudur. Eksiklik prevalansını belirlemeye dair yapılan çalışmalarda %90'lara ulaşan verilere rastlamak mümkündür. Son yıllarda bu eksikliğin basın yayın yoluyla da sıkça gündeme getirilmesi, halkımızı kan düzeyinin takibi ile ilgili bir arayışa yönlendirmiştir. Bu sebeplerle laboratuvarlarda D vitamini test sayılarında ciddi artışlar yaşanmaktadır. Hasta başı test maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle de laboratuvar harcamaları içerisinde ön sıralarda yer almaktadır. Laboratuvar maliyetlerinin düşürülmesi, 25(OH)D₂ ve D₃ formlarının ayrı ayrı belirlenebilmesi için ön hazırlık aşaması kolay, hızlı ve hassas 'in-house' bir analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yöntem geliştirilmesinde Ultimate 3000 HPLC-UV (Dionex, Germany) cihazı, yöntem karşılaştırma çalışması amacıyla da Architect 25(OH)D kiti (Abbott Diagnostic, USA) kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları CLSI kılavuzları kullanılarak yapılmıştır (EP5-A2, EP6-A, EP9-A2). Doğruluk, Sertifikalı Referans Malzeme (UME CRM 1308) aracılığıyla değerlendirilmiştir. Kromatografik ayırım için ters faz 150mmX4.6mm,(3.0µm) ODS-1(Thermo Scientific, USA) analitik kolon tercih edilmiştir.

Bulgular: Çalışma içi, çalışmalar arası ve günler arası %CV değerleri 18.9ng/mL 25(OH)D₃ için sırasıyla %2.6, %2.7 ve %6.3 olarak, 57.4ng/mL için ise %1.8, %1.8 ve %4.8 olarak belirlendi. 25(OH)D₃ testi için LOD değeri 0.7ng/mL, LOQ değeri ise 2.1ng/mL olarak tespit edildi. HPLC-UV ve Abbott Architect sistemleri arasındaki uyum Passing Bablok regresyon analizi ile değerlendirildi ($y=0,89x+1,81$).

Sonuç: HPLC-UV ve Abbott Architect arasındaki uyum her iki yönteminde tercih edilebileceğini düşündürmektedir. Ancak her laboratuvar 25(OH)D tayini amacıyla yöntem seçiminde içerisinde bulunduğu şartlara göre karar vermelidir. Çünkü test performanslarının birbirlerine oldukça benzer olduğu bu gibi durumlarda yöntem seçiminde hasta sayısı, tecrübeli personel varlığı ve maliyet belirleyici parametreler olarak daha ön planda yer alacaktır.

Anahtar Sözcükler: Yöntem; Kromatografi; Vitamin D

Özgür Baykan : <https://orcid.org/0000-0001-8551-6900>

Yazışma adresi: Özgür Baykan
Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Çağış
Kampüsü/Balıkesir
e-mail: ozgurbaykan@gmail.com

ABSTRACT

Aim: Vitamin D deficiency is a common public health problem in our country. It is possible to find data reaching 90% in studies about determining deficiency prevalence. In recent years, this deficiency has been attracted the attention of the press and has directed people to a search for blood level monitoring. For these reasons, there are also serious increases in the number of vitamin D levels analyses in laboratories. Due to the high measurement costs per patient, it is also one of the most important laboratory expenses. It is aimed to develop an simple, sensitive and rapid 'in-house' analysis method in order to reduce laboratory costs and to determine 25(OH)D₂ and D₃ forms separately.

Material and Methods: Ultimate 3000HPLC-UV (Dionex, Germany) was used in the development of the method. Architect 25(OH)D kit (Abbott Diagnostic, USA) were used for method comparison study. Validation studies were performed using CLSI guidelines(EP5-A2,EP6-A,EP9-A2). Accuracy was evaluated using Certified Reference Material (UME CRM 1308). For chromatographic separation, reverse phase 150mmX4.6mm,(3.0 µm) ODS-1 (Thermo Scientific,USA) analytical column was used.

Results: Within run, between run and between day precisions (%CV) for 18.9ng/mL 25(OH)D₃ were 2.6%, 2.7%, 6.3% and for 57.4ng/mL were 1.8%, 1.8% and 4.8% respectively. For 25(OH)D₃, the LOD was 0.7ng/mL and the LOQ was 2.1ng/mL. Correlation between HPLC-UV and Abbott Architect systems was evaluated by Passing Bablok regression analysis ($y=0.89x+1.81$).

Conclusion: The compatibility between HPLC-UV and Abbott Architect suggests that both methods can be preferred. However,each laboratory should decide according to the their conditions in which the method is selected for the determination of 25(OH)D. Because in such cases where test performances are very similar. The number of patients, experienced staff presence and cost-determining parameters will be more prominent in the selection of methods,

Keywords: Methods; Chromatography; Vitamin D

GİRİŞ

D vitamini eksikliği ülkemizde yaygın görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Her ne kadar güneşten zengin bir ülkede yaşıyor olsak da güneş ışığından dik geldiği saatlerde yararlanılmaması, güneş koruyucu krem kullanımı, giyinme ve beslenme alışkanlıkları bu sorunun nedenleri arasında sayılabilir. Literatüre baktığımızda D vitamini eksikliği prevalansı ile çok sayıda araştırmaya rastlamak mümkündür. Güneş açısından zengin bir bölge olan Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada halkın %75 inde D vitamini eksikliği gözlemlendiği bildirilmiştir(1). Güneydoğu bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada ise eksiklik oranlarının %94'lere ulaştığı raporlanmıştır(2). İstanbul'da 688 kişi ile yapılan araştırmada ise katılımcıların %72'sinde D vitamini eksikliği bildirilmiştir (3). Baykan ve arkadaşları da araştırmalarında D vitamini eksikliğinden etkilenenlerin oranını %83,7 olarak belirtmişlerdir(4). Gelişmiş ülkelerde de D vitamini eksikliği olduğuna dair literatürde verilere rastlanmakla birlikte prevalansı ile ilgili %24 ile %50 aralığında verilere rastlanmıştır(5,7). D

vitamini eksikliğinin bu ülkelerde daha az gözleniyor olması; gıdalara yapılan D vitamini desteğinin etkisi sonucu olabileceği düşünülmüştür.

Eksikliğinin birçok hastalığın etiyolojisinde rol alabileceğine dair son yıllarda yapılan çalışmalar tüm dünyada D vitaminine olan ilgiyi artırmıştır. İlgi sadece akademik araştırmalarla sınırlı kalmayıp, özellikle basının da bu vitamine ilgisi ülkemizde de bir duyarlılık artışına neden olmuştur. Özellikle son yıllarda birçok birey hastanelere D vitamini düzeyini ölçtürmek için başvurmakta ve klinisyenden bunu direk talep etmektedir. Artan bu talep laboratuvarlarda D vitamini test sayısının artışı ile sonuçlanmıştır. Test sayısındaki bu artışa sadece ülkemizde değil birçok gelişmiş ülkede rastlamak mümkündür. Örneğin Avustralya'da, 2000 yılında yapılan D vitamini testi 37/100.000 kişi iken 2011'de 3468/100.000 kişiye ulaşmıştır. Bu sürede D vitamini analiz sayısında 94 kat artış yaşanırken açlık kan şekeri ölçümü sayısındaki artış sadece 2,5 kat kadar olmuştur(8). Bir başka araştırmada Fransa'da 2008-2013 yılları arasında D vitamini analiz

sayısındaki artışın 7,5 kat olduğu bildirilmiştir(9). Sonuç olarak artan talep birçok kit üreticisinin de ilgisini çekmiş ve D vitamini ölçüm yöntemlerinin çeşitlenmesini beraberinde getirmiştir.

Geçmişten günümüze kadar 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) vitamini ölçümü amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Her bir yöntem ve cihazın avantajları ve dezavantajları yeni teknolojik gelişmelerle sürekli değişmektedir. Laboratuvarlar yöntem seçiminde kolaylık, maliyet, kısa sürede sonuç verme, özgüllük ve doğruluk arasında bir denge bulmak için çaba sarf etmektedir. Birçok üretici tarafından üretilen kitlerin pazara sunulması, farklı cihaz ve yöntemler kullanılması gibi nedenlerle standardizasyonu için yoğun çaba harcanmaktadır. Günümüzde ölçüm yöntemlerinin standardizasyonu için yapılan en kapsamlı çalışma D vitamini kalite değerlendirme programı olan Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) aracılığıyla yapılmaktadır. Fakat DEQAS'ın tüm uğraşlarına rağmen tam bir standardizasyon sağlamak halen mümkün görülmemektedir(10). Üretici firmalarda bu amaçla yöntemlerini geliştirerek yada değiştirerek yeni versiyon kitlerini pazara sunmaktadırlar. DEQAS üyesi laboratuvarların ölçüm yöntemlerindeki dağılıma bakıldığında ise yaklaşık %20'sinin kromatografik temelli yöntemleri kullandığı (HPLC-UV ya da HPLC-MS/MS), geri kalan diğer laboratuvarların büyük kısmının immünolojik temelli ticari kitler kullanarak analizlerini gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Kromatografik temelli yöntemlerde tecrübeli laboratuvar personeli gereksinimi, manuel örnek hazırlığının ve 'in-house' yöntem geliştirilmenin zorluğu gibi nedenler tercih edilmelerini güçleştirirken, 25(OH)D₂ ve D₃ formlarını ayrı ayrı belirleyebilmesi, yüksek doğruluk ve hassasiyetle ölçüm yapabilmesi, interferansların daha az gözlenmesi üstünlükleri arasında sayılabilir. İmmün kökenli ölçüm yöntemleri ise hızlı analiz süresi, düşük örnek hacmi ve tam otomatik cihazlar ile kullanılması gibi avantajlara sahiptir. Kromatografi temelli yöntemleri maliyet açısından karşılaştıracak olursak,

LC-MS/MS'in kurulum maliyeti HPLC-UV sistemlerden yaklaşık 4-5 kat daha fazladır. İlk kurulum maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı yöntem geliştirilmesi için HPLC-UV sistemleri tercih edilebilir.

Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi Laboratuvarında HPLC-UV sistemi tercih edilerek 25(OH)D analizi yapılmaktadır. Bu makale ile yöntemin geliştirilmesi sürecinde elde edilen validasyon verileri ile hasta örneklerinin karşılaştırılması sayesinde elde edilen verilerin literatüre kazandırılması ve 'in-house' yöntem geliştirecek laboratuvarların faydalanması amaçlanmıştır. Bu nedenle HPLC-UV aracılığıyla geliştirilen yöntemin validasyonu ve yeni versiyon Architect 25(OH)D kiti ile karşılaştırma çalışması yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

25(OH)D vitamini testi için yöntem geliştirilmesi ve validasyonu amacıyla Ultimate 3000 HPLC-UV (Dionex, Germany) cihazı, yöntem karşılaştırma çalışması amacıyla da Abbott Architect i2000 cihazı ve Architect 25(OH)D (LN 5P02) kiti (Abbott Diagnostic, USA) kullanılmıştır. Etik onay Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır. Validasyon çalışmaları CLSI (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*) kılavuzları kullanılarak yapılmıştır.

Kesinlik CLSI EP5-A2 rehber kılavuzu kullanılarak belirlenmiştir. 2 düzey kontrol ve 2 düzey hasta serum havuzu 20 gün süreyle günde 2 kez 2 tekrar halinde çalışılmıştır. Linearite grafiği CLSI EP-6A kılavuzuna göre 9 nokta belirlenerek oluşturulmuştur. Sinyal/Gürültü oranlarının >10 olma sınırı LOQ (Kantitasyon limiti) olarak kabul edilmiştir. Bu sınırlarda her bir örnek 20 kez tekrar edilmiş, tekrarlanabilirlik değerleri <%20 olarak tespit edilmiştir. Sinyal/Gürültü oranlarının >3 olduğu değer LOD (Deteksiyon limiti) olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri ekstraksiyon öncesi ve sonrası 25(OH)D₂ ve D₃ standart solüsyonlarının eklenmesi yöntemi ile hesaplanmıştır. Doğruluk TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü tarafından üretilen Sertifikalı Referans

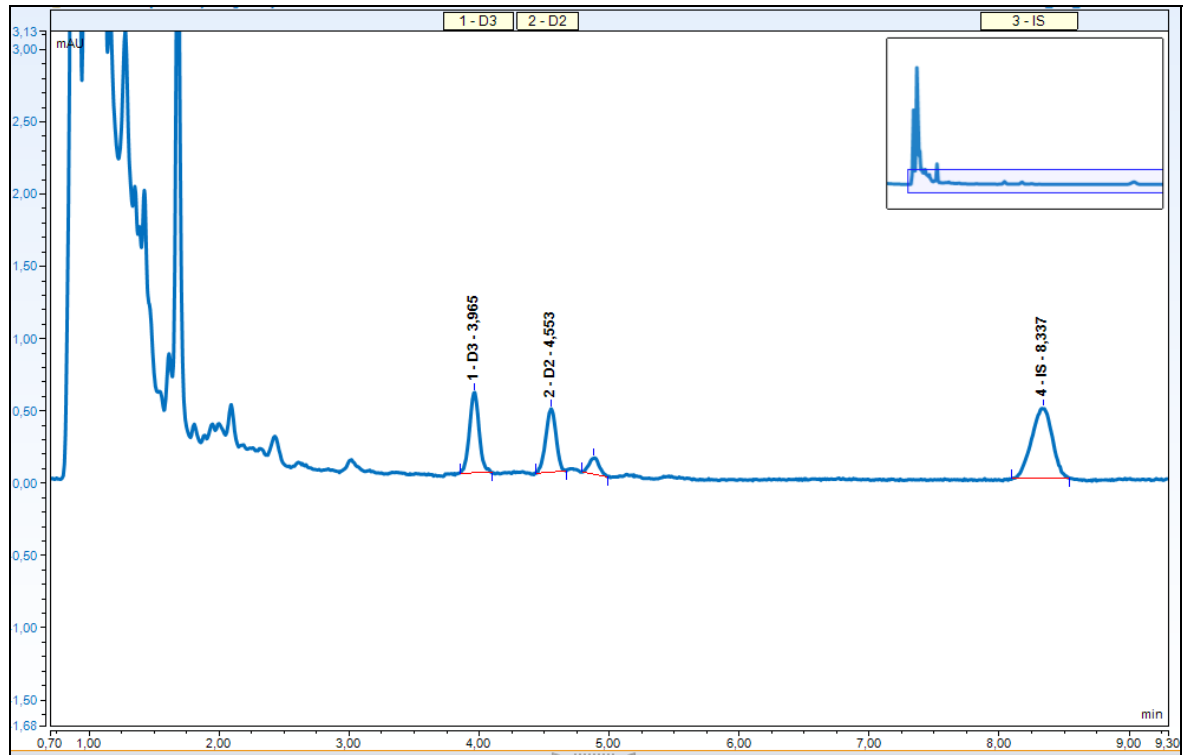
Malzeme (UME CRM 1308) kullanılarak sağlanmıştır. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında EP-9A2 kılavuzu kullanılmıştır. Verilerin analizi MedCalc 13.1 ve Analyze-it programları aracılığıyla yapılmıştır.

