



PRATİK METOT VALİDASYONU VE VERİFİKASYONU

Doğın Yücel

**Ankara
2014**

PRATİK METOT VALIDASYONU VE VERİFİKASYONU

Doğan Yücel

1. Metot Validasyonu Nedir?

Metot Validasyonu, aslında bir **hata değerlendirme sürecidir**. Başka deyişle, metot validasyonunda analitik hatalar üzerinde yoğunlaşılır. **Hata çeşitlerinin ve bu hataların nasıl belirleneceği, bu amaçla hangi analitik işlemlerin yapılacağı ve ne kadar verinin gerekli olduğu, hangi istatistiksel işlemlerin yapılmasının gerektiği, izin verilebilir hata büyüklüğünün ne olacağı gibi sorular metot validasyonu alanına girer.**

Validasyon: CLSI ve ISO'ya göre validasyon, bir işlem, süreç, sistem, donanım ya da metodun beklendiği şekilde çalıştığını ve kullanım amacını karşıladığını kanıtlama eylemi veya sürecidir.

Verifikasyon: Validasyon sözü, **verifikasyon (doğrulama)** sözü ile iç içe geçmiştir. Verifikasyon ise, aynı kaynaklarda, **“İnceleme yoluyla ve belirlenen hedeflerin karşılandığını gösteren nesnel kanıtlar sağlanarak yapılan doğrulama işlemidir”**, şeklinde tanımlanmaktadır.

ABD’de “CLIA Final Rule”a göre “Her laboratuvar, basit serbest testler (waived test) dışında kalan herhangi bir yeni yöntem için validasyon çalışması yapmalıdır.” İki binüçten beri, bu yasaya göre tüm orta ve yüksek karmaşıklıkta test yöntemlerinin (basit testler dışındaki tüm testler) performansı laboratuvarında valide edilmelidir.

Bu yasaya göre metot validasyonu çalışmaları şunları kapsamalıdır:

Bugün tüm dünyada rutin çalışmada büyük ölçüde hazır ticari kitler kullanılmaktadır. Bu kit yöntemleri kullanılsa da, her laboratuvar hasta sonuçlarını rapor etmeden önce test sisteminin performansını doğrulamalıdır. Bu amaçla:

- Üretici tarafından konulan performans özelliklerinden aşağıdakiler yapılan çalışmalarla doğrulanmalıdır:
 - **Doğruluk (accuracy)**
 - **Kesinlik (presizyon)**
 - **Rapor aralığı**
- Üretici tarafından verilen **referans aralıklarının**, laboratuvarın hasta popülasyonu için uygun olduğu doğrulanmalıdır.

Bu amaçla yapılacak dört işlem vardır:

- Bias ya da inaccuracy'nin saptanması için **yöntem karşılaştırma**
- İmpresizyonun saptanması için **tekrarlama çalışmaları**
- Rapor aralığını saptamak için **doğrusallık çalışması**
- Referans aralığının doğrulanması için **referans değerlerin gözden geçirilmesi**. Veya laboratuvar sorumlusu tarafından üreticinin verdiği veya elkitaplarında yer alan referans değerlerin uygunluğunun belgelenmesi)

Yöntem **laboratuvarda geliştirilmiş** veya **değiştirilmişse** daha kapsamlı validasyon çalışmaları yapılır (tam validasyon):

- Doğruluk (accuracy)
- Kesinlik (presizyon)
- Analitik duyarlılık
- Analitik özgüllük (İnterferanslar da dahil)
- Rapor aralığı
- Referans aralığı
- Test performansı için gerekli diğer performans özellikleri

Bu amaçla 7 çalışma yapılır:

- Bias ya da inaccuracy'nin saptanması için **yöntem karşılaştırma**
- İmpresizyonun saptanması için **tekrarlama çalışmaları**
- Sabit interferansı belirlemek için **saptama sınırı çalışması**
- Özgüllüğün değerlendirilmesi ve potansiyel interferan maddelerin saptanması için **interferans ve geri kazanım (recovery) çalışmaları**
- Rapor aralığını saptamak için **doğrusallık (lineerite) çalışması**
- Daha **kapsamlı referans aralık çalışması**

Validasyonla ilgili diğer maddeler:

- Eğer yeterlilik test programına (veya dış kalite değerlendirme programına) girilmemişse, en az 6 ayda bir (yılda 2 kez) doğruluk değerlendirilmelidir.
- Eğer bir test birden fazla yöntemle veya farklı yerlerde yapılıyorsa, laboratuvar en az 6 ayda bir farklı cihazlarla, yöntemlerle yapılan veya farklı test bölgelerinde yürütülen test sonuçları arasındaki ilişkiyi değerlendirmelidir.

