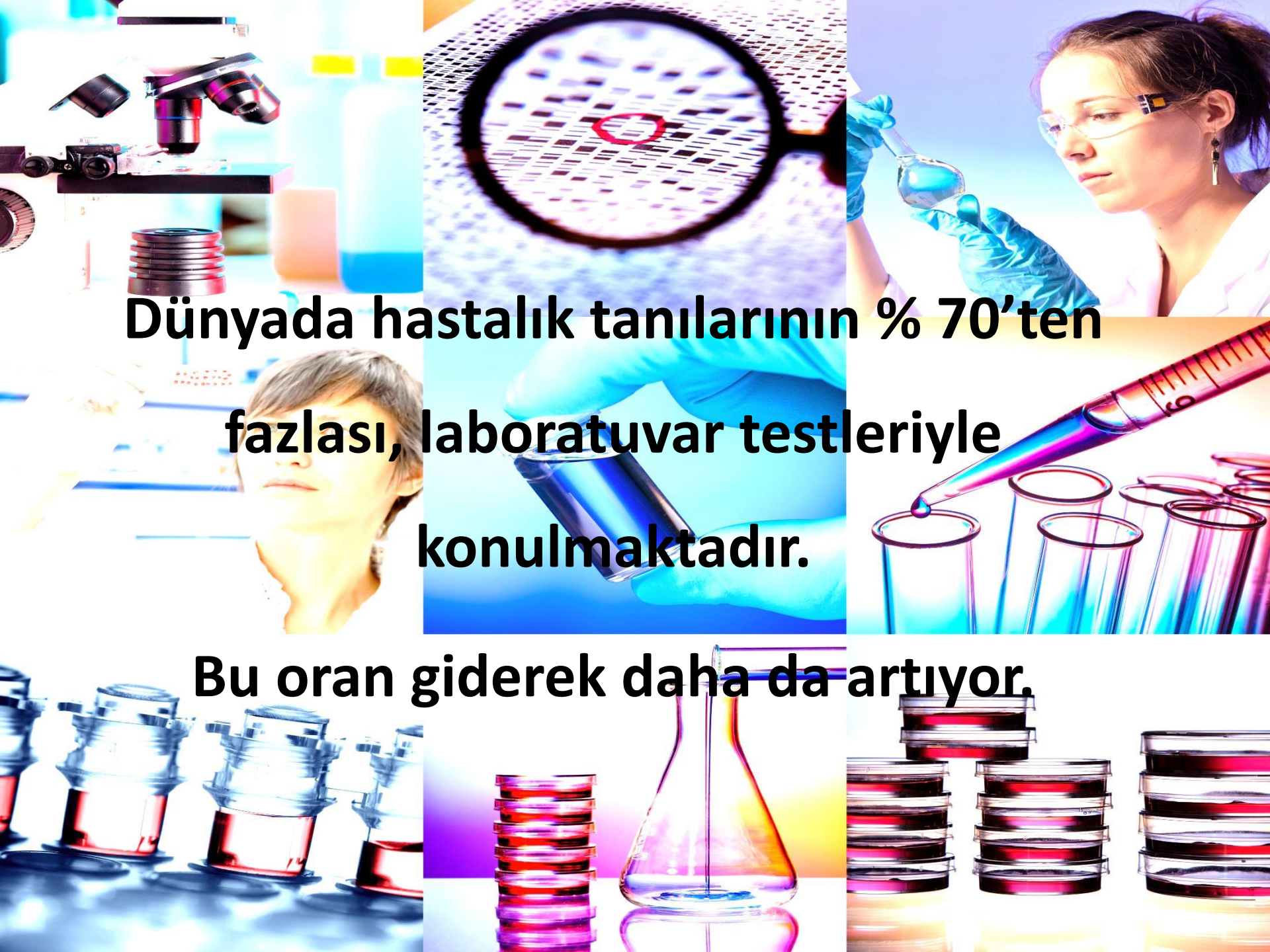


TIBBİ LABORATUVARDA BİYOLOJİK VARYASYON VE UYGULAMALARI



Prof. Dr. Ergül Belge Kurutaş
Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya AD, Kahramanmaraş