Serum örneklerinden 25(OH)D'nin ekstraksiyonunda proteinlerin çöktürülmesi amacıyla tuz olarak Amonyum sülfat (Sigma Aldrich, USA) ve likid-likid ekstraksiyon amacıyla Asetonitril (Sigma Aldrich, USA) kullanılmıştır(11). Amonyum sülfat oda ısısında su içerisinde çözündürülerek (%40 w/v) hazırlanmıştır. 300 uL hasta serumu, kontrol (Recipe, Germany) ve kalibratör (Recipe, Germany) üzerine 400uL amonyum sülfat çözeltisi ve 300uL asetonitril ve iç standart karışımı konularak 10 saniye vortekslenmiştir. İç standart olarak Dodecanophenone (Sigma Aldrich, USA) 800 ppb konsantrasyonda olacak şekilde asetonitril içerisinde önceden çözündürülmüş ve asetonitril ile birlikte serum, kontrol ve kalibratöre eklenmiştir. Vortekslenen örnekler 13500Xg de 10 dk

santrifüj edilmiştir. Sonrasında üst fazdan 150 uL alınarak analiz için HPLC sistemine aktarılmıştır.

Kromatografik ayırım için ters faz 150mmX4.6mm (3.0 µm) ODS-1 (Thermo Scientific, USA) analitik kolon kullanıldı. Analiz için optimum numune hacmi 20uL, kolon ısı 40°C, UV dedektör dalga boyu 265 nm olarak belirlendi. Hareketli faz için Asetonitril, Su (Sigma Aldrich, USA) ve İso-propil alkol (Sigma Aldrich, USA) 77,5:20:2,5 oranında kullanıldı. Tampon olarak mobil faz içerisine su ile birlikte 10 mM konsantrasyonda amonyum format ve %0.1 Formik asit eklendi. Akış hızı 1.5 mL/dk ve analiz süresi 9.3 dk olarak belirlendi (Şekil 1).

Analiz sonrası kromatogramda her bir pikin eğri altındaki alanları Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) programı aracılığıyla hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra altta verilen formül programa girilerek örneklerin konsantrasyonu belirlendi.



Şekil 1. 25(OH)D₃ ve D₂ kromatogram örneği (D₃, D₂ ve IS için retansiyon zamanları; 3.96, 4.55 ve 8.33 dakika)

Figure 1. 25 (OH) D₃ and D₂ chromatogram samples (retention times for D₃, D₂ and IS; 3.96, 4.55 and 8.33 minutes)

$$\text{Numune konsantrasyonu} = \frac{(\text{Numune pik alanı} / \text{Numune iç std pik alanı}) \times \text{Kalibratör konsantrasyonu}}{(\text{Kalibratörün pik alanı} / \text{Kalibratörün iç std pik alanı})}$$

BULGULAR

Hasta ve kontrol numunelerinden oluşturulan havuz aracılığıyla belirlenen tekrarlanabilirlik verileri Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. 25(OH)D₃ testine ait tekrarlanabilirlik verileri

Table 1. 25 (OH) D3 test reproducibility data

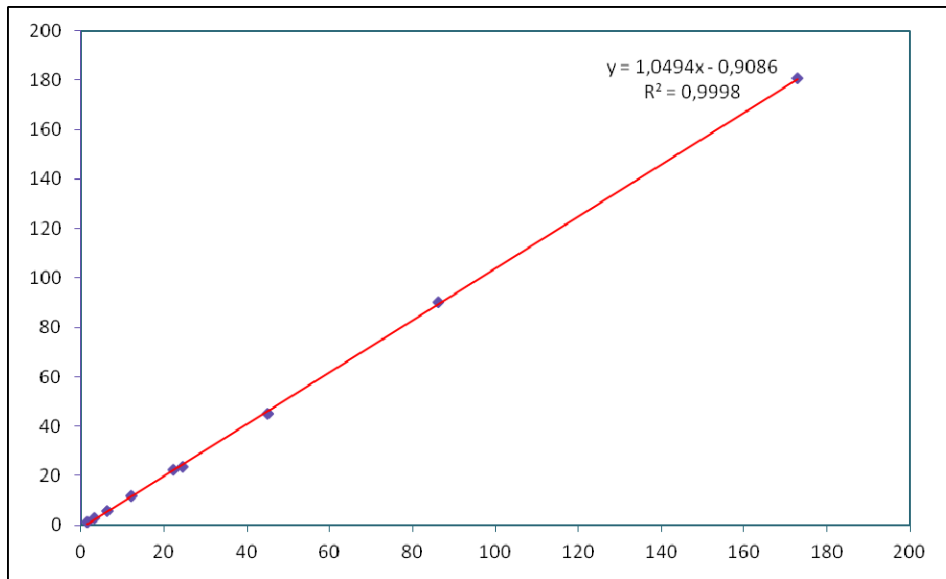
Numune 25(OH)D ₃	Konsantrasyon (ng/mL)	Çalışma içi %CV	Günler arası %CV	Çalışmalar arası %CV
Kontrol serumu 1	24.4 ng/mL	%2.17	%4.22	%3.52
Kontrol serumu 2	88.2 ng/mL	%1.50	%3.18	%3.49
Hasta serumu 1	18.9 ng/mL	%2.62	%6.26	%2.73
Hasta serumu 2	57.4 ng/mL	%1.81	%4.78	%1.82

Tablo 2. 25(OH)D₂ testine ait tekrarlanabilirlik verileri

Table 2. 25 (OH) D2 test reproducibility data

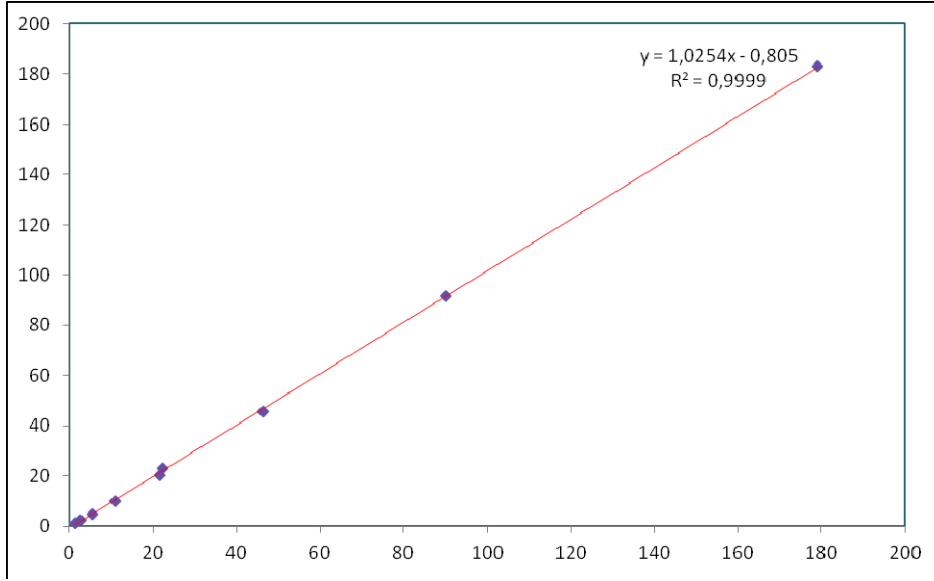
Numune 25(OH)D ₂	Konsantrasyon (ng/mL)	Çalışma içi %CV	Günler arası %CV	Çalışmalar arası %CV
Kontrol serumu 1	21.7 ng/mL	%3.28	%4.63	%2.86
Kontrol serumu 2	89.3 ng/mL	%1.66	%3.76	%3.32
Hasta serumu 1	28.6 ng/mL	%3.01	%5.62	%4.54
Hasta serumu 2	144.8 ng/mL	%1.73	%4.21	%1.76

Testlerin linearite grafikleri Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiş olup, her iki 25(OH)D vitamini formunun da 180ng/mL düzeyine kadar lineer olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. 25(OH)D₃ için linearite grafiği

Figure 2. Linearity graph for 25 (OH) D₃



Şekil 3. 25(OH)D₂ için linearite grafiği
Figure 3. Linearity graph for 25 (OH) D₂

Numunelerin alt tespit (LOD) ve kantite edilebilen en küçük değerleri (LOQ) Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Numunelerin LOD ve LOQ değerleri.
Table 3. LOD and LOQ values of samples.

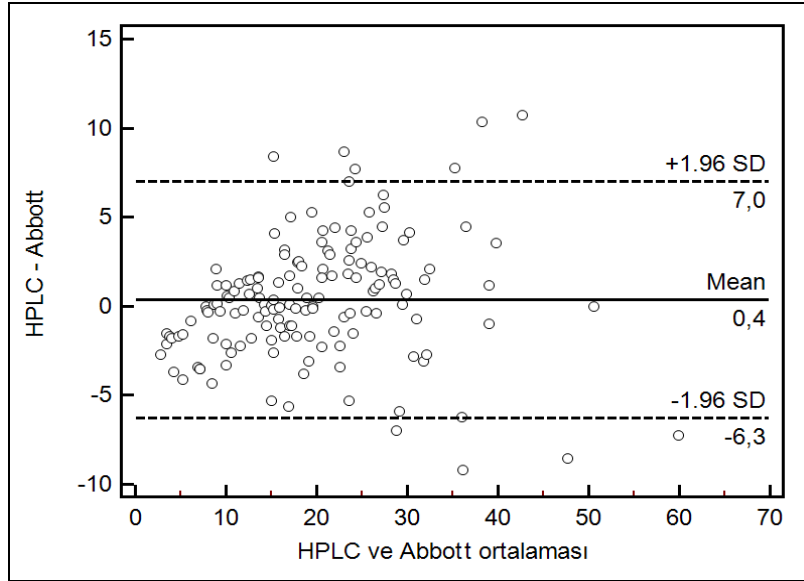
Numune	LOD	LOQ
25-hidroksivitamin D ₃	0.7 ng/mL	2.1 ng/mL
25-hidroksivitamin D ₂	0.6 ng/mL	2.4 ng/mL

Geri kazanım değerlerinin belirlenmesi için kontrol ve hasta havuzlarından oluşan 4 ayrı düzeyde numune kullanılmıştır. Geri kazanım değerlerinin 25-OH-D₃ için %97 – %112 aralığında 25-OH-D₂ için ise %99-%108 aralığında değiştiği belirlenmiştir.

Bias değerlerinin belirlenmesinde UME CRM 1308 (Ulusal Metroloji Enstitüsü, TÜBİTAK) hedef değerleri kullanıldı. 25(OH)D₂ için bildirilen hedef değer 50,09 iken ölçülen değer 51,5 ng/mL olarak belirlenmiş olup 25(OH)D₂ için %Bias değeri %2,8 olarak hesaplandı. 25(OH)D₃ için bildirilen değer 48,85 olup ölçülen değer 49,5 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre 25(OH)D₃ için hesaplanan %Bias değeri ise %1,3 olarak tespit edildi.

Her iki yöntem arasındaki uyumun değerlendirilebilmesi amacıyla Bland-Altman grafiği (Şekil 4) ve Passing ve Bablok regresyon analizi (Tablo IV) yapılmıştır. Her iki yöntem ortalaması ile HPLC ve Abbott arasındaki farkın karşılaştırılması amacıyla çizilen Bland Altman grafiği incelendiğinde ortalama Bias değeri 0,4ng/mL olarak gözlenmiştir. Bu değer her iki yöntem arasındaki ortalama farkın oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

HPLC ve Abbott ile ölçülen 25(OH)D ölçümleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Passing ve Bablok regresyon analizi yapılarak regresyon doğrusu çizilmiştir (Şekil 5). Regresyon doğrusunun lineariteden sapmadığı belirlenmiştir (P=0.37)



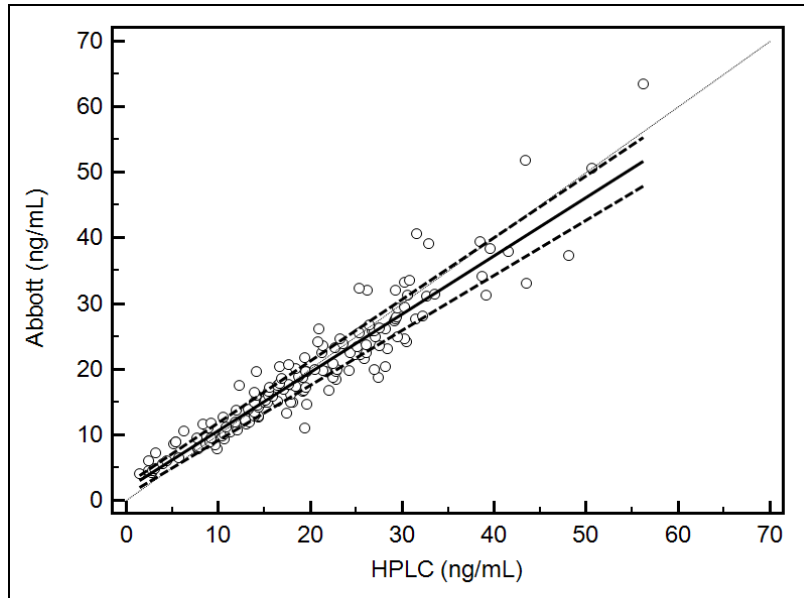
Şekil 4. HPLC ve Abbott 25(OH)D ölçümlerinin Blant Altman grafiği ile karşılaştırılması. (X eksenini her iki yöntemle ölçülen 25(OH)D sonuçlarının aritmetik ortalaması iken Y eksenini HPLC ile ölçülen sonuçların Abbott ile ölçülen sonuçlardan farkını ifade etmektedir. Her 2 ekseninde de birimler ng/mL olarak verilmiştir)

Figure 4. Comparison of HPLC and Abbott 25 (OH) D measurements with Blant Altman graph. (The X-axis is the arithmetic mean of 25 (OH) D results measured by both methods, whereas the Y-axis represents the difference from the Abbott results measured by HPLC. Units are given in ng / mL on both axes.)