Yukarıda belirtilenler esas olarak ABD'de geçerli olmakla birlikte, Avrupa'da da benzer bir durum söz konusudur. Tıbbi laboratuvarlar için geliştirilen ISO 15189 standardında şu ifade yer almaktadır:

“5.5.1.1 Genel

Laboratuvar, kullanım amacı için valide edilmiş inceleme prosedürlerini kullanacaktır.

5.5.1.2 İnceleme prosedürlerinin verifikasyonu

Değişiklik yapılmaksızın kullanılan geçerliliği kanıtlanmış inceleme prosedürleri, rutin kullanım öncesinde laboratuvar tarafından bağımsız verifikasyona tabi tutulacaktır... Laboratuvar, verifikasyon için kullandığı işlemi ve elde edilen sonuçları kaydedecektir.

5.5.1.3 İncelem prosedürlerinin validasyonu

Laboratuvar aşağıdaki durumlarda incelem prosedürlerinin geçerliliğini kanıtlayacaktır: (a) standart olmayan yöntemler; (b) laboratuvar tarafından geliştirilen yöntemler; (c) kullanım amacı dışında kullanılan standart yöntemler; (d) geçerliliği kanıtlanmış ama sonradan değiştirilmiş yöntemler.”

Özetle, metot validasyonu / verifikasyonu tek bir ülkede değil, tüm dünyada standart bir laboratuvar uygulamasıdır, Dolayısıyla buna göre davranılmalıdır.

2. Tanım ve Terminoloji

Analit: Ölçülebilir bileşen. Herhangi bir element, iyon, bileşik, madde, faktör, enfeksiyöz ajan, hücre, organel, aktivite (enzimatik, hormonal veya immünolojik) bu kapsama girer. ISO, bu kavram için “**Measurand**” sözünü kullanmaktadır. “**Ölçümü yapılacak kantite**” olarak tanımlanmaktadır. Tüm kantiteler bu kapsama girmektedir. **Analit kavramı ise ölçümü yapılan gerçek, somut madde anlamında kullanılır.** Örnek vermek gerekirse; “plazmada glikoz madde miktarı” measurand, glikoz ise analit tanımı kapsamına girer.

İmpresizyon (kesinlik): Belli şartlar altında aynı materyalden elde edilen bağımsız ölçüm sonuçlarının dağılımıdır. Farklı çalışma şartlarına göre farklı tanımlar yapılabilir. Farklı şartlar denince zaman, kalibrasyon, operatör (teknisyen), cihaz söz konusudur. Çalışma şartlarında değişiklikler belirlenmelidir. Buna göre çalışma içi (between-run), gün içi (within-day), günler arası (between-day), cihaz içi (within-device), laboratuvar içi (within-laboratory) gibi adlandırmalar yapılır.

Ara Kesinlik (intermediate precision): Yöntem aynı, yöntem özellikleri aynı, kuruluş aynı, bazı çalışma şartları farklı olduğunda (zaman farkı, kalibrasyon farkı, çalışan farkı, cihaz ve donanım farkı gibi) elde edilen presizyon değeridir.

Doğruluk (accuracy; artık trueness, gerçeklik): Analitin gerçek değeri ile ölçülen miktar arasındaki uyumun göstergesidir. Referans değer ile numunenin sonsuz kez ölçülmesi sonucunda elde edilen ortalama arasındaki uyumdur. Gerçeklik (veya doğruluk) genellikle bias olarak ifade edilir.

Geri Kazanım (recovery): Orantılı sistematik hata saptanmasında kullanılan çalışmadır. Esas olarak ölçüm materyaline eklenen analitin saptanmasına dayanır. Yüzde (%) olarak ifade edilir. İdeal değer %100'dür; farklı bir yüzde orantılı hatanın göstergesidir.