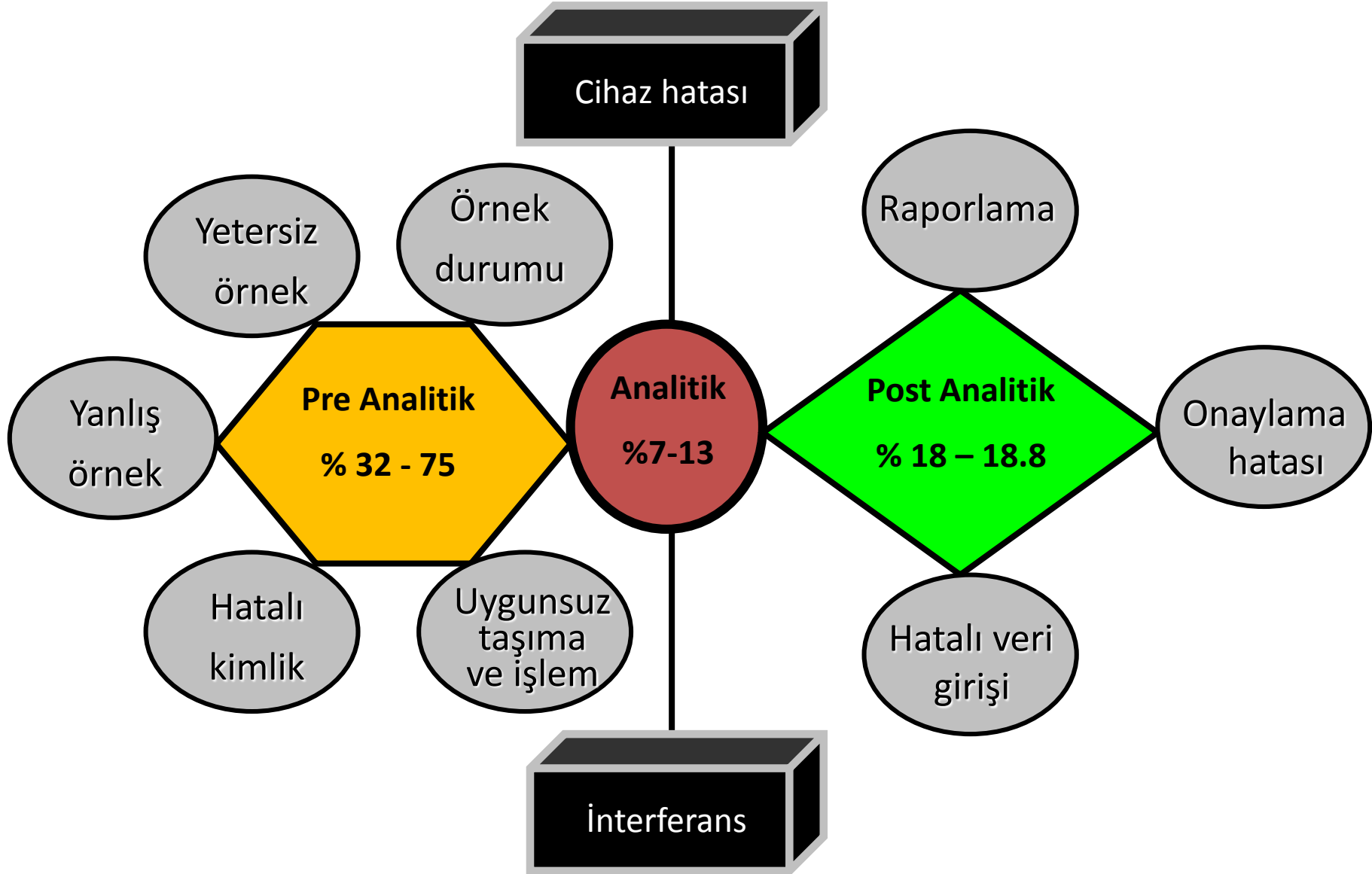
Dünyada hastalık tanılarının % 70'ten fazlası, laboratuvar testleriyle konulmaktadır.

Bu oran giderek daha da artıyor.