Tablo 4. İki yöntem arasındaki ilişkinin Passing ve Bablok regresyon analizi verileri ile değerlendirilmesi.

Table 4. Evaluating the relationship between two methods with Passing and Bablok regression analysis data.

	Örnek Sayısı	Ortalama (ng/mL)	Standart Sapma (ng/mL)
HPLC	147	19.95	10.43
Abbott	147	19.58	9.92
$(y=0,89x+1,81)$			



Şekil 5. HPLC ve Abbott ölçüm yöntemleri ile ölçülen 25(OH)D sonuçlarının dağılımı.

Figure 5. Distribution of 25 (OH) D results measured by HPLC and Abbott measurement methods.

TARTIŞMA

D vitamini eksikliği prevelansında gözlenen yükselme ve bu duruma karşı gerek halkımızda gerekse hekimlerde duyarlılığın artması, laboratuvarlarda analiz sayısının artması ile sonuçlanmıştır. Test başı maliyetlerinin de yüksek olması toplam laboratuvar harcamalarında önemli bir pay almasına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak maliyet etkin yöntemlerin tercih edilmesi gündeme gelmektedir. DEQAS verilerine göre rutin laboratuvarların %80'den fazlası otomatize sistemleri ve özellikle immün temelli ölçüm yöntemlerini tercih etmektedir. Bu yöntemler hızlı, düşük hacimle çalışabilmeleri ve tecrübeli eleman ihtiyacı gereksiniminin daha az olması nedeniyle daha sık tercih edilmektedir. Ancak çapraz reaksiyonlara açık olmaları, D_2 ve D_3 formlarını ayıramamaları ve kit maliyetleri açısından halen 'in-house' yöntemlerin çok üzerinde olmaları gibi nedenlerde belirgin dezavantajlarıdır. Laboratuvarların yaklaşık geri kalan %20 kadarı da kromatografik temelli yöntemleri tercih etmektedir. Ancak kromatografik yöntemler kullananların hangi oranlarda ticari kit ya da 'in-house' yöntem kullandığına dair bir veriye rastlanmamıştır. Kromatografik yöntemler ile analizlerde ise son yıllarda LC-MS/MS kullanımı %80'lerin üzerine çıkmaya başlamıştır. Altın standart yöntem olması, analiz süresinin HPLC'ye göre daha kısa olması gibi nedenler avantajları arasında sayılabilir. Ancak ilk kurulum maliyetlerinin HPLC'ye göre yaklaşık 4-5 kat daha yüksek olması ise önemli bir sorun olarak karşımızda durmaktadır. Bu sebeplerden ötürü analiz sayısı günlük 100-150 numunenin altında olan laboratuvarlarda HPLC sistemleri kurulması LC-MS/MS'e göre maliyet-etkin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 'in-house' yöntem kullanılması maliyetleri ciddi oranda düşürmektedir. Bu çalışma sonucu ortaya çıkarılan yöntem ile otomatize sistemlere göre yaklaşık 4 katın üzerinde bir tasarruf sağlanabildiği gözlenmiştir.

Araştırmada rutin laboratuvarlarda yaygın kullanılmakta olan immün ölçüm temelli kit yerine HPLC-UV sistemlerde geliştirilen

yöntem aracılığıyla ölçüm yapmanın etkisini değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntemde ön hazırlık süresi diğer manuel yöntemlere göre daha kısa tutulmuştur. İşgücü ve zaman kaybının azaltılması açısından bu durum son derece önemlidir. Literatürde azot altında uçurma yapılarak geliştirilen yöntemlere sık rastlanmakla birlikte 100'ün üzerinde örnek gelen laboratuvarlarda bu yöntemlerin uygulanması da zaman ve işgücü kaybına neden olacaktır. Çalışmada ön hazırlık amacıyla kullanılan yöntemde hasta plazmasına 2 farklı çözücünün eklenmesi sonrası 10 sn vorteks ve 10 dk santrifüj işlemi sonrası üst fazın direk cihaza verilmesi en önemli avantajları arasındadır.

Tekrarlanabilirlik açısından değerlendirildiğinde hem çalışma içi hem çalışmalar arası hem de günler arası verilerin ortalaması %5'in altında gözlenmiş olup, kabul edilebilir sınırlar içerisinde değerlendirilmiştir. Standart referans materyal kullanılarak yapılan çalışmada %Bias değerleri 25(OH) D_3 için %1,3 iken, 25(OH) D_2 için ise %2,8 olarak bulunmuş olup testin performansının yeterli olduğu değerlendirilmiştir. Abbott Architect cihazı kullanılarak yapılan karşılaştırmada her 2 testin performansı birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Her 2 yöntemin karşılaştırılması amacıyla çizilen Bland Altman grafiğinde aralarındaki ortalama Bias değeri 0.4 ng/mL gibi oldukça düşük bulunmuştur. Passing ve Bablok regresyon analizi yapılarak çizilen regresyon doğrusunun lineariteden sapmadığı belirlenmiştir ($P=0.37$). Literatürde Architect (5P02) 25(OH)D kiti, Elecsys Total D vitamini kiti (Roche diagnostics, Germany), Advia Centaur Total D vitamini kiti (Siemens, NY) ve ID-LC-MS/MS referans metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada Architect kitinin performansı yeterli görülmüşken, otomatize Total 25(OH)D testlerinin halen standardizasyona ihtiyaç duydukları bildirilmiştir(12). Architect 25(OH)D kitinin güncel olan 5P02 versiyonunun performansı ile ilgili literatürde rastlanan olumlu veriler yanında bir önceki versiyon olan 3L52 ile ilgili bias hedeflerini karşılamadığına dair veride rapor edilmiştir(13). Bu durum immün temelli

ölçüm yöntemlerinin performansının sürekli geliştirildiğini bize göstermektedir.

D vitaminin kemik iskelet patolojileri dışında literatürde kanserler başta olmak üzere depresyon ve hatta tüberküloz ile ilişkisini irdeleyen çalışmalara rastlamak mümkündür (4,14,15). Bu durum bilim insanlarının bu vitamine ilgisinin artmasına neden olurken, halkımızda da duyarlılığın artmasına ve sonuçta birçok hastane laboratuvarında analizinin yapılmasına neden olmaktadır. Ancak hasta başı test maliyetleri halen oldukça yüksek seyretmektedir. Bu nedenle bazı laboratuvarlar maliyetleri düşürmeye yönelik arayışlara girmek durumunda kalmışlardır. Bu nedenle yöntem seçiminde her laboratuvar için farklı dinamiklerin varlığı göz önünde tutulmalıdır. Çalışmada da gözlemlendiği üzere iki farklı yöntemle yapılan analizler arasındaki uyumun yeterli olması aslında doğruluk, tekrarlanabilirlik gibi verilerin yerini maliyet gibi başka dinamiklerin almasına neden olmuştur. HPLC kurulum maliyetlerinin LC-MS/MS'e göre düşük olması, laboratuvarda yeterince deneyimli personel varlığı, geliştirilen yöntemin ön hazırlığının ve analiz süresinin kısa olması gibi nedenlerin yanında maliyet-etkin olması bizim HPLC tercihimizde belirleyici olmuştur.

SONUÇ

Her laboratuvar 25(OH)D tayini amacıyla yöntem seçiminde içerisinde bulunduğu şartlara göre karar vermelidir. Yapılan çalışmada ve literatür verilerinden elde edilen verilere göre son yıllarda gerek immün gerekse kromatografik temelli yöntemler birbirleriyle kıyaslandığında çeşitli artı veya eksi yönleri bulunmakla birlikte analitik performansları birbirlerine yakındır. Ortaya çıkan farklarında klinik karar düzeyini etkileyecek düzeyde olmadığı düşünülmektedir. Bu sebeplerle laboratuvara 25(OH)D düzeyi tayini için yöntem seçiminde hasta sayısı, tecrübeli personel varlığı ve maliyet-etkin bir yöntem olması belirleyici parametreler olarak ön planda düşünülmelidir.

Teşekkür: Yöntem geliştirme sürecinde laboratuvarda gösterdikleri çalışmalarından dolayı Laboratuvar Teknisyenleri Aslı Tırnıvalı ve Mustafa Dolgun'a, Çalışmanın yapıldığı süreçte altyapının oluşturulmasında idari olarak destek sağlayan ve ilgili tarihlerde Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi Başhekimliği Op. Dr. Nazmi Başaran ve Balıkesir Kamu Hastaneleri Genel Sekreteri Op. Dr. Hasan Hocaoglu'na teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Hekimsoy Z, Dinç G, Kafesçiler S, Onur E, Güvenç Y, Pala T. Vitamin D status among adults in the Aegean region of Turkey. BMC Public Health 2010;10(782):1-7.
2. Taşkiran B, Cansu GB. Güneydoğu Bölgesinde Erişkinlerde D Vitamini Eksikliği. Osmangazi Journal of Medicine, 2016;38:1-8
3. Şenyiğit A, Orhanoğlu T, İnce B, Yaprak B. Vitamin D Levels in Routine Medical Examination. J Ist Faculty Med. 2018;81(4):115-118.
4. Baykan O, Akgül M, Uren N, Yaman A, Tinay I, Ergül E et al. The Relationship between Urothelial Type Bladder Cancer, Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels, and Vitamin D Receptor Apal, BsmI, FokI, and TaqI Polymorphisms. Clin Lab.2019;65:445-452.
5. Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Arch Pediatr Adolesc Med. 2004; 158:531-537
6. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1994. Am J Clin Nutr 2002;76:187-92.
7. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D Insufficiency among Free-Living Healthy Young Adults. Am J Med. 2002;112(8): 659-662.
8. Bilinski K, Boyages S. Evidence of overtesting for vitamin D in Australia: an analysis of 4.5 years of Medicare Benefits Schedule (MBS) data. BMJ Open 2013;3:e002955. doi:10.1136/bmjopen-2013-002955
9. Caillet P, Goyer-Joos A, Viprey M, Schott AM. Increase of vitamin D assays prescriptions and associated factors: a population-based cohort study. Scientific Reports.2017;7:10361,DOI:10.1038/s41598-017-10263-8

10. Fraser WD, Milan AM. Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments. *Calcif Tissue Int.* 2013;92:118–127
11. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvanan V, Grant R. Optimization Of Protein Precipitation Based Upon Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2003;785:263–275
12. Lim YK, Park AJ, Kweon OJ, Choi JH, Performance Evaluation and Measurement Uncertainty Determination of the New Version of the Abbott ARCHITECT 25-OH Vitamin D 5P02 Assay. *Am J Clin Pathol* 2018;00:1-8.
13. Kulan P, Uras AR, Delibaş S, Durmuşcan M, Yıldırım S. 25-Hidroksivitamin D İmmün Ölçüm Yönteminin Analitik Performansı. *Türk Klinik Biyokimya Derg.*2016;14(3):181-188.
14. Can MŞ, Baykan H, Baykan Ö, Erensoy N, Karlıdere T. Vitamin D Levels and Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in Major Depression. *Psychiatria Danubina*, 2017;29(2):179-185.
15. Wu YJ, Yang X, Wang XX, Qiu MT, You YZ, Zhang ZX, et al. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of tuberculosis: a meta-analysis of 15 studies. *PLoS One* 2013;8(6):e66944.

Tiroid Fonksiyon Testlerinde Sirkadiyen Ritim Analizi

Circadian Rhythm Analysis in Thyroid Function Tests

Belkız Öngen İpek Mustafa Erinç Sitar

Maltepe Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya, İstanbul, Türkiye

Başvuru Tarihi: 18 Temmuz 2019

Kabul Tarihi: 26 Ağustos 2019

Kısaltmalar: Tiroid stimulan hormon (TSH); serbest T3 (fT3); serbest T4 (fT4); subklinik hipotiroidi (SH)

ÖZET

Amaç: Tiroid hormon testleri sirkadiyen ritim göstermektedir. Bu çalışmada görünürde sağlıklı ve tiroid hormon replasmanı alan hipotiroidi tanılı hastalarda aynı gün içerisinde sabah, öğle ve öğleden sonra alınan örneklerde çalışılan Tiroid Stimulan Hormon (TSH) ve serbest T4 (fT4) test sonuçlarının değişimi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya görünürde sağlıklı gönüllüler (n=10) ve hipotiroidi tanısı ile replasman tedavisi alan (n=10) hastalar dâhil edilmiş ve her kişiden aynı gün içinde üçer defa kan alınmıştır. Örnekler, flebotomi zamanı esas alınarak sabah 8.00-9.00 arasında toplananlar "Grup A", öğlen 11.00-12.00 arasında toplananlar "Grup B" ve öğleden sonra 15.00-16.00 saatleri arasında toplananlar "Grup C" olarak adlandırılmıştır. Serum TSH ve fT4 düzeyleri, Roche Hitachi e170 cihazında immunoassay yöntemi ile çalışılmıştır.

Bulgular: Görünürde sağlıklı kişilerde TSH testinin Grup A ile Grup B değişimi %29,9, Grup A ile Grup C değişimi %32,2 ve Grup B ile Grup C değişimi %10,6 bulundu. Görünürde sağlıklı kişilerde fT4 testinin değişimi tüm gruplarda %10'un altında bulundu. Replasman tedavisi alan kişilerde TSH testinin Grup A ile Grup B değişimi %27,4, Grup A ile Grup C değişimi %30,2 ve Grup B ile Grup C değişimi %10,1; replasman tedavili kişilerde fT4 testinin değişimi ise sadece Grup A ile B arasında %10'un üzerinde %13 bulundu.