Rapor aralığı: Cihaz, kit veya sistemin geçerli sonuç verdiği test sonuçları aralığıdır. Bugün bunun yerine **analitik ölçüm aralığı** ifadesi önerilmektedir. Bu aralıkta karşılaşılan hatalar (örneğin nonlineeriteden, impresizyondan veya başka bir nedenden kaynaklanan hatalar) kabul edilebilir sınırlardadır.

IFCC, analitik aralığı “**herhangi bir modifikasyon yapılmaksızın yöntemin uygulanabildiği konsantrasyon veya miktar aralığı**” olarak tanımlar.

College of American Pathologists (CAP) iki farklı tanım yapar:

- **Analitik Ölçüm Aralığı:** Rapor aralığı veya IFCC'nin analitik aralık tanımıyla aynıdır.
- **Klinik Olarak Rapor Edilebilen Aralık:** Burada dilüsyon veya örneğin konsantre edilmesi de dahil ön işlemler eklenerek yöntemin doğru ölçüm yapabildiği konsantrasyon veya miktar aralığı kastedilir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability): Kısa bir süre içinde aynı çalışan tarafından aynı laboratuvarında aynı yöntemle aynı materyalde aynı cihazla elde edilen bağımsız test sonuçlarıdır. Eskiden buna **çalışma içi presizyon** deniyordu. Kısacası, tekrarlanabilirlik aynı ölçüm koşullarında, aynı analitin (measurand) ard arda ölçülmesi sonucu elde edilen sonuçlar arasındaki uyumdur. Tekrarlanabilirlik en küçük rastlantısal değişkenliği verir.

Yeniden üretilebilirlik (Reproducibility): Aynı analitin farklı koşullarda art arda ölçümüdür. Aynı cihazlar kullanarak, farklı kullanıcılar tarafından farklı laboratuvarlarda aynı yöntemle elde edilen bağımsız test sonuçlarıdır. Yeniden üretilebilirlik, en yüksek rastlantısal değişkenliği verir.

Laboratuvar içi presizyon: Belirli bir sürede, belli kullanıcılarla aynı laboratuvarda aynı cihazla yapılan ölçümlerde elde edilen presizyondur. Daha önce kullanılan **total presizyon** ifadesinin yerini laboratuvar içi presizyon ifadesi almıştır.

Analitik Duyarlılık: Saptama sınırı ile karıştırılmamalıdır. Aslında saptama sınırı da analitik duyarlılığın bir bileşenidir. Analitik duyarlılık, bir analit konsantrasyonundaki küçük değişiklikleri saptayabilme yeteneğidir. Genellikle kalibrasyon eğrisinin eğimi ile ifade edilir. Genel olarak eğim ne kadar yüksek, kalibratör değerlerindeki oynama ne kadar küçükse, analit konsantrasyonundaki küçük farkların saptanması o derece güçlü olacaktır.

Saptama Sınırı: “Limit of Blank: LOB”, “Limit of Detection: LOD”, Limit of Quantitation: LOQ” gibi bileşenleri vardır.

LOB, analit içermeyen örnekten elde edilen en yüksek değerdir. Konsantrasyonu sıfır olan bir örnek (kör), tekrar tekrar çalışılır; LOB, kör değerlerinin üst güven aralığı olarak alınır. Kör değerlerinin ortalaması ve standart sapması ile hesaplanır.

LOD, belirli şartlarda kalitatif olarak varlığı saptanabilen minimum analit konsantrasyonudur. Pratik olarak kör standart sapmasının 4 ila 6 katının ortalamaya eklenmesiyle hesaplanır. Minimum saptanabilir konsantrasyon olarak da adlandırılır.

LOQ, belirli şartlarda güvenilir ve kantitatif olarak ölçülebilen minimum analit konsantrasyonudur. Ölçümün presizyonunun izin verilen hatadan düşük kaldığı minimum analit konsantrasyonudur. Bir seri düşük miktarda analit içeren numune tekrar tekrar çalışılır, istenen presizyona sahip en düşük analit konsantrasyonu LOQ’tur. LOQ değeri, LOD kadar düşük olabilir ama daha düşük olmaz.