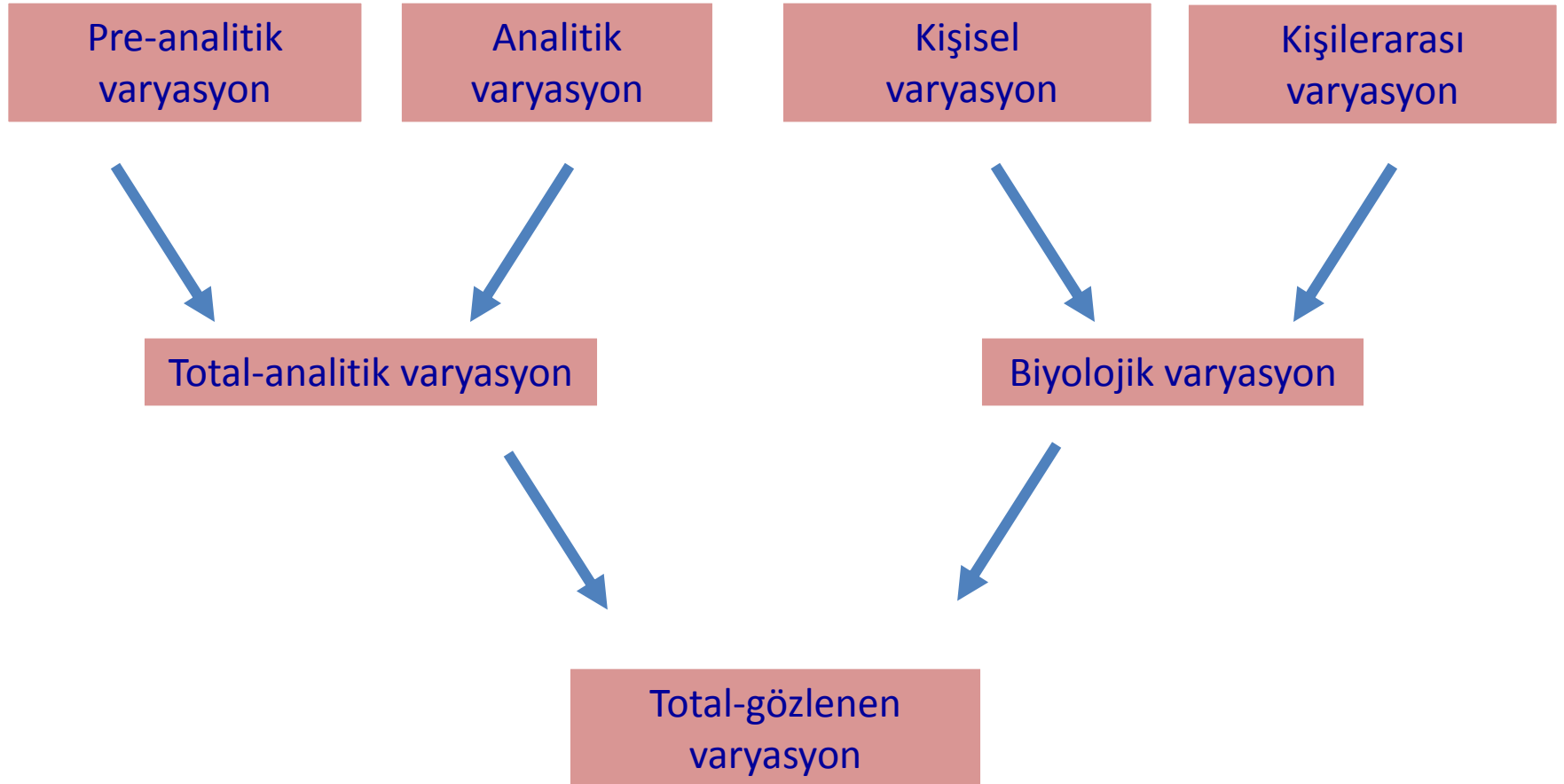
Laboratuvar testlerinin doğruluğu 3 ana faktörün etkisindedir.

- **Preeanalitik Faktörler**
- **Analitik Faktörler**
- **Postanalitik Faktörler**

Analitik ve Postanalitik hatalar kalite kontrol programları ve dikkatli çalışmalarla en aza indirilebilmektedir.



LABORATUVAR TESTLERİNDE VARYASYON KAYNAKLARI





- Laboratuvar tıbbında analitlerin ölçümünde güvenilir sonuçlar verilebilmesi için biyolojik varyasyonun hesaba katılması gerekmektedir.

- Güvenilir sonuçlar elde edebilmek için varyasyona neden olan kaynaklar en aza indirilmelidir. Bu süreç, örneklerin doğal varyasyonu hariç, ilişkili tüm laboratuvar süreçleri için mümkündür.