Sonuç: Tiroid hastalıklarının tanı ve tedavisinde en sık kullanılan test olan TSH, gün içerisinde sirkadiyen ritim göstermekte ve hastadan örneğin alındığı saat önem arz etmektedir. TSH testinin sabah saat 8.00-9.00'da alınan örneklerin sonucunun daha yüksek olduğu ancak fT4 sonuçlarının saatler arasında klinik olarak önemli oranda değişmediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: fT4; preanalitik evre; sirkadiyen ritim; TSH

Belkız Öngen İpek : <https://orcid.org/0000-0002-2998-263X>
Mustafa Erinç Sitar : <https://orcid.org/0000-0001-5114-8660>

Yazışma adresi: Belkız Öngen İpek
Maltepe Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya
AD, İstanbul, Türkiye
e-mail: belkiz.ongen@maltepe.edu.tr

ABSTRACT

Aim: Thyroid hormone tests show circadian rhythm. In this study we investigated the changes of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and free Thyroxine (fT4) test results in apparently healthy individuals and thyroid hormone replacement patients at different times of the day.

Material and Methods: The study included apparently healthy volunteers (n=10) and patients who received replacement therapy (n=10) with the diagnosis of hypothyroidism. Blood samples were taken from each patient three times in the same day. Samples are named based on phlebotomy time, Group A samples were collected between 8.00-9.00 am, Group B samples were collected between 11.00-12.00 am and Group C samples were collected between 15.00-16.00 pm. Serum TSH and fT4 levels were measured by immunoassay method in the Roche Hitachi e170.

Results: The change of TSH test results were found 29,9% between Group A-B, 32,2% between Group A-C and 10,6% between Group B-C in apparently healthy volunteers. The change of fT4 test results were found below 10% in all groups in apparently healthy volunteers. The change of TSH test results were found 27,4% between Group A-B, 30,2% between Group A-C, 10,1% between Group B-C in thyroid hormone replacement patients. The change of fT4 was %13 between Group A-B and below 10% in other groups in thyroid hormone replacement patients.

Conclusion: TSH which is the most commonly used test for the diagnosis and treatment of thyroid diseases, shows circadian rhythm during the day. Thus, the phlebotomy time of the sample is very important. In our study the results of the TSH test were higher in 8.00-9.00 am whereas fT4 results did not change clinically significant between the hours.

Keywords: circadian rhythm; fT4; preanalytical phase; TSH

GİRİŞ

Ünlü müzisyen Miles Davis, "Zaman en önemli değil, tek önemli şeydir" derken nasıl, nerede, ne, neden ve kim sorularına cevap arayan kaos toplumunun, öncelikle ne zaman sorusuna yönelmesi gerektiğini vurgulamaktaydı (1). Kültürel, sosyal ve ekonomik olarak modern toplum yaşamına yön veren zaman kavramının, kronobiyolojik çalışmalarla desteklenmiş somut bilimsel verilere dayanan sonuçlar açığa çıkardığı ve her geçen gün bilim insanlarının merakını cezbediği bilinmektedir. Rutin klinik biyokimya pratiğinde de zaman kavramının laboratuvar sonuçlarında nasıl etkiler yarattığı ve bunların hasta tanı, takip ve prognozunda ne derecede etkin olduğuna yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Tıbbi laboratuvar hizmetinde karşılaşılan en ciddi sorunlar, hastaların veya sağlık profesyonellerinin flebotomi öncesi preanalitik dönemde hasta hazırlığında sergilediği ya da bizzat hasta kökenli değişkenlerden dolayı oluşmaktadır (2). Mevcut çalışmada amaç, preanalitik varyasyonlardan en önemlilerinden biri olan örnek alma "zaman"ı ve tiroid fonksiyon testleri

sonuçları arasında bir ilişki kurmak ve bu ilişki hakkında bilgi sunmaktır.

Sağlık hizmetine ulaşma süresinin giderek kısaldığı ve rutin laboratuvar hizmetlerinin giderek yaygınlaştığı günümüz modern toplumlarında, klinik veya subklinik tiroid hormon bozukluklarına oldukça sık rastlanmaktadır. Yorgunluk, üşüme, saç dökülmesi, kilo alma veya verme, kabızlık veya ishal, adet düzensizlikleri, çarpıntı gibi nonspesifik şikâyetlerle poliklinik başvurusu olduğunda, tiroid hastalıkları sıklıkla akla gelmekte ve bu yönde tiroid fonksiyonunu gösteren testler istenmektedir. Tiroid Stimulan Hormon (TSH) ve serbest T4 (fT4) tiroid fonksiyonunu gösteren, hipotiroidi ve hipertirodi tanısında ve tedavi izleminde kullanılan en sensitif testlerdir. TSH sekresyonunun sirkadiyen ritiminin olduğu ve fT4 sekresyonunu da etkilediği çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (3). Gün içi zaman dilimlerinde TSH düzeyleri 2.00-4.00 arasında en yüksek, 16.00-20.00 arasında ise en düşük seviyelere ulaşmaktadır (4). Ancak zamanlamadan bağımsız, tiroid fonksiyon testleri klinisyenler tarafından günün her saatinde istenmekte ve gün

içerisinde TSH ve fT4 değerlerinin sirkadiyen ritime bağlı olarak değişiklik gösterebildiği gerçeği görece göz ardı edilebilmektedir. Bu sorunla ilgili uluslararası çalışmalar incelendiğinde, Sviridonova ve arkadaşlarının sunduğu verilerde subklinik hipotiroidide örneklerin öğleden sonra alınması sonucunda yanlış düşük sonuç ile TSH düzeylerinin referans aralık (0,4-4,1 mU/L) içerisine girdiği gözlenmiştir (5). Bu çalışmada amacımız, görünürde sağlıklı ve tiroid hormon replasmanı alan hipotiroidi tanılı hastalarda aynı gün içerisinde sabah (saat 8.00-9.00), öğle (saat 11.00-12.00) ve öğleden sonra (saat 15.00-16.00) alınan örneklerde çalışılan TSH ve fT4 test sonuçlarının değişimini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mevcut çalışma Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (sayı no: 2018/900/67). Hastalardan ve hastane personeli olarak görev yapan görünürde sağlıklı gönüllülerden örnek alımı Maltepe Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Tüm katılımcılara flebotomi öncesi ayrıntılı açıklama yapılmıştır ve tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Çalışmaya görünürde sağlıklı (n=10) ve hipotiroidi tanısı ile replasman tedavisi alan (n=10) hastalar dahil edilmiş ve her hastadan aynı gün içinde 3'er defa kan alınmıştır. Görünürde sağlıklı grup için, 18-65 yaş arasında olma, kronik bir hastalığı bulunmama ve herhangi bir ilaç tedavisi almama çalışmaya dahil olma kriterleri olarak kullanılmıştır. Tiroid hormon replasman tedavisi alan grup ise, hipotiroidi tanısı ile levotiroksin tedavisi alan, 18-65 yaş arasında başka bir kronik hastalığı ve/veya ilaç kullanım öyküsü olmayan hastalardan oluşturulmuştur.

Örnekler, flebotomi zamanı esas alınarak sabah 8.00-9.00 arasında toplananlar "Grup A", öğlen 11.00-12.00 arasında toplananlar "Grup B" ve öğleden sonra 15.00-16.00 saatleri arasında toplananlar "Grup C" olarak adlandırılmıştır. Serum TSH ve fT4 düzeyleri, flebotomi sonrası santrifüj işlemi ardından

kısa süre içinde, Roche Hitachi e170 cihazında immünassay yöntem ile çalışılmıştır. TSH testi için gün içi CV değerleri 0,58 ve 2,4 iken günler arası CV değerleri 1,3 ve 1,33; fT4 için gün içi CV değerleri 1,22 ve 0,82 iken günler arası CV değerleri 2,82 ve 2,58 olarak ölçülmüştür.

İstatistiksel Analiz

Tüm veri analizleri SPSS ver. 21.0 programı ile yapılmıştır (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). TSH ve fT4 değerlerindeki bireysel değişimler yüzde olarak hesaplanmıştır. Yüzde değişim hesaplaması yapılırken $[100 - (\text{ikinci sonuç} \times 100 / \text{birinci sonuç})]$ formülü kullanılmıştır. Grup karşılaştırmalarında ortalama yüzde değişim %10 üzerinde ise anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar ayrıca kendi aralarında ikişerli Pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir. Her hastadan elde edilen bireysel tekrarlı ölçümlerin karşılaştırmaları için, ortalama değerlerine karşı farkların saçılım değerlendirmesi Bland Altman grafikleri ile yapılmıştır (6).

BULGULAR

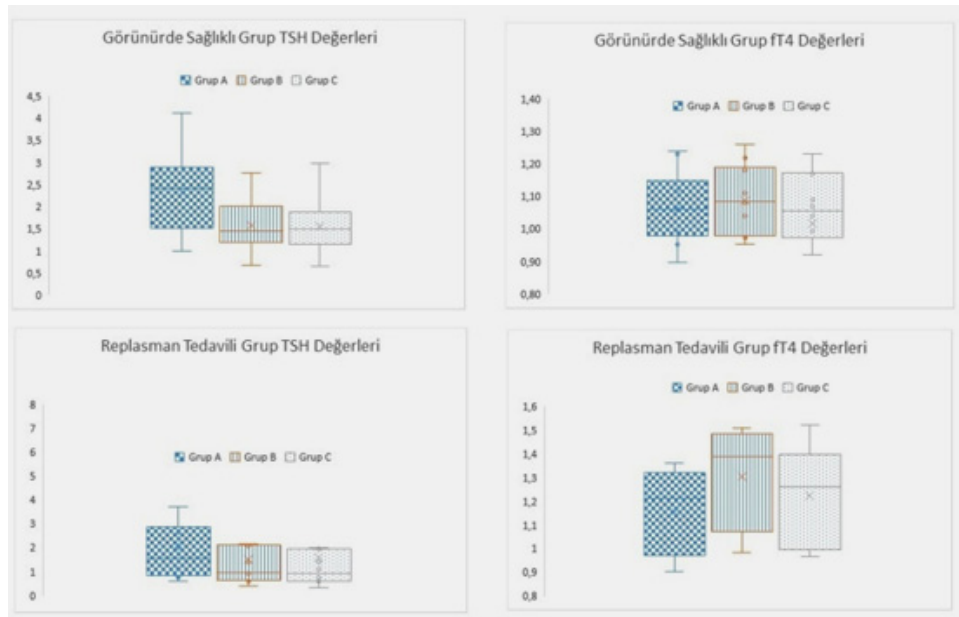
Görünürde sağlıklı kişilerin 8i kadın, 2si erkek; replasman tedavisi alan kişilerin ise 10'u kadındı. Görünürde sağlıklı bireylerde TSH testinin Grup A ile Grup B değişimi %29,9, Grup A ile Grup C değişimi %32,2 ve Grup B ile Grup C değişimi %10,6 idi (Tablo 1 ve Şekil 1). Görünürde sağlıklı kişilerde fT4 testinin değişimi tüm gruplarda %10'un altında bulundu. Replasman tedavisi alan kişilerde TSH testinin Grup A ile Grup B değişimi %27,4, Grup A ile Grup C değişimi %30,2 ve Grup B ile Grup C değişimi %10,1 idi. Replasman tedavili kişilerde fT4 testinin değişimi ise sadece Grup A ile B arasında %10'un üzerinde %13 bulundu (Tablo I ve Şekil 1). Pearson korelasyon analizinde, görünürde sağlıklı ve tiroid hormonu replasman tedavisi alan kişilerde Grup A-B, Grup A-C ve Grup B-C arasında kuvvetli ilişki (korelasyon) saptandı (tüm gruplarda $r > 0,70$) (Şekil 2). Bland Altman yöntemi ile aynı hastadan farklı zamanlarda elde edilen test sonuçlarının arasındaki farkların ortalama

malarına karşı çizilen saçılım grafikleri bir dağılım göstermekte olduğu gözlenmiştir oluşturuldu. Sonuçlarda farkların 0'ın etrafında sistematik rastgele (% 95'ten yüksek) (Şekil 3).