İnterferans: Örnekte bulunan analit dışı bir bileşenin analit ölçüm sonucunun doğruluğuna etkisi olarak tanımlanmaktadır. **İnterferanslar sabit sistematik hatalara (SH) yol açarlar.** Sabit SH, genellikle interferan bir maddenin tüm örneklerde kullanılan ayıraç ile yanlış sinyal elde edilmesine yol açtığı interferanstan kaynaklanır. Bazan interferan madde analit ile ayıraçlar arasındaki reaksiyonu da etkiler. Bu tür hatalar için en sık yaşanan örnek, daha çok oksidaz/peroksidaz sisteminin kullanıldığı enzimatik yöntemlerde, ortaya çıkan hidrojen peroksidin interferan tarafından yıkılmasıdır. Bazen interferan madde ayıraç inhibe edebilir veya yıkabilir.

Ölçüm belirsizliği: Ölüm sonucuyla ilişkili olup analit (measurand) değerlerinin dağılımını karakterize eden bir parametredir. Bu parametre standart sapma (veya katları) ya da belli bir güven düzeyinde bir aralığın (interval) yarısı büyüklükte genişlik olarak ifade edilir.

3. Analitik Hata Çeşitleri ve Belirsizlik

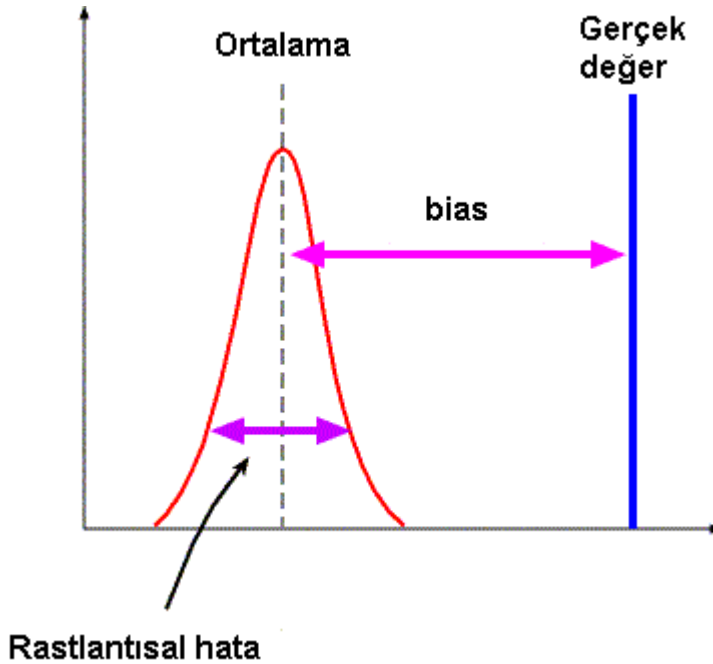
Hata kavramı içinde yer alan sözler **rastlantısal hata (RH, rastgele hata, random error veya impresizyon), sistematik hata (veya inaccuracy), sabit hata, orantılı hata ve toplam hatadır.**

RH. Büyüklüğü ve yönü önceden kestirilemeyen, pozitif veya negatif yönde olabilen hatalardır. Standart sapma (s) ile ifade edilir. Ancak, konsantrasyon arttıkça s de büyüyeceğinden, genellikle s'in ortalamaya yüzdesi olarak verilir (Varyasyon Katsayısı, %CV). Örneğin glikoz için 50 mg/dL düzeyinde 1 mg/dL s ile 400 mg/dL düzeyinde 8 mg/dL s aynı %CV'yi verir: %2