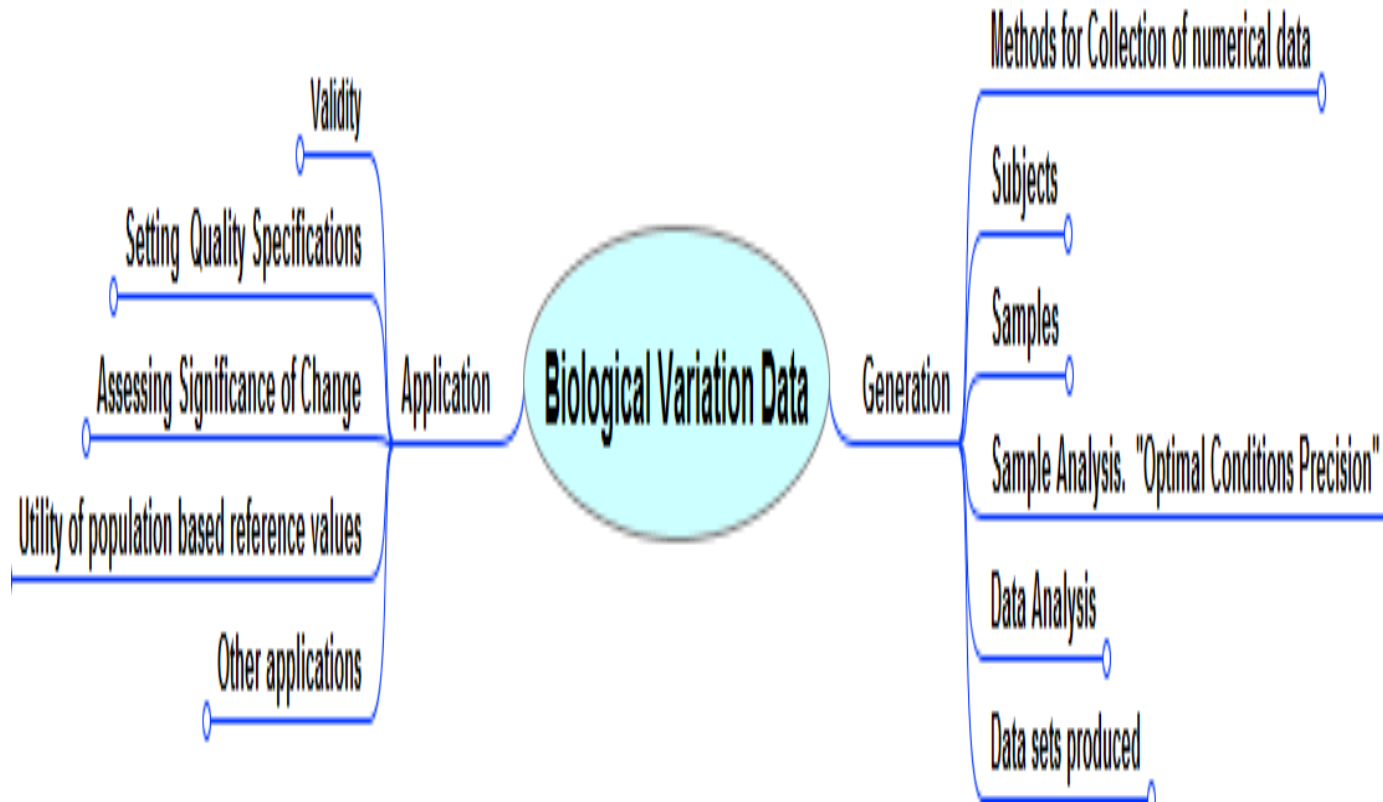
BİYOLOJİK VARYASYON

Laboratuvar verilerinde biyolojik varyasyon, bir bireyde her bir analitin homeostatik ayar noktasında izlenen rastgele dalgalanmaları olarak tanımlanır.



Biyolojik Varyasyon

- Tüm laboratuvar ölçümleri zamanla değişir.
- Analitlerin zamansal değişimleri hakkında bilgi, tanıda ve yorumlamada önemlidir.
- Zamansal değişim oranı prognozda yararlı olabilir.



BİYOLOJİK VARYASYON MODELLERİ

- Onaylanan değerler homeostatik ayar noktası etrafında rasgele dalgalanmayı gösterir.
- Daha genel model ardışık sonuçlar arasındaki korelasyonu sağlar (zaman aralıklarında ki biyolojik varyasyon).

BİYOLOJİK VARYASYONUN PRATİKTEKİ ÖNEMİ

- Bu sonuçların önemi nedir?
- Uygun analitik metot başarılı mı (tutarsızlık, doğruluk)?
- Ne zaman tekrar ölçmek gerekir?
- Bu sonuç, zaman içinde önemli ölçüde değişir mi?



TIBBİ LABORATUVAR ÖLÇÜMLERİNDE VARYASYON KOMPONENTLERİ

- **Analitik Varyasyon (CV_A)**
- **Birey-içi Biyolojik Varyasyon (CV_i)**
- **Bireyler-arası Biyolojik varyasyon (CV_G)**



BİREY-İÇİ BİYOLOJİK VARYASYON

- Yaş, cinsiyet
 - Diyet, fiziksel egzersiz
 - Patolojik durum, tedavi
- Gün-içi varyasyon, mevsimsel varyasyon
 - Homeostazis

BİREYLER-ARASI BİYOLOJİK VARYASYON

Kişiler arasında biyolojik sıvıların
komponentlerin konsantrasyonlarındaki
farklılıklar.