Tablo 1. TSH ve ft4 testlerinin, görünürde sağlıklı ve hormon replasman tedavisi altındaki kişilerde gruplar arası değişimleri

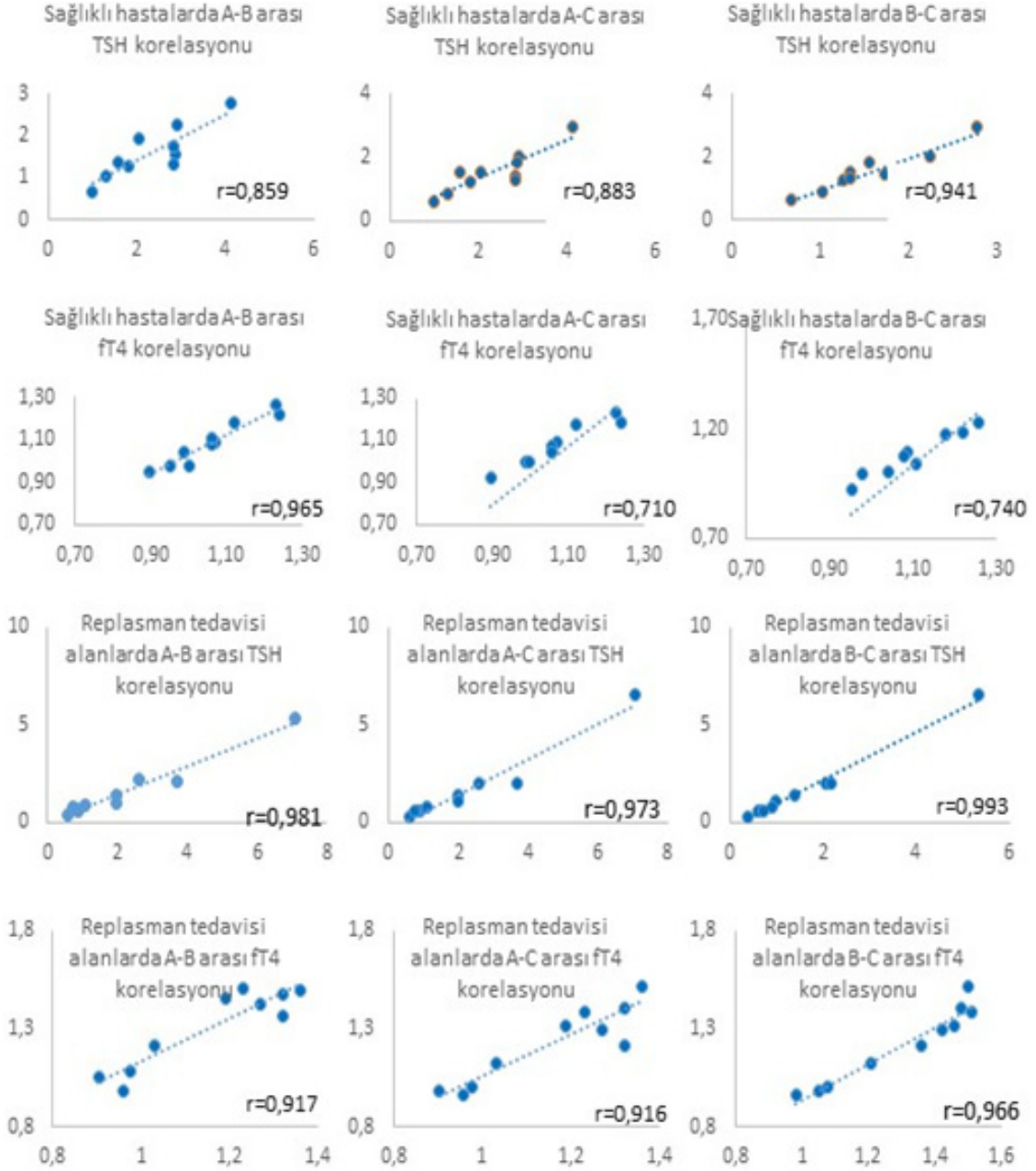
Table 1. Changes in TSH and ft4 tests between groups in apparently healthy individuals under hormone replacement therapy

	Test	Grup A ve B % Değişim	Grup A ve C % Değişim	Grup B ve C % Değişim
Görünürde sağlıklı gönüllüler	TSH	29,9	32,2	10,6
	ft4	3,4	1,6	3,0
Replasman tedavili kişiler	TSH	27,4	30,2	10,1
	ft4	13	7,3	6,5



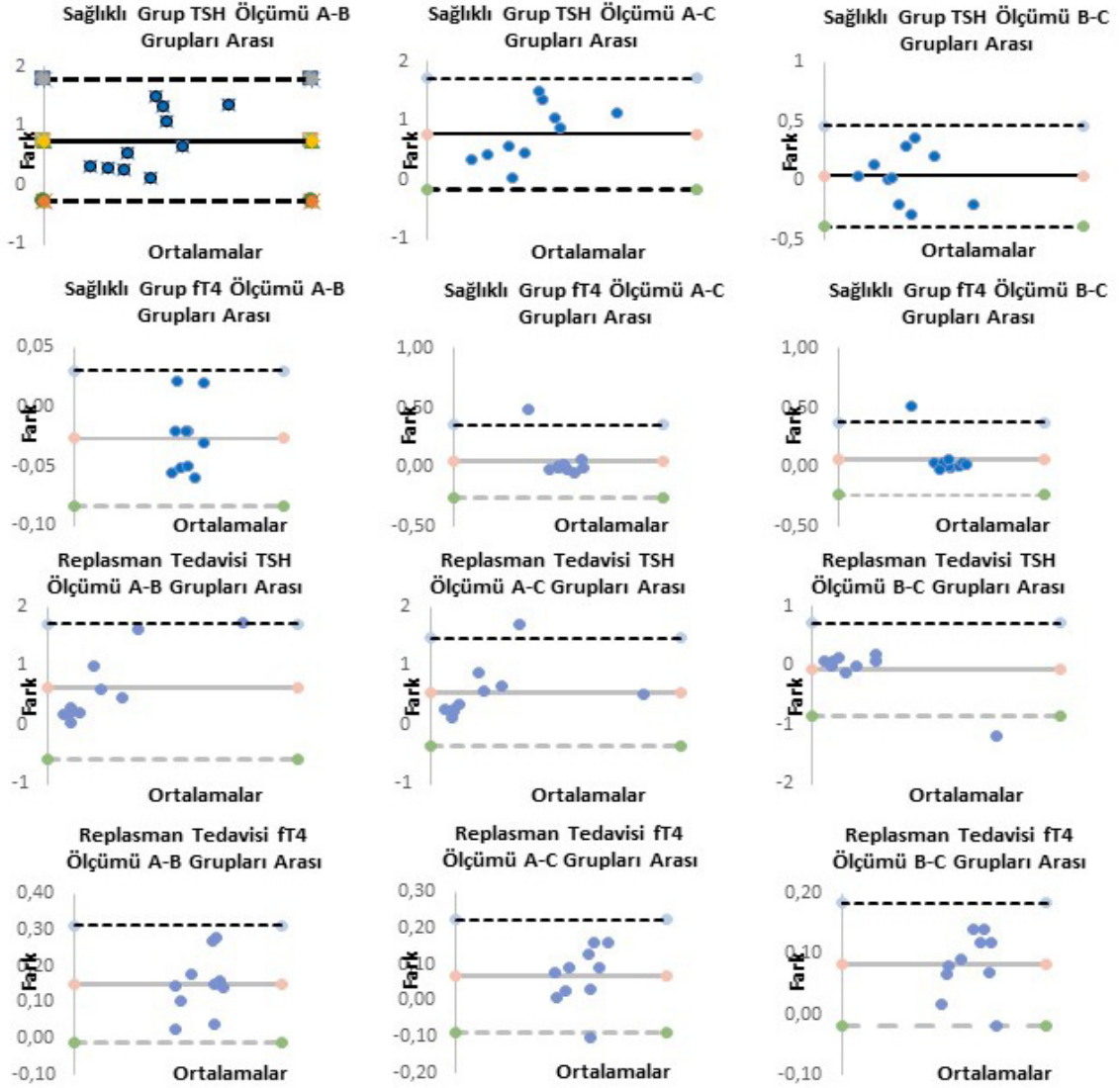
Şekil 1. TSH ve ft4 testlerinin , görünürde sağlıklı ve hormon replasman tedavisi altındaki kişilerde gruplar arası değişimleri

Figure 1. Changes in TSH and ft4 tests between groups in apparently healthy individuals under hormone replacement therapy



Şekil 2. Görünürde sağlıklı ve replasman tedavisi alanlarda TSH ve fT4 düzeylerinin gruplar arasındaki korelasyonları ve r değerleri

Figure 2. Correlations and r values of TSH and fT4 levels between groups in apparently healthy and replacement therapies



Şekil 3. Görünürde Sağlıklılarda ve tiroid hormon replasman tedavisi alanlarda TSH ve ft4 sonuçlarının Bland Altman grafikleri ile değerlendirilmesi

Figure 3. Evaluation of TSH and ft4 results in apparently healthy subjects and thyroid hormone replacement therapy by Bland Altman graphs

TARTIŞMA

Hipotiroidi ve hipertiroidi toplumda sık görülen hormonal bozukluklardır. NHANES III çalışmasında Amerikan toplumunda hipotiroidi sıklığı %4.6 (klinik hipotiroidi %0.3, subklinik hipotiroidi %4.3), hipertiroidi sıklığı ise %1.3 (klinik hipertiroidi %0.5, subklinik hipertiroidi %0.7) olarak bulunmuştur (7).

TSH ve ft4 testinin, yaş, cinsiyet, ırk, hormonal durum, hamilelik gibi değişen fizyolojik

durumlara göre referans aralıklarının belirlenmesi klinik olarak tanı koyma ve tedavi izleminde çok büyük bir önem taşır. Ehrenkranz ve ark. TSH ve ft4 için referans aralık çalışması yapmışlar ve yaş, cinsiyet, örneğin alındığı zaman, etnik köken farklılıklarına bağlı değişikliğe uğradığını bulmuşlardır (8).

Yaptığımız çalışmada görünürde sağlıklı erişkin ve tiroid hormon replasman tedavisi alan hipotiroidi tanılı kişilerde TSH testinin

sabah saat 8.00-9.00 sonuçlarının saat 11.00-12.00 ve 15.00-16.00 sonuçlarına göre anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur. Sviridonova ve ark. primer hipotiroidi tanısı olup L-tiroksin tedavisi alan ve otoimmün tiroidit nedenli subklinik hipotiroidi (SH) tanılı hastalarda serum TSH ve subklinik hipotiroidili hastalarda ayrıca fT4 ve serbest T3 (fT3) düzeylerine saat 8.00-9.00 ve 14.00-16.00 arasında ölçmüşlerdir. SH grubunda TSH düzeylerini sabah ve öğlen alınan grupta istatistiksel olarak anlamlı farklı bulmuşlar, fT4 sonuçlarında ise anlamlı farklılık bulamamışlardır. L-tiroksin tedavisi alan grupta ise TSH düzeyleri sabah ve öğlen alınan grupta istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (5).

Liyanage ve ark. 20-50 yaş arasındaki 36 sağlıklı hastada saat 8.00-9.00 ile 15.00-16.00 arasında TSH ve fT4 düzeylerine bakmışlar her iki testte de diüurnal varyasyon bulmuşlardır (3). Lucke ve ark. sirkadiyen varyasyonların TSH ve tiroid hormonları üzerine etkisini araştırmak için 5 sağlıklı erkekten örnek almışlar ve hormon seviyelerindeki günlük değişimlerin küçük olduğunu, normal aralığı geçmediğini ve bu değişikliklerin hormonların rutin testlerinde önemli olmadığını belirtmişlerdir (9).

Russell ve ark. ise 33 görünürde sağlıklı erişkinde TSH, fT3 ve fT4 testlerini 24 saat boyunca her 20 dakikada bir ölçmüşlerdir. TSH değerlerinin sirkadiyen ritiminin bulunduğunu ve saat 02.00 ile 04.00 arasında en yüksek değerlere ulaştığını, fT3'ün ise değerlerinin TSH ile korele olduğunu ancak zirve değerinin TSH artışından 90 dakika sonra görüldüğünü bulmuşlardır. fT4 değerlerinin ise TSH ile korele olmadığını ve zayıf bir

sirkadiyen ritminin olduğunu göstermişlerdir (10). Weeke ve ark. 5 sağlıklı genç erkekte her 30 dakikada bir TSH, fT3 ve fT4 düzeylerini ölçmüşler; fT3 ve TSH için senkronize diüurnal ritim bulmuşlar ancak aynı senkronizasyonu fT4 için elde edememişlerdir (11).

Bizim çalışmamızda ise fT4 düzeyi sağlıklı grupta değişiklik göstermezken, replasman tedavisi alan grupta muhtemel sabahki flebotomi sonrası hastalar levotiron tedavisi aldığı için sadece A ile B örnekleri arasında %13'lük bir artış gözlenmiştir.

Mevcut çalışmamızdaki kısıtlayıcı yönler, hasta sayısının görece az olması, kan alma zamanının gün içinde 3 defa yapılabilmesi, farklı marka cihaz veya kitlerle korelasyonun değerlendirilememesi, hamileler, çocuklar ve 65 yaş üstü geriatrik popülasyon gibi özellikli grupların dahil edilememesi olarak sıralanabilir. Ancak sonuçlar preanalitik flebotomi zamanlamasının önemini objektif olarak göstermesi ve daha geniş çaplı çalışmalara kılavuzluk etmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

SONUÇ

Tiroid hastalıklarının tanı ve tedavisinde en sık kullanılan test olan TSH, gün içerisinde sirkadiyen ritim göstermekte ve hastadan örneğin alındığı saat önem arz etmektedir. Bu çalışmada TSH sonuncunun sabah saat 8.00-9.00'da alınan örneklerin sonucunun daha yüksek olduğu ancak fT4 sonuçlarının saatler arasında klinik olarak önemli oranda değişmediği görülmüştür. Tiroid hormonlarının sirkadiyen ritminin olduğu her hastaya açıklanmalı ve tiroid fonksiyon testleri için flebotomi zamanının önemi tüm sağlık profesyonellerine vurgulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Pink DH. When: The scientific secrets of perfect timing; Penguin Press; 2019.
2. Bir A, Ghosh A, Sinha S, Banerjee A. Keywords Preanalytical Errors, Quality Indicators, Sigma Metrics, Clinical Biochemistry, Laboratory. Quality indicators are effective to monitor the performance level of preanalytical phase-a study in a clinical laboratory of Eastern India. 2018(97414).
3. Liyanage Y, Siriwardhana I, Dissanayake M, Dayanath B. Study on diurnal variation in TSH and freeT4 levels of healthy adults. Sri Lanka Journal of Diabetes Endocrinology and Metabolism. 2018;8(1).
4. Persani L, Terzolo M, Asteria C, Orlandi F, Angeli A, Beck-Peccoz P. Circadian variations of thyrotropin bioactivity in normal subjects and patients with primary hypothyroidism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1995;80(9):2722-8.

5. Sviridonova MA, Fadeyev VV, Sych YP, Melnichenko GA. Clinical significance of TSH circadian variability in patients with hypothyroidism. *Endocrine research*. 2013;38(1):24-31.
6. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet (London, England)*. 1986;1(8476):307-10.
7. Hollowell JG, Staehling NW, Gunter EW, Hannon WH, Flanders WD, Spencer CA, et al. Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(2):489-99.
8. Ehrenkranz J, Bach PR, Snow GL, Schneider A, Lee JL, Ilstrup S, et al. Circadian and circannual rhythms in thyroid hormones: determining the TSH and free T4 reference intervals based upon time of day, age, and sex. *Thyroid*. 2015;25(8):954-61.
9. Lucke C, Hehrmann R, Von Mayersbach K, von Zur Mühlen A. Studies on circadian variations of plasma TSH, thyroxine and triiodothyronine in man. *European Journal of Endocrinology*. 1977;86(1):81-8.
10. Russell W, Harrison R, Smith N, Darzy K, Shalet S, Weetman A, et al. Free triiodothyronine has a distinct circadian rhythm that is delayed but parallels thyrotropin levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(6):2300-6.
11. Weeke J, Gundersen HJG. Circadian and 30 minutes variations in serum TSH and thyroid hormones in normal subjects. *European Journal of Endocrinology*. 1978;89(3):659-72.