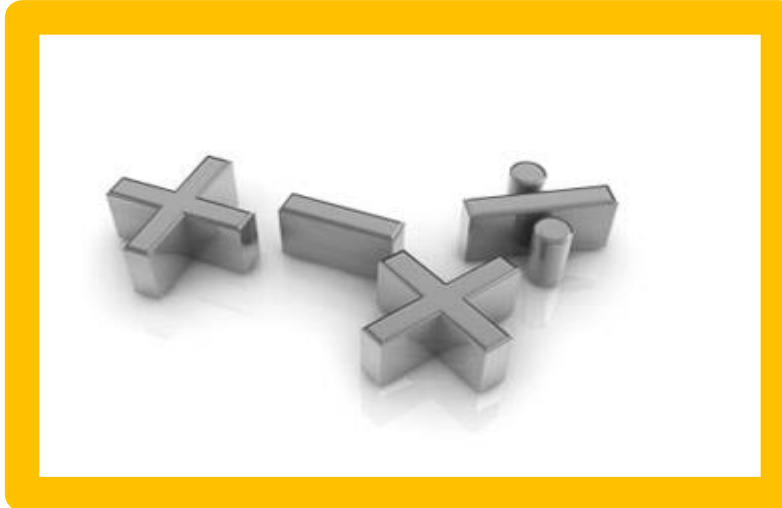


BİYOLOJİK VARYASYON ÖLÇÜMÜ

- ✓ Nasıl deney yaparsınız?
- ✓ Denek sayısı kaç olmalı?
- ✓ Toplanan örneklerin sayısı kaç olmalı?
- ✓ Çalışmanın zaman ölçeği (Kısa , Uzun)
- ✓ Analiz edilecek örneklerin analitik varyansı en aza düşürüldü mü?
- ✓ Analiz edilen örneklerin verilerinde uç değerler var mı?
- ✓ İstatistik yapıldı mı?
- ✓ Analiz sonuçlarının uygulanması.

BİYOLOJİK VARYASYON ÖLÇÜMÜ

- Çalışılan birey sayısı ve örnek sayısı çok önemli olmamakla beraber, en az 10 birey ve 5 örnek ile çalışılması önerilmektedir.



Biyolojik Varyasyon Ölçümü

- Örnekler bir günden daha kısa aralıklarla alınmamalıdır. Bu kısıtlamanın haricinde örneklemler arasındaki süre istenilen aralıklarla yapılabilir (örneğin, örnekler her gün, haftada bir veya ayda bir alınabilir).
- Birçok bilgi küçük çalışmalardan elde edilebilir.

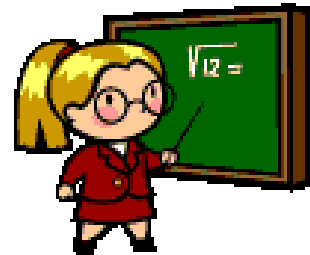
✓ Total varyasyon: pre-analitik varyasyon (SD_P) + analitik varyasyon (SD_A) + kişisel biyolojik varyasyon (SD_I)

✓ $SD_T^2 = SD_P^2 + SD_A^2 + SD_I^2$

✓ $SD_T = (SD_P^2 + SD_A^2 + SD_I^2)^{1/2}$

✓ $CV_T = (CV_P^2 + CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$

✓ $CV_T = (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$



- ✓ Varyasyonun Gaussian bir dağılımı vardır ve değerler ± 1 , ± 2 veya ± 3 SD aralığında bulunabilir.
- ✓ Ölçülen değer $\pm Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$

$$Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

BİYOLOJİK DEĞİŞİMLER

Analit	CV_{I1}	CV_{G2}	CV_{pre3}	CV_{top4}
Albumin	3.1	4.2	1.8	5.74
ALP	6.4	24.8	3.4 2	6.03
ALT	24.3	41.6	1.4	49.71
AST	11.9	17.9	3.4	22.56
Bilirubin	25.6	30.5	4.2 4	2.04
BUN	12.3	18.3	22.8	9
Kalsiyum	1.9	2.8	1.6	3.86
Kolesterol 6		15.2	1.2	16.66
CK	22.8	40	1.4	47.45
Klor	1.2	1.5	1.4	2.45
Kreatinin	4.3	12.9	2.3	13.96
GGT	13.8	41	2.3	43.87
Glukoz	6.5	7.7	3.2	11.06
Demir	26.5	23.2	2.4	37.71
K	4.8	5.6	3.1	8.35
LDH	6.6	14.7	3.4	16.80
Mg	3.6	6.4	3.1	8.17
Na	0.7	1	1.4	1.89
Fosfor	8.5	9.4	2	13.52
TProt	2.7	4	2	5.40
Trigliserit	21	37.2	1.2	44.01
ÜAsit	8.6	17.2	1.8	19.79

1 Birey içi biyolojik değişkenlik katsayısı

2 Bireylerarası-biyolojik değişkenlik katsayısı

3 Kaynaklardan elde edilen preanalitik değişkenlik katsayısı

4 $CV_{pop}^2 = CV_{pre}^2 + CVA^2 + CVI^2 + CVG^2$ ($CVA < 1/2 CVI$)

HASTALIKTA VE SAĞLIKTA KREATİNİN

State of Health	CV ₁	Number of Subjects	Length of Studies (days)	Number Samples/Sub
Healthy Median?	4.3			
CRF	5.3	17	21	8
Type 1 DM	5.9	27	56	8
Impaired renal function	6.9	9	2	11
Type 1 DM	6.5	11	56	8
Post renal transplant	11.5	41	90	8
Acute MI	13.4	20	4	19.5
CKD children	13.0	54	540	9

Within Subject Variation (CV, $\%$) for Serum Sodium and Urea

No. of subjects	Time	Sex	status	Na ⁺	Urea
11	0.5 h	m	H	0.6	2.2
11	8 h	m	H	0.5	6.0
62	1 d		H	0.6	4.8
11	2 weeks	m	H	0.7	12.3
10	4 weeks	m	H	0.9	14.3
14	8 weeks	F	H	0.5	11.3
111	15 weeks	m	H	0.6	15.7
37	22 weeks	m	H	0.5	11.1
274	6 months	-	H	0.5	11.2
15	40 weeks	-	H	0.7	13.9
9	2 d -		RF	0.8	6.5
15	6 weeks	F	HP	0.8	14.5
16	8 weeks	m	DM	0.8	13.0

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

- Şartlar pre-analitik değişkenleri en aza indirmek için olmalıdır.
- Sağlıklı bireyler olacak.
- Her zamanki yaşam biçimleri.
- Hiçbir ilaç almayacak (alkol, sigara?).
- Aynı kişi tarafından kan alınmalı.
- Günün aynı saatinde düzenli aralıklarda olmalı.
- Numunenin transportu, işlenmesi ve saklanması için protokol ayarlanmalı.

Tercih edilen protokol: Cotlove ark.

- Sağlıklı birey.
- Örnekler ayarlanan zaman aralıklarında alınır.
- Örnekler işlenmiş ve dondurulmuş olarak saklanır.
- BÜTÜN örnekler mevcuttur:
- Tek bir zaman periyodunda tüm numunelerin analizi yapılır.
- Eşzamanlı tekrarlı analiz gerçekleştirilir.
- Kalite kontrol örnekleri ile birlikte çalışılır.

- **Avantajı:** Analitik varyansı en aza düşürmek

- **Dezavantajı:**

- 1) Sınırlı sayıda hasta ve örnekler çalışabilir
- 2) Analit saklama şartlarında stabil olmalı

Diğer Protokoller: Costongs ve ark.

- Cotlove ark. gibi toplama ve saklama işlemi yapılır.
- Tek bir zaman periyodunda tüm örneklerin analizi yapılır.
- Analitik varyansı değerlendirmek için kalite kontrol veya hasta örneklerini deneylerini çift çalışma gerçekleştirilir.

- Numuneleri toplama gününde bir veya iki kez analiz yapılmalı
- **Dezavantajı:** total varyans ile birey-içi varyans karıştırılabiliyor
- **Avantajı:** Eğer örnek unstabil ise kullanışlı

VERİ ANALİZİ

2 AŞAMADA

Uç değerlerin identifikasyonu

Cochran testi –uç değerler

Reed testi –uygun olmayan bireyler

Nested varyans analizi (ANOVA)

BİYOLOJİK VARYASYON VERİ UYGULAMALARI

- Analitik hedeflerin saptanması (I, B, TEa).
- Seri sonuçlarında değişikliğinin önemi değerlendirilmesi (RDD ya da CD).
- Referans aralıkların kullanımının değerlendirilmesi (II).
- Homeostatik ayar noktalarını belirlemek için gerekli örnek sayısının değerlendirilmesi (NHSP).

Biyolojik Varyasyon Veri Uygulamaları

- Rapor değerlendirme stratejileri
- En iyi örneğin seçilmesi
- Mevcut testlerin kullanılabilirliğinin karşılaştırılması.