Bir Soğuk Aglütinin Olgusu (IgG Kappa ve IgM Lambda Biklonal Gammopati)

A Case of Cold Agglutinin (IgG Kappa and IgM Lambda Biclonal Gammopathy)

Arzu Oran

Manisa Şehir Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Manisa, Türkiye

Başvuru Tarihi: 15 Ağustos 2019

Kabul Tarihi: 26 Ağustos 2019

ÖZET

Amaç: Soğuk aglütinin hastalığı, düşük ısılarda eritrosit üzerindeki polisakkarit tipi antijenlere karşı oluşan IgM tipi antikorların (nadiren IgA veya IgG) sebep olduğu nadir bir otoimmün hemolitik anemidir. Soğukta aktifleşen antikorların eritrositlerin zarında dejenerasyon ve otoagglütinasyon oluşturması sonucu eritrosit sayısı düşük, hemoglobin değeri ise eritrosit sayısı ile bağdaşmayacak derecede yüksek bulunabilir.

Olgu sunumu: Dahiliye Hematoloji polikliniğine başvuran 81 yaşında erkek hastadan istenen hemogram analizinden ölçülebilir değer alınamaması üzerine numune tüpü incelendiğinde, cıdarında gözle görülebilir aglütinasyon varlığı tespit edildi. Soğuk aglütinin hastalığı ön tanısı düşünülerek, numune 37°C benmaride 15 dakika bekletildi. Tüp içindeki aglütininlerin kaybolmasıyla tekrar cihaza verilen numunede eritrosit sayısının okunabilir düzeye gelmesi ve hemoglobin/hematokrit oranının uygun olması üzerine yapılan ölçüm doğru kabul edilerek onaylandı. İmmünifikasyon elektroforez analizi sonucunda IgG kappa ve IgM lambda biklonal gammopati saptandı. Hastanın kan grubu analizi hem oda ısısındaki hem de benmari ile ısıtılmış tüpte O Rh (+) bulundu.

Sonuç: Hemogram analizi sonuçlarında parametreler birbiri ile uyumsuz ise ve oda ısısındaki tüpte aglütinasyon gözlenildiğinde soğuk aglütinin hastalığı akla gelmeli, numune benmaride 37 °C'de bekletilmeli, zaman kaybetmeden otomatize hemogram cihazında çalışılmalıdır.

Anahtar sözcükler: soğuk aglütinin hastalığı; otoimmün hemolitik anemi; protein elektroforezi

Arzu Oran : <https://orcid.org/0000-0002-3018-5654>

Yazışma adresi: Arzu Oran
Manisa Şehir Hastanesi, Tıbbi
Biyokimya, Manisa, Türkiye
e-mail: drarzuoran@gmail.com

ABSTRACT

Background: Cold agglutinin disease; is a rare autoimmune hemolytic anemia caused by IgM antibodies (rarely IgA or IgG) against polysaccharide antigens on erythrocytes at low temperatures. As the cold activated antibodies cause degeneration and autoagglutination in the erythrocytes membrane, the erythrocyte count may be low and the hemoglobin value may be too high to be incompatible with the erythrocyte count.

Case report: A 81-year-old male patient was admitted to the Internal Medicine Hematology Clinic. Patient requested hemogram test can not be worked on otomatize hemogram analyzer. Agglutinated erythrocytes were observed when the hemogram tube was examined. Considering the prediagnosis of cold agglutinin disease, the sample was kept at 37°C for 15 minutes. Upon the observation that the agglutinins were lost in the tube, the measurement on the count of erythrocyte and the hemoglobin/hematocrit ratio were considered to be correct and confirmed. IgG kappa and IgM lambda biclonal gammopathy was detected in the immunofixation electrophoresis study. In addition, the patient's blood group analysis was performed tube at room temperature and tube bathed at 37°C for 15 minutes. O Rh (+) results were obtained in both studies.

Results: When the discordance of the parameters is noticed and the agglutination is observed in the tube at room temperature, cold agglutinin disease should be considered and the sample should be kept at 37 °C in the benmari. Then the sample should be worked on the hemogram analyzer immediately.

Keywords: Cold agglutinin disease, Autoimmune hemolytic anemia and protein electrophoresis

GİRİŞ

Otoimmün hemolitik anemiler arasında yer alan soğuk aglütinin hastalığı (SAH); eritrosit üzerindeki polisakkarit tipi antijenlere karşı oluşan IgM tipi antikorlar (nadiren IgA veya IgG) sebebi ile gelişir. Primer (idiyopatik) olabileceği gibi viral enfeksiyonlara (*Mycoplasma pneumoniae*, EBV) ya da immün sisteme ait tek bir klonun neoplastik büyümesine ikincil ortaya çıkabilir (1).

Klinikte genellikle hafif-orta derecede anemi bulgularına eşlik eden soğuğa maruziyetle akrosiyanoz, deri ülserleri gibi periferik damar tıkanıklıkları ve soğuk gıda alımını takiben ağrı gibi belirtiler görülebilir (2).

İmmün hemolitik anemilerde %95 oranında direk Coombs pozitifliği yanısıra numunenin oda ısısında yapılan periferik yaymasında eritrositlerin aglütine olduğu görülmektedir (3). Tanıda yüksek titrede soğuk aglütininlerin varlığının gösterilmesi önemlidir. Antikorların aktif olmaya devam ettiği en yüksek sıcaklık yani termal amplitüd, hastalığın laboratuvar bulgularının ortaya çıkması ile yakından ilişkilidir. Genelde 25 °C'nin altında olan bu değer arttıkça hastalığın şiddeti de artmaktadır. Bu hastalarda operasyon öncesi plazmaferez uygulanabilir. Ameliyathane ısısının ayarlanması ve operasyon sonrası hastaya uygulanacak soğuk uygulamalar da

şiddetli hemolize neden olabileceğinden dikkatli olunmalıdır. Ayrıca intravenöz sıvıların ve kanın hastaya ısıtılarak verilmesi önerilmektedir (4).

Soğukta aktifleşen antikorların eritrositlerin zarında dejenerasyon oluşturmaları ve otoagglütinasyona uğraması sonucu oluşan eritrosit kümeleri (200 fLden büyük) otomatize hemogram cihazında eritrosit olarak algılanamaz. Bu nedenle, eritrosit sayısı düşük çıkar. Farklı bir kanalda eritrositler lizise uğratarak ölçülen hemoglobin değeri eritrosit sayısı ile bağdaşmayacak derecede yüksek bulunur. Hematokrit değeri ise eritrosit sayısının MCV ile çarpımı sonucu hesaplandığından düşük bulunur. Eritrosit kümeleri genellikle lökosit olarak sayılır. Bu hastalarda hemolize bağlı olarak kan grubu yanlış saptanabilir, sonuç AB Rh (+) çıkabilir. Ya da transfüzyondan önce sağlıklı bir çapraz karşılaştırma yapılamaz (4).

Tedavide hafif semptomlu olgularda soğuğa maruziyetten kaçınma, sıcak ortamda bulunma gibi önlemler ve destek tedavileri ön plandadır. Bulgu ve belirtiler şiddetli ise veya cerrahi bir girişim planlanıyorsa plazmaferez işlemi uygulanabilmektedir. Bu hastalarda kan sayımı yapılırken de benmari ile tüpün ısıtılması, transferi ve hızlı bir şekilde ölçümün yapılması uygun bir yöntem olarak kullanılmaktadır (5).

OLGU SUNUMU

Anemi nedeniyle Manisa Şehir Hastanesi hematoloji polikliniğine başvuran 81 yaşında erkek hastadan K3-EDTA'lı tüpe alınan numune, hemogram tetkiki için merkez laboratuvarındaki SYSMEX N-1000 cihazında çalışıldı. Hemogram parametrelerinin tamamının okunamaması üzerine numune çalışması tekrarlandığında parametrelerin birbiri ile uyumsuz olduğu gözlemlendi. Numune tüpü incelendiğinde cidarında aglütinasyonların varlığı tespit edildi.

Numuneden yapılan periferik yaymada eritrositlerde kümeleşme ve anizositoz varlığı yanısıra tüp cidarında görülen aglütinasyonlardan dolayı soğuk aglütinin hastalığı düşünülerek, numune 37°C benmaride 15 dakika bekletildi. Tüp cidarındaki aglütininlerin kaybolduğunun gözlenmesi üzerine numune vakit kaybetmeden analizöre verildi.

Oda ısısındaki K3-EDTA'lı tüpte eritrosit sayısı $0.18 \times 10^6 / \mu\text{L}$, hematokrit % 1.8, MCH 511 pg ve MCHC 511g/dL, hemoglobin 9.2 g/dl, benmari usulü 37°C'de ısıtılan K3-EDTA'lı tüpte eritrosit sayısı $3.12 \times 10^6 / \mu\text{L}$, hematokrit %28.4, MCH ve MCHC ise 29.8 pg ve 32.7 g/dl, hemoglobin 9.3 g/dl olarak ölçüldü. Bu veriler olgumuzun soğuk aglütinin hastalığı ön tanısını desteklemektedir.

Eritrosit sayısındaki düzelme ve hemoglobin/hematokrit oranının uygun olması üzerine yapılan ikinci ölçüm doğru kabul edildi. Ayrıca ısıtılan tüpten yapılan periferik yay-

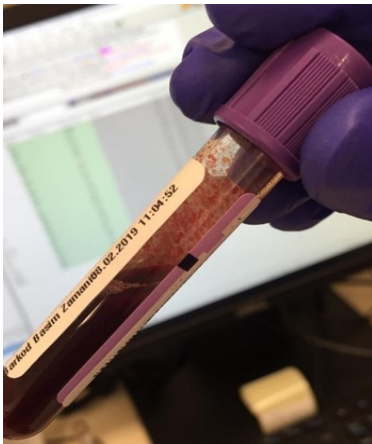
mada eritrosit kümeleşmesinin kaybolduğu ve eritrositlerin seçilebildiği gözlemlendi. İlgili hekim aranarak konu hakkında bilgi verildi. Hastanın yapılan protein elektroforezinde (PE) monoklonal gammopati, immüfiksasyon elektroforezinde (IF) ise IgG kappa ve IgM lambda biklonal gammopati saptandı. Hastanın oda ısısındaki ve benmari de 37°C'de 15 dakika bekletilmiş numunesinden yapılan kan grubu tetkikinde her iki tüpte de O Rh(+) sonucu elde edildi.

Hasta ile yapılan görüşmede, 3 yıl öncesine kadar herhangi bir şikayeti olmadığı, ancak son 3 yıldır sürekli baş ve göğüs ağrısı gibi sebepler ile hastaneye geldiği, 3 yıl içinde 3 kez koroner anjiyografi yapıldığı fakat stent takılmadığı, periferik damar tıkanıklığı sebebi ile de kalp damar cerrahisi polikliniğinde takip edildiği öğrenildi.

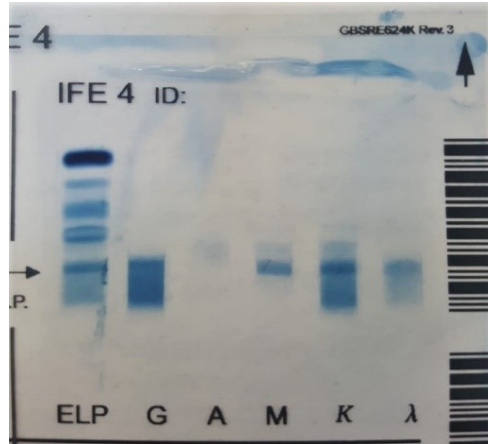
Tablo 1. Hemogram parametrelerinde oda ısısı ve 37 °C Benmari de 15 dakika bekletme sonrası

Table 1. Hemogram parameters at room temperature and tube bathed at 37°C for 15 minutes

Test Adı	Oda ısısı	Benmari (37°C) sonrası
NEU ($10^3/\mu\text{L}$)	4.44	2.72
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	0.18	3.12
HGB g/dL	9.2	9.3
HCT (%)	1.8	28.4
MCV (fL)	100	91
MCH (pg)	511	29.8
MCHC (g/dL)	511	32.7
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	459	172
RDW-CV (%)	0	17.4
RDW-SD (fL)	0	46.5



Resim 2. Protein elektroforezi
Picture 2. Protein electrophoresis



Resim 1. Tüpün oda ısısındaki görünümü
Picture 1. View of tube at room temperature



Resim 3. İmmünfiksasyon elektroforezi
Picture 3. Immunfixation electrophoresis

TARTIŞMA

SAH, eritrosit zarındaki 'I' antijenine karşı, çoğunlukla IgM yapısındaki nadiren de IgG, IgA veya κ , λ hafif zincir yapısındaki antikorlara bağlı olarak gelişir. Sağlıklı bireylerde de bu antikorlar düşük titrede bulunabilir. Antikorlar eritrosit zarındaki reseptörüne tutunarak C3b üzerinden kompleman sistemini aktive eder. C3b kaplı hücreler ağırlıklı olarak karaciğerde makrofajlar tarafından alınır ve hemolize neden olur. 2006 yılında bir klinik çalışmada primer kronik soğuk aglütinin hastalığı olan 86 hastadan yapılan IF analizinde, %90 IgM, %3.5 IgG, %3 IgA sınıfı monoklonal gammopati izlenmişken, sadece %2 biklonal IgM ve IgG tespit edilmiştir. Aynı çalışmada %94 kappa, %2.5 lambda hafif zinciri gözlenmiştir (6). Bizim olgumuzun IF analizinde nadir görülen IgG kappa ve IgM lambda biklonal gammopati tespit edildi.

Hastalığın bulgularının şiddetini ve hemolitik aneminin derecesini, serumdaki antikor konsantrasyonu ve daha da önemli olarak

termal amplitüd yani antikorların aktif olmaya devam ettiği en yüksek sıcaklık belirlemektedir (3).

Hastalığın tanısı; hemolitik anemi, retikülositoz, hiperbilirubinemi, LDH yüksekliği ve Coombs testi (+)'liğiyle konur. Antikor titresi ve termal amplitüd seviyesi önemlidir (4).

Bu hastalarda özellikle kan bankalarında kan grubunun yanlış saptanması, kanın ısıtılmadan verilmesi, ya da ameliyat sırasında ortam ısısının düşüklüğüne bağlı olarak intravasküler hemoliz gibi sıkıntılar yaşanabilmektedir. 2010 yılında Lodi ve arkadaşlarının vaka sunumunda 48 yaşındaki erkek hastada, soğuk aglütinin hastalığı nedeniyle yanlış kan grubu tayini sonucu yanlış kan transfüzyonuna bağlı komplikasyonlar bildirilmiştir (7). Olgumuzda kan grubu çalışması hem oda ısısındaki tüpte hem de ısıtılan tüpte 0 Rh(+) bulunmuştur.

Tedavide esas olan, atakların önüne geçmektir. Bu hastalara soğuk yiyeceklerden kaçınıl-

ması, sıcak tutacak giysiler kullanımı ve sıcak bölgelerde yaşanması önerilir (8). SAH'da hemoliz dalak dışında gerçekleştiğinden, tedavide splenektomi faydalı değildir (9).

SAH'da eritrosit ve hematokrit sayısı hemolize bağlı olarak düşmektedir. Soğukta aktiveleşen antikorların eritrositlerin zarında dejenerasyona neden olması ve eritrositlerin otoagglütinasyonuna bağlı olarak da MCV, özellikle de MCH ve MCHC normal değerlerin üzerinde ölçülmektedir (1,2). Olgumuzda eritrosit ve hematokrit sayısı oda ısısında yapılan ölçümde oldukça düşük bulunmuştur.

Otomatize hemogram cihazları, eritrosit zarındaki hasara bağlı olarak büyüyen, 200 fL'den büyük eritrosit kümelerini eritrosit olarak algılayamamakta, nötrofiller ile karıştırılmaktadır (1,2). Olgumuzda oda ısısındaki tüpte saptanan nötrofil sayısı, benmari ile ısıtılan tüpteki numuneye göre daha yüksek saptanmıştır. Yine hematokrit değerini otomatize cihazların MCV ve eritrosit sayı-

mından faydalanarak hesaplaması nedeniyle beklenenden daha düşük çıktığı bilinmektedir (1,2).

Olgumuzda hemogloblin değeri düşük eritrosit sayısı ile bağdaşmayacak derecede yüksek bulunmuştur (9.2 g/dl). Çünkü otomatize hemogram cihazları hemogloblini eritrositleri lizise uğratarak farklı bir kanalda ölçmektedir (1). Oda ısısındaki tüp (9.2 g/dl) ve 37°C'deki tüp (9.3 g/dl) arasında hemogloblin düzeylerinde fark bulunmadı.

Sonuç olarak, hemogram analizinde parametrelerin birbiri ile uyumsuzluğu fark edildiğinde öncelikle hemogram tüpünde aglütinasyon varlığı kontrol edilmelidir. Bu durumda soğuk aglütinin hastalığı akla gelmeli, tüp benmari'de 37°C'de bekletildikten sonra zaman kaybetmeden otomatize hemogram cihazında tekrar çalışılmalıdır. Böylece yeni numuneye gerek duyulmadan hastanın vakit kaybetmeden doğru tanı alması sağlanarak yanlış tedavilerin önüne geçilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Neff TA. Autoimmune Haemolytic Anaemias. Wintrobe's Clinical Haematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2003;1157-82.)
2. Swiecicki PL, Hegerova LT, Gertz MA. Cold agglutinin disease. Blood 2013;122(7):1114- 21.)
3. Zilow G, Kirschfink M, Roelcke D. Red cell destruction in cold agglutinin disease, Transfusion Medicine And Hemotherapy 1994 ; 21 (6) : 410 – 415)
4. Kulaksızoğlu S ve ark. , Soğuk Aglütinin hastalığında Tam Kan Sayımı, Türk Klinik Biyokimya Derg 2015; 13(2): 69-73
5. Berentsen S, Beiske K, Tjonnfjord GE. Primary chronic cold agglutinin disease: An update on the pathogenesis, clinical features and therapy. Haematology. 2007; 12(5): 361-70.
6. Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients Haematologica. 2006 Apr;91(4):460-6.
7. Lodi G, Resca D, Reverberi R. Fatal cold agglutinin-induced haemolytic anaemia: a case report. Journal of Medical Case Reports. 2010, 4:252.
8. Nydegger UE, Kazatchkine MD, Miescher PA. Immunopathologic and clinical features of hemolytic anemia due to cold agglutinins. Semin Hematol 1991;28(1):66-77.
9. Dacie JV. The Haemolytic Anaemias. In: The Autoimmune Haemolytic Anaemias. 3rd ed. Vol. 3. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1992:502-520.

Hatalı Trigliserid Yüksekliğine Neden Olan Gliserol Kontaminasyonu

Falsely Elevated Triglyceride Levels due to Glycerol Contamination

Şerif Ercan

Lüleburgaz Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Kırklareli, Türkiye

Sayın Editör,

Günlük laboratuvar işleyişi sırasında karşılaştığımız ve sistematik trigliserit yüksekliğine neden olan bir hatanın lokal bir tecrübe olarak kalmaması için bu mektupta tartışılması amaçlanmıştır.

Bu hatanın gerçekleştiği günün başlangıcında, trigliserit dahil klinik kimya analizöründe çalışılan tüm testlerin normal ve patolojik düzey iç kalite kontrol (İKK) sonuçları 2 standart sapmadan (SD) küçük bulunarak hasta numuneleri çalışmaya başlandı; ancak öğleden sonra belli bir hasta numunesinden sonraki tüm hasta numunelerinde yüksek trigliserit sonuçlarının (>400 mg/dl) elde edildiği bir durumla karşılaşıldı. Diğer yandan trigliserit haricinde test istemi yapılan hiçbir test sonucunda sistematik olarak bir düşüklük ya da yükseklik yoktu.

İlk olarak, belli bir hasta numunesinden sonra trigliserit reaktifinin kontamine olduğu düşünüldüğüne İKK çalışılması tekrarlandı ve kontrol sonuçları her iki düzey için de 10

SD'den büyük bulundu. Kontaminasyon şüphesini kuvvetlendiren bu sonucun ardından klinik kimya analizörüne (Roche Cobas 6000 c501) yeni trigliserit reaktifi yüklendi ve İKK çalışıldı. Ancak; benzer şekilde her iki düzey için de İKK sonuçları yine 10 SD'den büyük bulundu. Bunun ardından, yeni yüklenen trigliserit reaktifine kalibrasyon yapıldı; ancak kalibrasyon hatası alındı. Kalibratör ve kör numunesinin (reaktif derecesinde su) absorbansları incelendiğinde, kör numunesinin absorbansının kalibratör absorbansına yakın olduğu ve her iki absorbans değerinin de önceki absorbans değerlerinden oldukça farklı olduğu görüldü. Öyle ki, kör numunesinin absorbansının daha önceki geçerli olan kalibrasyonlardaki absorbans değerlerinden yaklaşık 10 kat, kalibratör absorbansının ise yaklaşık 5 kat daha yüksek olduğu belirlendi.

Bu bulgulara istinaden, trigliserit ölçüm yöntemi ile ilişkili reaktiften bağımsız bir kontaminasyon ihtimali ve en muhtemel neden olarak ta su arıtma sistemi düşünüldü. Gerçekten de, sistematik trigliserit yüksekli-

Şerif Ercan

: <https://orcid.org/0000-0001-9034-1404>

Yazışma adresi: Şerif Ercan

Lüleburgaz Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Kırklareli, Türkiye
e- mail: serifercan@yahoo.com.tr

ğinin gözlemlendiği zamandan yaklaşık bir saat önce su artıma sistemi bakımı yapılmıştı. Bakım formu incelendiğinde periyodik bakımlardan farklı olarak yılda bir ya da iki kez değiştirilen ters osmoz membran değişiminin yapıldığı görüldü.

Bu membran, bir poliamid ince film kompozit membrandır ve etkinliğinin artırılması için gliserol içeren solüsyonlarla ıslatılmaktadır (1). Gliserol, trigliserit ölçüm yöntemlerinde kritik öneme sahiptir. Öyle ki, trigliserit ölçüm yöntemlerinin tümü, lipoprotein lipaz enzim aktivitesi ile trigliseritin gliserole hidrolizi ile başlamaktadır (2).

Laboratuvarımızda kullanılan trigliserit ölçüm yönteminde de, trigliserit önce gliserole hidroliz olur ve oluşan gliserol ardışık iki enzimatik reaksiyon sonrasında dihidroksi-aseton fosfat ve hidrojen peroksit oksitlenir (3). Oluşan hidrojen peroksit, peroksidaz katalizörülüğünde 4 aminofenazon ve 4 klorofenol ile reaksiyona girerek kırmızı renkli bir bileşik oluşturur. Oluşan renkli bileşiğin absorbanı trigliserit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu nedenle, reaksiyon ortamının gliserole kontamine olması durumunda trigliserit mevcudiyetinden bağımsız renkli bileşik oluşumu kaçınılmazdır.

Bundan yola çıkarak, ters osmoz membranının değişimi sonrasında gliserol ile konta-

mine olmuş şekilde üretilen reaktif derecesindeki suyun yeterli miktarda atık drenajı yapılmadan analizöre verilmesi neticesinde reaksiyon hücresinin gliserole kontamine olduğu ve bu suretle hatalı trigliserit yüksekliğinin meydana geldiği düşünüldü. Nitekim su artıma sisteminde üretilen reaktif derecesindeki suyun belli bir süre (yaklaşık bir saat) analizöre verilmeden atık drenajı yapıldıktan sonra hatalı yüksek trigliserit düzeylerine sahip hasta numuneleri (n=43) tekrar çalışıldığında 575-866 mg/dl aralığında olan trigliserit değerlerinin 50-256 mg/dl aralığına düştüğü tespit edildi.

Sonuç olarak, su arıtma sistemi bakımı ve özellikle ters osmoz membran değişimi sonrasında hatalı trigliserit sonuçlarının engellenmesi için üretilen suyun yeterli miktarda atık drenajı sağlandıktan sonra analizöre verilmesi gerekli görülmektedir. Ayrıca, su arıtma sistemi bakımından sonra mutlaka iç kalite kontrol çalışması ile analitik süreç izlenmelidir.

Son olarak, günlük laboratuvar işleyişi sırasında karşılaşılan preanalitik, analitik veya postanalitik hatalar ile getirilen çözümlerin sadece söz konusu tıbbi laboratuvarın edindiği bir tecrübe olarak kalmaması için Türk Klinik Biyokimya Dergisinde paylaşımına imkan sağlayacak vaka takdimine benzer ilave bir makale türüne ihtiyaç olduğu kanaatindeyim.

KAYNAKLAR

1. Mayyahi AA. Important Approaches to Enhance Reverse Osmosis (RO) Thin Film Composite (TFC) Membranes Performance. *Membranes* 2018;8(3):E68
2. Bermes EW, Kahn SE, Young DS. Introduction to Principles of Laboratory Analyses and Safety. In: Burtis CA, Edward RA, David EB, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th Ed. Missouri: Elsevier Inc; 2006. p.3-39.
3. Roche Diagnostics Triglycerides Method Sheet 2017-11, V 12.0.

YAZARLARA BİLGİ

Türk Klinik Biyokimya Dergisi, Türk Klinik Biyokimya Derneği'nin süreli yayın organıdır ve yılda üç sayı olarak yayınlanır. Dergi, klinik biyokimya alanında yapılmış araştırma, derleme yazıları, olgu sunumları ve editöre mektupları yayınlamayı amaçlar.

Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizcedir. Türk Klinik Biyokimya Dergisi International Committee of Medical Journal Editors tarafından yayımlanan "Biyomedikal Dergilere Gönderilen Makalelerde Bulunması Gerekli Standartlara" uymaktadır (<http://www.icmje.org>). Gönderilen makaleler belirtilen standartları karşılamalıdır.

Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazıların başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere gönderilmemiş olması gerekir. Daha önce kongrede tebliğ edilmiş çalışmalar, bu durum belirtilmek koşulu ile kabul edilir. Yayın için gönderilmiş yazılarını, gecikme veya başka bir nedenle dergiden çekmek isteyenlerin bir yazı ile başvurmaları gerekir. Dergiye gönderilen yazılara telif hakkı ödenmez ve yazarlar yazının tüm yayın haklarının Türk Klinik Biyokimya Derneği'ne ait olduğunu kabul eder. Türk Klinik Biyokimya Dergisi makale başvurusu ve değerlendirilmesi için yazarlardan herhangi bir ücret talep etmez.

Yayın Kurulu yayın koşullarına uymayan yazıları yayınlamamak, düzeltmek üzere yazarına geri vermek, biçimce düzenlemek yetkisine sahiptir. Yayınlanmak üzere gönderilen yazılar en az iki danışman tarafından değerlendirildikten sonra yayınlanması uygun görülürse dergide basılır.

ETİK

Makale göndermeden önce, www.ease.org.uk/publications/author-guidelines adresinde farklı dillerde serbest ulaşılabilen *EASE kılavuzları* incelenmelidir. *Türk Klinik Biyokimya Dergisinde basılan makaleler etik kurallar çerçevesinde hazırlanmalıdır. Klinik araştırmalarda çalışma protokolü Helsinki Deklarasyonu kuralına uygun olarak hazırlanmalıdır* (<http://www.wma.net/en/30publications/10policy/es/b3/>). *Bütün çalışmalar için etik komite onayı alınmalıdır.*

Yazım Kuralları

Gönderilen yazıların işleme konulabilmesi için on-line gönderilmesi gerekmektedir. Elektronik posta ile gönderilen yazılar işleme alınmayacaktır. On-line makale gönderimi için www.tkbd.org adresinden dergi başlığına giriş yapılarak talimatlar izlenmelidir.

A. Araştırma yazıları sıra ile şu bölümlerden oluşmalıdır: Başlık sayfası, özet ve anahtar kelimeler, metin, teşekkür, kaynaklar, tablolar (her biri ayrı sayfada), şekiller için açıklamalar. Her bölüm yeni bir sayfada başlamalı ve sayfalar, başlık sayfasından başlayarak ard arda numaralandırılmalıdır.

1. Başlık sayfası: Yazının Türkçe ve İngilizce başlığı (harfler ve boşluklar dahil 90 karakterden fazla olmamak koşulu ile), yazarların soyadı, adı ve bağlı bulundukları kurum ve bölüm, tüm yazarların ORCID bilgisi (<https://orcid.org/> adresinden alınmalıdır) yazışmalardan sorumlu yazarın adı, soyadı ve tam iletişim adresi (iş adresi, telefon, GSM ve e-posta adresi) makalenin diğer sayfalarda da yer alacak olan kısa başlığı (harfler ve boşluklar dahil 40 karakterden fazla olmamak koşulu ile) ve eğer varsa araştırmayı destekleyen kurum ya da kuruluşun adı yer almalıdır. Yazı, kongrelerde sunulmuş ise bu sayfada belirtilmelidir.

2. Özet: Özet, araştırma yazıları için 250 kelimeyi aşmayacak şekilde Türkçe ve İngilizce olarak yazılmalıdır. Özet; Amaç, Gereç ve Yöntem, Bulgular ve Sonuç şeklindeki alt bölümleri içerecek şekilde düzenlenmelidir. Özetle, çalışmanın amacı, temel gereç ve yöntemler (olguların veya laboratuvar hayvanlarının seçimi, gözlemsel veya analitik yöntemler), ana bulgular (özgün veriler ve mümkünse istatistiksel anlamlılık) ve başlıca sonuçlar belirtilmeli; çalışmanın yenilik ve önem taşıyan yönleri vurgulanmalıdır. Özetle herhangi bir kısaltma kullanılmamalıdır. Anahtar kelimeler en az 2 adet olacak şekilde, Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. Kelimeler birbirlerinden noktalı virgül (;) ile ayrılmalıdır. İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)"e uygun olarak verilmelidir (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Türkçe anahtar kelimeler Türkiye Bilim Terimleri (TBT)'ne uygun olarak verilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com>).

3. Metin: Giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma bölümleri ardarda yazılabilir.

Giriş; çalışmanın amacı belirtilmelidir.

Gereç ve Yöntemler; gözlemsel veya deneysel olguların seçim (hastalar veya laboratuvar hayvanları) kriterleri açıklanmalı, yaş, cinsiyet belirtilmelidir. Yöntemler, kullanılan madde ve cihazlar (parentez içinde üretici adı ve adresi, şehir ve ülke adı olarak belirtilerek) ve yapılan işlemler diğer çalışmacıların tekrarlayabilme-

sine olanak sağlayacak şekilde açıklıkla anlatılmalıdır. Kullanılan tüm kimyasallar ve ilaçlar, jenerik isimleri, dozları ve veriliş yolu dahil, tanımlanmalıdır. Klinik ve deneysel çalışmalar için etik kurul görüşleri de bu bölümde belirtilmelidir. İstatistiksel yöntemler, gerektiğinde orijinal verilere ulaşan bir okuyucunun tekrarlayabilmesini sağlayacak şekilde ayrıntılı olarak tanımlanmalıdır. Bir genel bilgisayar programı kullanıldı ise belirtilmelidir.

Bulgular; metinde, grafiklerde ve tablolarda mantıklı bir sıra ile sunulmalıdır. Grafiklerde ve tablolarda yer alan tüm bulgular metinde tekrarlanmamalı, sadece önemli bulgular vurgulanmalı ve özetlenmelidir.

Tartışma; çalışmanın yeni ve önemli yönleri ve çıkarılan sonuçlar vurgulanmalıdır.

4. Teşekkür: Teşekkür bölümü, metnin sonuna eklenmeli ve bir paragrafı geçmemelidir.

5. Kaynaklar: Kaynaklar, metin içinde ilk kez belirtildikleri yere göre sıralanmalıdır. Kaynaklar, Arap rakamları (1, 2, 3,...) ile parantez içinde belirtilmelidir. Dergilerin isimlerinin kısaltılması, Index Medicus'ta belirtildiği şekilde yapılmalıdır. Yurt içinde yayınlanan Türkçe ve İngilizce dergilerin isimleri eğer varsa dergide belirtildiği şekilde kısaltılmalı veya tam olarak yazılmalıdır. Makalede bulunan yazar sayısı 6 veya daha az ise tüm yazarlar belirtilmeli, 7 veya daha fazla ise ilk 6 isim yazılıp "et al" eklenmelidir. Kongre bildirileri, kişisel deneyimler, basılmamış yayınlar, tezler ve internet adresleri kaynak olarak gösterilmemelidir. DOI tek kabul edilebilir on-line referans olmalıdır.

Kaynakların yazımı için örnekler (Noktalama işaretlerine dikkat edilmesi önemlidir):

Makale için: Yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, makale ismi, dergi ismi, yıl, cilt, sayı, sayfa no'su belirtilmelidir.

Örnek: Stephane A. Management of Congenital Cholesteatoma with Otoendoscopic Surgery: Case Report. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(2):803-7.

Kitap için: Yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, bölüm başlığı, editörün(lerin) ismi, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, şehir, yayınevi, yıl ve sayfalar belirtilmelidir.

Örnek: Yabancı dilde yayınlanan kitaplar için; Underwood LE, Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1079-138.

Türkçe kitaplar için; Tür A. Acil Hava Yolu Kontrolü ve Endotrakeal Entübasyon. Şahinoğlu AH, editör. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. 2. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri;2003. p.9-16.

Yazar ve editörün aynı olduğu kitaplar için; Yazar(lar)ın/editörün soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, bölüm başlığı, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, şehir, yayınevi, yıl ve sayfalar belirtilmelidir.

Örnek: Yabancı dilde yayınlanan kitaplar için; Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumors of the exocrine pancreas. Tumors of the Pancreas. 2 nd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1997. p.145-210.

Türkçe kitaplar için; Eken A. Kozmesötikler: Kozmetiklerle İlaçlar Arası Ürünler. Eken A, editör. Kozmesötik Etkin Maddeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2006. p.1-7.

6. Tablolar: Her tablo ayrı bir sayfaya çift aralıklı olarak yazılmalı ve metinde geçtiği sıraya göre Romen rakamları (I, II, III, IV,...) ile işaretlenmeli ve tablo kapsamının kısa tanımı başlık olarak konmalıdır. Açıklamalar başlıkta değil dip notta yer almalıdır. Başka kaynaklardan veri alınmış ise izin alınmalı, kaynak dip not olarak belirtilmelidir. Tablo başlığı Türkçe ve İngilizce olmalıdır.

7. Şekil ve resimler: Şekiller ve resimler konuyla doğrudan ilişkili olmalı ve metinde geçtiği sıraya göre Arap rakamları ile numaralandırılmalıdır. Daha önceden basılmış materyal veya olgu olarak alınan kişileri tanımlayan şekiller kullanılacaksa izin belgesi eklenmelidir. Şekil başlığı Türkçe ve İngilizce olmalıdır.

B. Derleme: Doğrudan veya davetli yazarlar tarafından hazırlanabilir. Toplam sayfa sayısı 15'i aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet (en fazla 100 kelime) yanısıra verilerin saptanması, seçilmesi, ayrılması ve sentez edilmesi için kullanılan yöntemleri tanımlayan bir bölüm yer almalıdır.

C. Olgu sunumu: Toplam sayfa sayısı üçü geçmemeli, Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet (en fazla 100 kelime) giriş, olgu sunumu, tartışma bölümlerini içermelidir.

D. Editöre Mektup: Daha önce yayınlanmış yazılara eleştiri ve katkı sağlamak amacı ile yazıldığından, özet içermemeli, kaynakları sınırlı olmalı, kısa ve öz olarak biçimlendirilmelidir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Journal of Turkish Clinical Biochemistry is the official journal of Turkish Society of Clinical Biochemistry and is published three times a year. The journal welcomes original research articles, reviews, case reports and letters to the editor which are written in the field of clinical biochemistry.

Official languages of the journal are Turkish and English.

Manuscripts that are already have been published or under consideration for publication should not be submitted. If the works has been presented in previous congresses it should be mentioned. In order to withdraw a submitted manuscript the authors must apply with a written requisition. There is no payment for copyright and if the manuscript is accepted to be published by signing the Copyright Transfer Agreement authors agree to transfer all the copyright of the manuscript to the Turkish Society of Clinical Biochemistry. Journal of Turkish Clinical Biochemistry does not levy any charge to the authors at any stage of the publication process.

Manuscripts that are already have been published or under consideration for publication should not be submitted. If the works has been presented in previous congresses it should be mentioned. In order to withdraw a submitted manuscript the authors must apply with a written requisition. There is no payment for copyright and if the manuscript is accepted to be published by signing the Copyright Transfer Agreement authors agree to transfer all the copyright of the manuscript to the Turkish Society of Clinical Biochemistry. Journal of Turkish Clinical Biochemistry does not levy any charge to the authors at any stage of the publication process.

Editorial board may reject or make a change in style or send the manuscript to be revised. Submitted manuscripts are sent to at least two reviewers for evaluation. Depending on reviewers' comments manuscripts are accepted to be published.

ETHICS

Before submission, the EASE Guidelines for Authors and Translators, freely available in many languages at "[www.ease.org.uk/ publications/ author-guidelines](http://www.ease.org.uk/publications/author-guidelines)" must be followed. Articles published in the Turkish Journal of Clinical Biochemistry should be prepared according to ethical rules. The protocols of clinical studies must be in accordance with the principles of "Helsinki Declaration" (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). For all the studies ethical committee approval should be taken.

MANUSCRIPT PREPARATION

All manuscripts should be submitted online at Turkish Society of Clinical Biochemistry web page (www.tkbd.org). No other form of submission is accepted.

A. Research articles: Must include title page, abstract, key words, main text, acknowledgement, references, tables and figures. Pages should be numbered starting with the title page.

1. Title Page: It should include the following information:

- full title of submission (both in Turkish and English), which should include only generic, not trade, names when describing a test, assay, etc.;
- running head of fewer than 65 characters (including spaces)
- list of all authors (first name, middle name and last name, in that order);
- names of each author's institution, an indication of each author's affiliation and ORCID number of each author (<https://orcid.org/>);
- name, address, telephone and e-mail address of the corresponding author;
- keywords (both in Turkish and English);
- any previous presentation of the manuscript;
- list of abbreviations, in order cited; and
- Research funding, financial support, or other disclosure/conflict of interest information

2. Abstract: Structured abstracts both in Turkish and English should be formatted to include separate headings of: Aim, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Structured abstracts are subject to a limit of 250 words. The purpose of the study, materials and methods (design of the study, subjects/patients, analytical methods), main findings (statistical methods, if possible), and significance of the findings should be given. New and important observations or aspects of the study should be emphasized. No abbreviations should be used in this section.

Minimum 2 maximum 6 keywords should be provided both in Turkish and English. Keywords must be separated by a semi colon (;). For English keywords authors have to use terms from the Medical Subjects Headings list from Index Medicus <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>. For Turkish keywords, authors have to use terms from Türkiye Bilim Terimleri www.bilimterimleri.com

3. Main text: The body of the paper should include; Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion.

Introduction; The nature and purpose of the work must be stated clearly.

Materials and Methods; Clinical (patients/subjects), technical or experimental (animals etc.) procedures and sampling should be concisely explained. Age, gender and inclusion criteria should be included. For method descriptions full corporate names of manufacturers of materials should be utilized.

Ethical approval of the study should be mentioned here. Description of the statistical methods must enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results.

Results; Findings should be presented in a certain flow in the main text, tables and figures. Repeat of table/figure data should be avoided in the text.

Discussion; New and important observations or aspects of the study should be emphasized.

4. Acknowledgement: Acknowledgments are limited to one separate paragraph heading labeled "Acknowledgments" and should follow the main text of the manuscript.

5. References: Citations in the text should be identified by numbers in parenthesis with Arabic numerals (1,2,3...). The list of the references at the end of the paper should be given according to their first appearance in the text, listing all authors and using journal abbreviations as listed in Index Medicus. For articles with equal to or more than seven authors, list the first six authors followed by "et al." For fewer, list all authors.

Citations of abstract books, personal communications, unpublished manuscripts in preparation or under review and web pages should not appear in the reference list. For articles from electronic publications DOI number is accepted.

**All the references should be written according to the below examples:
(Punctuation is important):**

Articles from Journals:

Stephane A. Management of Congenital Cholesteatoma with Otoendoscopic Surgery: Case Report. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010; 30(2):803-7.

Books:

Underwood LE, Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1079-138.

Tür A. Acil Hava Yolu Kontrolü ve Endotrakeal Entübasyon. Şahinoğlu AH, editör. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. 2. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri;2003. p.9-16.

Books which the author and editor is the same person:

Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumors of the exocrine pancreas. Tumors of the Pancreas. 2 nd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1997. p.145-210.

Eken A. Kozmesötikler: Kozmetiklerle İlaçlar Arası Ürünler. Eken A, editör. Kozmesötik Etken Maddeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2006. p.1-7.

6. Tables: Tables should be numbered according to their first appearance in the text with Roman numerals (I, II, III, IV,...). Each table should appear on an individual page. Table headings should uniquely display the data and not repetition of information available either in the text and must be both in Turkish and English. Place explanatory matters (including permissions for use of others' data) in footnotes.

7. Figures and illustrations: They should be those which display the data and not repetition of information available either in the text or as a table. They should be numbered according to their first appearance in the text with Arabic numerals. If there is use of previously published material or cases describing patients, a copy of signed "**Informed consent form**" should be included during the submission. Figure headings should be both in Turkish and English.

B. Reviews: The journal is open to direct reviews from authors and "invited reviews". The total number should not exceed 15 pages. The title and abstract (maximum 100 words) should be both in Turkish and English. Reviews are intended to provide comprehensive coverage of a topic, including background clinical or analytical information, the relevance and importance of the subject matter, and potential future directions.

C. Case reports: The total number should not exceed 3pages. The title and abstract (maximum 100 words) should be both in Turkish and English. They should be structured as introduction, presentation of the case and discussion.

D. Letter to the Editor: Letters are submitted directly from authors in response or contribution to published articles only. It should not include an abstract. It should be concise and should have a limited number of references.

8. The declaration of the conflict of interest should mention at the end of manuscript.