ANALİTİK HEDEFLERİN AYARI

Tutarsızlık (imprecision) için kabul edilen analitik hedef

$$CV_{\text{Goal}} = \frac{1}{2} CV_I$$

bundan dolayı;

$$CV_{\text{Analytical}} = CV_{\text{Goal}}$$

Başarıldığı takdirde bir bireyin analitik hedefi ($CV_{\text{Analytical}}$): $\frac{1}{4} CV_I$

(Harris. Am J Clin Pathol 1979:72;274)

ANALİTİK HEDEFLERİN KULLANIMI

- Yöntem ve ekipman değerlendirilmesi
- Yöntem geliştirmenin ilk aşamalarında ele alınmalıdır.
- Kabul Edilebilir Analitik İndeks (Index of Fidelity)

$CV_{\text{Analytical}} / CV_{\text{Goal}} = <1$ olduğunda, analitik hedef karşılanmış olur.

(Fraser Clin Chem 1988;34;995)

Ardışık Sonuçlardaki Değişikliklerin Öneminin Değerlendirilmesi

- Seri ölçümlerde sonuçların farklı olabilmesi için sonuçların nümerik farklılığının total varyasyondan büyük olması gereklidir. Bu değere kritik fark (CD) veya referans değişim değeri (RDD) denir.

$$\text{RDD} = 2^{\frac{1}{2}} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{\frac{1}{2}}$$

Olasılık = % 95 Z = 1.96

Olasılık = % 99 Z = 2.58

- **Birey -içi varyans homojen olduğunda sadece geçerlidir.**

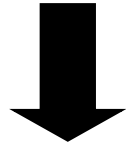
(Costongs J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:7-16)

REFERANS DEĞİŞİM DEĞERİ

- Laboratuvarların istenilen kalite değerlerine ulaşabilmesi için kullanılan formül, özellikle CV_1 'ya bağlı olduğundan RDD değeri bütün laboratuvarlar için aynıdır.
- Bu durum, sağlık durumundaki değişiklikler için, analitlerin çoğunluğunun yüksek bireysellik (birey-içi biyolojik varyasyonun bireyler-arası biyolojik varyasyondan daha düşük olması) göstermesinden ötürü RDD kavramının popülasyona dayalı referans aralıklarından daha iyi bir yaklaşım olacağı anlamına gelmektedir

63 yaşında, erkek hasta

➤ Serum kolesterol 254 mg/dL



Yaşam tarzı değişiklikleri

➤ 1 ay sonra tekrarlandığında 223 mg/dL

Bu değişim anlamlı mı?



❖ Hastamızda Kolesterol 1: 254 mg/dL

Kolesterol 2: 223 mg/dL

❖ Fark 31 mg/dL

❖ Yüzde olarak ifade edersek $(31/254) \times 100 = \%12$

❖ $Z = 1.96$ ($P < 0.05$ için) ve 2.58 ($P < 0.01$ için)

❖ $CV_A \%1.6$ ve $CV_I \%6$

❖ $(RDD) = 2^{1/2} \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$

❖ $Z=1.96$ için RDD $\%17.2$

❖ $Z=2.58$ için RDD $\%22.6$

**İKİ DEĞER BİRBİRİNDEN FARKLI
DEĞİL!**

Popülasyona Dayalı Referans Değerlerin Kullanılabilirliğinin Değerlendirilmesi

Popülasyona dayalı referans değerler bireysellik indeksi (index of individuality, II) ile adlandırılmakta olup birey-içi biyolojik varyasyonun bireyler-arası biyolojik varyasyona oranı ile belirlenir

$$II = CV_I / CV_G$$

BİREYSELLİK İNDEKSİ

- Bireysellik indeksi, test sonuçlarının referans aralık ile karşılaştırılarak değerlendirilmesinin uygunluğu hakkında bilgi veren bir parametredir.
- İndeks sonucu küçüldükçe bireysellik artar. Eğer $II < 0.6$ ise bireysellik yüksektir ve sonuçların mümkün olduğunca kişinin kendi eski sonuçlarına göre değerlendirilmesi uygundur.
- $II > 1.4$ ise sonuçların referans değerlere göre ele alınması uygun kabul edilir.

Biological variation components in urine samples of patients with T2DM or DN and healthy individuals.

	^a CV _A (%)	^b CV _{TI} (%)	^c CV _G (%)	^d I.I.	^e RCV (%)
T2DM patients					
CAT	4.27	18.09	32.07	0.56	50.10
CuZnSOD	6.25	14.45	27.03	0.53	40.02
MDA	7.16	31.39	17.28	1.81	86.95
DN patients					
CAT	3.56	15.14	29.67	0.51	41.93
CuZnSOD	5.22	8.61	24.02	0.35	23.84
MDA	8.23	25.40	16.25	1.56	70.35
Healthy Individuals					
CAT	3.51	9.08	23.48	0.38	27.92
CuZnSOD	4.00	5.60	31.08	0.18	15.51
MDA	7.23	21.00	11.96	1.50	49.86

Components of biological variation and derived parameters for oxidative stress biomarkers and LDH in mice.

Variables	^a CV _A (%)	^a CV _I (%)	^b CV _G (%)	^d RCV (%)	^e II (Category ^f)
G6PD (U/g Hb)	1.19	22.51	7.38	62.43	3.05 (High)
CAT (U/g Hb)	14.09	23.03	29.42	74.78	0.78 (intermediate)
SOD (U/g Hb)	6.18	11.12	21.14	35.23	0.52 (Low)
GST (U/g Hb)	9.13	12.00	12.58	41.76	0.95 (intermediate)
LDH (U/g Hb)	2.11	16.45	11.27	45.93	1.45 (intermediate)
GSH (μmol/g Hb)	4.12	23.40	11.20	65.81	2.08 (High)
MDA (nmol/g Hb)	4.75	9.03	31.55	28.26	0.28 (Low)

Biological variations of Xanthine oxidase and myeloperoxidase in sterile human urine

Meral Miraloglu, Ergul Belge Kurutas, Pinar Ciragil.

ABSTRACT

REFERENCES

Abstract

The analytical, intra-individual and inter-individual variations were determined for xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO) and the reference values were established. A total of 380 apparently healthy people, 177 male and 203 female (from 20 to 82 years, average 40 years old), were randomly selected from villages and cities of the southern part of Turkey. XO and MPO activities in human sterile urine samples were measured by spectrophotometric method. The distributions were Gaussian and no significant difference was observed between the male and female subjects. The mean value (standard deviation) of the population investigated for XO was 414.0 (93.3) U/L, and for MPO 104.5 (49.2) U/L, respectively. The analytical, intra-individual and interindividual variations were assessed in 20 apparently healthy subjects and were found to be; XO: 6.2 %, 21.2%, and 19.2% MPO: 4.0%, 16.4%, 11.7% respectively. The results of the index individuality showed that reference values of XO and MPO could be used for diagnostic purposes in various diseases.

Key words: Sterile urine, xanthine oxidase, myeloperoxidase, biological variations

Evaluation of reference values and biological variations for neuron – specific enolase in sterile human urine

ergul belge kurutas, Meral Miraloglu.

ABSTRACT

REFERENCES

Abstract

The analytical, intra-individual and inter-individual variations for neuron-specific enolase (NSE) were determined and the reference values were established in sterile human urine. A total 400 apparently healthy people, 192 male and 208 female (from 25 to 63 years, average 44 years old), were randomly selected from villages and cities of the southern part of Turkey. Reference values of NSE were established from this population. Furthermore, biological variations of NSE were assessed in 20 apparently healthy subjects for over thirty-day period. NSE activity in spot urines of all individual were determined by ELISA method. The mean value (standard deviation) of the population investigated for NSE was 0.496 ± 0.136 ng/mg Cr. Furthermore, the analytical, intra-individual and inter-individual variations were assessed in 20 apparently healthy subjects and were found to be; NSE: 5.0 %, 20.2% and 14.2%. The results of the index individuality showed that reference values of NSE could be used for diagnostic purposes in various diseases.

Key words: Sterile urine, neuron-specific enolase, biological variations

İstenilen analitik kalite de birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyon esas alınmalıdır. Çünkü; ;

- Modeli anlamak ve uygulamak basittir
- Biyolojik varyasyon üzerine birçok veri vardır.
- Bireyin kendi içinde ve bireyler arasındaki biyolojik varyasyon hangi coğrafyada olursa olsun sabit.
- Modelin büyük oranda pratik ve eğitici değeri vardır.

SONUÇ

Biyolojik varyasyon verileri ile

- ✓ Analitik kalite hedefleri belirlenebilir.
- ✓ Seri ölçümlerdeki farkların anlamlılığı değerlendirilir (RDD).
- ✓ Popülasyon tabanlı referans aralıklarının kullanılabilirliği değerlendirilir.
- ✓ Homeostatik karar noktasının belirlenmesi için gereken örnek sayısı belirlenir.
- ✓ Sonuçların en iyi raporlanma tarzı belirlenir.
- ✓ En iyi örnek seçilir (en düşük değişkenliği olan).
- ✓ Mevcut testler arası karşılaştırma yapılır.
- ✓ Testlerin klinik kullanılabilirliği değerlendirilir.

SABRINIZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM