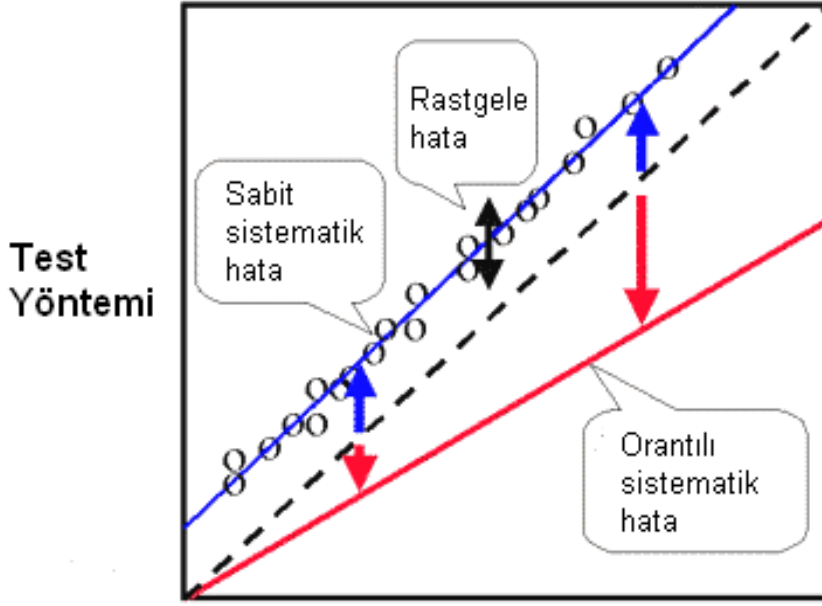
RH genel olarak cihaz kararsızlığından; sıcaklık oynamalarından; ayıraç ve kalibratör değişimlerinden, dolayısıyla kalibrasyon eğrisinin stabilitesinden; pipetleme, karıştırma ve zamanlama gibi işlemlerdeki değişimlerden; çalışanların değişiminden kaynaklanır.

Sistemik Hata (SH, inaccuracy; ISO tarafından önerilen trueness, gerçeklik). Daima aynı yönde olan hatadır. Yapılan çok sayıda ölçümün ortalaması, orijinal değerden uzaktadır. RH'nın tersine ya pozitifdir, ya da negatif. Tüm test sonuçlarının yüksek veya tüm test sonuçlarının düşük çıkmasına yol açar.

Orijinal değer ile yapılan ölçümlerin ortalaması arasındaki fark "**bias**" olarak adlandırılır. Başka deyişle, test yöntemi ile **karşılaştırma yöntemi** (comparative method) ortalamaları arasındaki fark bias'ı verir. Beklenen SH, regresyon grafiğinden de hesaplanabilir (**Yöntem Karşılaştırma**). Bunun için geniş bir konsantrasyon aralığında çok sayıda örnek hem test yöntemi, hem de karşılaştırma yöntemi ile çalışılır. Yatay eksene karşılaştırma yöntemi, dikey eksene test yöntemi işaretlenir. Elde edilen grafikten SH tipi de belirlenebilir. SH, tüm bu konsantrasyonlar boyunca aynı büyüklükteyse, bu sabit SH'dır. Veya SH konsantrasyona bağlı olarak orantılı bir şekilde değişir, buna da orantılı SH denir.



Şekil 1. Rastlantısal hata ve gerçek değere göre bias.



Karşılaştırma yöntemi

Şekil 2. Analitik hata çeşitleri. Rastlantısal hata, sistematik hata.

Genel olarak sabit SH'ların kaynağı interferanslardır, bazen yanlış kör hazırlama da sabit SH'ye yol açar. Orantılı SH'lerin kaynağı ise genellikle kalibratör değerinin doğru olmamasıdır. Eğer kalibratör değeri etiketinde yazandan yüksekse, kalibrasyon sonucunda tüm örneklerde orantılı bir düşüklük olacaktır. Veya tersine kalibratörde analiz değeri etiketinden düşükse, tüm örneklerde orantılı pozitif hata ile karşılaşılacaktır. Orantılı SH, bir miktar analitin yan reaksiyonlara uğramasından da kaynaklanabilir.

Toplam Hata (TH): RH ve SH'nin toplamıdır. RH negatif veya pozitif yönde olabildiğinden, TH için en kötü durum (en büyük hata) alınır. Genel olarak:

$$TH = SH \pm 2s$$

Bugün sistematik hata (inaccuracy), imprecizyon (rastlantısal hata) ve total hata kavramları yerine ISO tarafından önerilen ve geçerli olan sözler **gerçeklik (trueness), bias, presizyon ve belirsizlik (uncertainty)**. Burada gerçeklik, doğruluk kavramındaki bias'ın yerinin, belirsizlik ise toplam hata kavramının yerini almıştır. ISO önerileri CLSI tarafından da kabul edilmiştir. Ancak terminoloji konusunda hala tartışmalar sürmektedir.

İzin Verilen Toplam Hata (Allowable Total Error): Burada testin klinik yararı söz konusudur. **Testin klinik yararını ortadan kaldırmayacak büyüklükteki hata miktarıdır.** Laboratuvar ne kadar hatanın tıbben kabul edilebilir olduğunu belirler. Esasında yasal düzenlemelerle de hata üst sınırları verilmektedir. Örneğin CLIA'da Na için hata üst sınırı (izin verilen toplam hata) 4 mmol/L'dir.

Hata Bütçesi: Toplam hata bileşenlerinin (SH ve RH) laboratuvar tarafından ayrı ayrı değerlendirilebilmesi için hata bütçesi kavramı kullanılmaktadır. İzin verilen toplam hatanın bir bölümü SH, bir bölümü RH olarak bölünür. Önerilen hata bütçesi aralıkları SH için %25-

50 (İzin Verilen SH; Allowable Systematic Error), RH için %16-25'dir (İzin Verilen Rastlantısal Hata; Allowable Random Error).

Ölçüm Belirsizliği. Belirsizlik kavramı laboratuvar ortamına 1990'larda girmiştir. Amaç ölçüm sonuçlarının kalitesinin ifade edilmesidir. International Vocabulary of Metrology (VIM), ölçüm belirsizliğini "kullanılan bilgiye dayalı olarak kantitatif analit (measurand) değerlerinin dağılımını karakterize eden negatif olmayan bir parametre" olarak tanımlamaktadır.

Ölçüm belirsizliğinin hesaplanması gerek ISO 17025:2003 veya ISO 15189:2005'e göre akredite olacak referans laboratuvarlar için, gerekse ISO 15189:2012'ye göre akredite olacak klinik laboratuvarlar için zorunludur.

Ölçüm belirsizliğinin hesaplanması için iki yaklaşım vardır: "Aşağıdan yukarıya" ve "yukarıdan aşağıya". "Aşağıdan yukarıya" yaklaşım, Guide to the Expression of Uncertainty of Measurement (GUM) tarafından önerilen yaklaşımdır. Bu yaklaşımda tüm potansiyel belirsizlik kaynakları tanımlanır, belirsizlikleri belirlenir ve birleştirilir. Metroloji kuruluşları ve referans materyal sağlayıcılar bu yaklaşımı benimsemektedirler. Referans ölçüm prosedürleri kullanan akredite laboratuvarlarda da bu yaklaşım geçerlidir. Ancak bu yaklaşımın klinik laboratuvarlara uygulanması zordur. Alternatif olarak Magnusson ve arkadaşlarının kalite kontrol verileri ve sertifikalı referans materyallerden hesaplanan bias'ı temel alan "yukarıdan aşağıya" yaklaşım klinik laboratuvarlar için daha uygundur.

4. Analitik Hata Hedeflerinin Belirlenmesi

Toplam analitik hata sınırlarının belirlenmesi için pek çok kaynak kullanılabilir. Bunların başında tıbbi testlerin tıbbi kullanımı alanında laboratuvar deneyimi ve klinik deneyim gelir. Klinisyenlerin yaptıkları geniş kapsamlı araştırmalar da önemlidir. Ayrıca biyolojik varyasyon verileri, özellikle bireysel biyolojik varyasyon, referans aralığın belli bir fraksiyonu, yöntemin genel performansı da hata sınırlarının belirlenmesinde kullanılır. Tüm dünyada kabul edilip uygulanabilir olan sınırlar yoktur. Bu sınırlar sağlık kuruluşunun tıbbi misyonuna, hasta popülasyonuna, klinisyenin testi nasıl yorumlayacağına göre değişebilir. Dolayısıyla hedefler laboratuvardan laboratuvara, hatta uygulamadan uygulamaya değişir. Örneğin, böbrek transplant hastalarının izlenmesinde kullanılan bir kreatinin yöntemi, genel sağlık taraması amacıyla kullanılan bir kreatinin yönteminden daha sıkı hedefler gerektirebilir.

Literatürde analitik hedeflerin konulmasında başı çeken, 1960'lardan başlayarak Barnett olmuştur (Barnett RN. Am J Clin Pathol 1968;50:671-676). Barnett, daha sonra bu yöndeki çalışmalarına Skendzel ve Platt ile devam etmiştir (Skendzel LP, Barnett RN, Platt R. Am J Clin Pathol 1985;83:200-205). Avrupa'da başını Fraser'in çektiği bir grup, minimum, istenen ve optimum yöntem performansı için biyolojik varyasyon verilerini kullanmıştır (Fraser CG, Petersen PH, Libeer J, Ricos C. Ann Clin Biochem 1997;34:8-12). Bu gruba göre istenen presizyon bireysel biyolojik varyasyonun yarısından küçük olmalıdır veya güvenilir veriler oluşana dek en iyi %20 laboratuvarın performansı hedef konulur. Bias için önerilen hedef ise grup biyolojik varyasyonunun 1/4'inden küçük olması veya referans aralığın 1/16'sından küçük olması ya da başka ölçüt yoksa, en fazla ideal presizyonun 2 katı olmasıdır.

Bu farklı sistematik hata ve rastlantısal hata sınırlarının toplam hata sınırlarına dönüştürülmesi gerekir. Nitekim, CLIA, yöntem ve laboartuvarın değerlendirilmesinde toplam hata sınırlarını verir. Bu sınırlar, ABD’de kullanılan toplam izin verilen hata sınırlarını oluşturur. Dolayısıyla yöntem performansı bu sınırı karşılamalı, yöntemin toplam hatası bu sınırın altında kalmalıdır. Ancak, yöntemin performansı CLIA toplam hata sınırlarının çok daha altında olmalıdır. Bu yüzden Ehrmeyer ve arkadaşları aslında bias ve CV için CLIA sınırlarının 1/3’ünün alınmasını önermişlerdir (Ehrmeyer SS; Laessig RH, Leinweber JE, et al. Clin Chem 1990; 36:1736-1740). Burnett ve Westgard ise CV’nin CLIA toplam hata sınırının ¼’ini geçmemesi gerektiğini savunurlar (Burnett RW, Westgard JO. Arch Pathol Lab Med 1992;116:777-780).

Ülkemizde dış kalite değerlendirme verilerinden hareketle belirlenen ve 2016 yılında yayımlanan bir genelgede en sık kullanılan 15 test için izin verilen toplam hata sınırları belirlenmiştir. Bu veriler Tablo 1’de verilmektedir (Genelge 2016/18).

5. Metot Validasyonu Çalışmalarının Planlanması

Yöntem ifadesi sadece yöntemi değil, kullanılan cihazı da kapsar. Dolayısıyla yöntem değerlendirme, aynı zamanda cihaz değerlendirmedir. İkisi bir bütündür.

Tablo 1. Türkiye’de İzin Verilen Hata Sınırları (Genelge 2016/18)

SUT* Kodu	SUT Adı	İzin Verilen Toplam Analitik Hata Sınırı (%)	İzin Verilen En Yüksek Varyasyon Katsayısı (%CV)
900.200	Alanin aminotransferaz (ALT)	20	10
900.210	Albümin	15	7.5
900.340	Alkalen fosfataz	30	10
900.580	Aspartat transaminaz (AST)	20	10
901.500	Glikoz	11	5
901.580	HDL kolesterol	30	10
901.940	Kan üre azotu (BUN)	15	7.5
902.090	Klorür (Cl)	9	5
902.110	Kolesterol	11	5
902.210	Kreatinin	20	10
902.260	Laktik Dehidrogenaz (LDH)	21	10
903.130	Potasyum	9	5
903.240	Protein (serum ve vucut sıvıları, herbiri)	15	7.5
903.670	Sodyum (serum ve vücut sıvılarında, herbiri)	9	5
903.990	Trigliserid	15	7.5

*SUT: Sağlık Uygulama Tebliği

Metot Validasyonu çalışmalarına başlamadan önce çalışanlar metod prosedürü, kalibratör, kontrol ve ayıraçların stabilitesi, yöntemin çalışacağı konsantrasyon aralığı konusunda bilgi sahibi olmalıdır. Burada özellikle kalibratör ve ayıraç kararlılığı önemlidir. Taze ayıraçlarla eski kalibratörler esas alınarak ve sonra yeni kalibrasyon esas alınarak çalışmalar yapılır ve aralarındaki fark incelenir. Ayıraç kararlılığını görmek için taze kalibratörlerle yeni bir kalibrasyon yapılarak eski ve yeni ayıraçlarla çalışılır, aradaki fark incelenir.

Metot validasyonu çalışmalarında daha sonra bir **strateji** çizilir (Tablo 2). Bu amaçla:

- Yapılacak deneysel çalışmalar belirlenir
- Hata tipleri belirlenir
- Hata büyüklüğü tanımlanır
- Hata tipleri birleştirilerek TH elde edilir
- Hata, izin verilen hata ile kıyaslanır
- **Karar:** Yöntemin kabul edilebilir veya edilemez olduğuna karar verilir.

Önce kolay çalışmalar yapılır. Bu ön çalışmalar kabul edilebilir durumdaysa daha ileri, zaman alıcı ve pahalı işlemlere girilir.

6. Metot Validasyonu Uygulamaları

6.1. RH'nın Saptanması İçin Tekrarlama Çalışmaları

Çalışma içi tekrarlar çalışması en basit RH saptama çalışmasıdır. Bu yüzden en önce yapılmalıdır. Ancak çalışma içi tekrarlar çalışmasının sonuçları yöntemin uzun vadeli performansı olarak görülemez.

Tekrarlar çalışmasında kullanılacak materyalin matriksi mümkün olduğunca hasta numunelerinin matriksine benzemelidir.

Çalışılacak konsantrasyonlar tıbbi karar düzeylerinde veya bu düzeylere yakın olmalıdır.

Tablo 2. Metot Validasyonu Çalışmalarında Stratejik Yaklaşım

Analitik Hata Tipi	Çalışma	
	Ön Çalışma	Kapsamlı Çalışma
Rastlantısal Hata	Çalışma içi ardışık ölçüm Saf materyalde Gerçek örneklerde	Çalışmalar arası tekrarlayan ölçümler Gerçek örneklerde
Sabit hata	İnterferans	Yöntem karşılaştırma
Orantılı hata	Geri kazanım	
Diğer sistematik hatalar	Doğrusallık (Lineerite) Saptama sınırı (LOD)	

İki veya üç materyal gerekir. Örneğin kolesterol için NCEP tarafından 200 mg/dL ve 240 mg/dL gibi değerler önerilmektedir. Glikoz için hipoglisemi açısından 50 mg/dL, açlık örneği için 120 mg/dL, GTT'de 160 mg/dL, diyabetin izlenmesi açısından ise 300 mg/dL gibi değerler tıbbi açıdan önemli düzeylerdir.

Genellikle 20 ölçüm yapılması gerekir. Sayı arttığı ölçüde RH daha sağlıklı belirlenir. Eğer çalışma içi tekrarlar çalışması sonuçları kabul edilebilir değilse, daha ileri çalışmaya gerek yoktur.

Standart çözeltileri ile de tekrarlar çalışması yapılabilir. Standart çözeltileri protein ve diğer bileşenleri içermediğinden, rastlantısal hatanın çok daha düşük olması beklenir.

Ticari kontrol materyalleri de kullanılabilir. Bunlar da işlem görmüş olduklarından

(liyofilizasyon, hazırlama vb.) hasta serumu ile aynı matriste değildir.

Hasta numunelerinden havuz hazırlamanın dezavantajı ise enfeksiyon riskidir.

Çalışma içi ve gün içi tekrarlar çalışmalarında taze hasta serumu havuzları kullanılabilir.

Westgard, çalışma içi ve gün içi RH için elde edilen s'lerin total izin verilen analitik hatanın ¼'ünden küçük olmasını önerir.

S_{çalışma içi} ve S_{gün içi} <0.25 TEa

Uzun vadeli değerlendirme için Westgard total (laboratuvar içi) RH'nın TEa'nın 1/3'ünden düşük olmasını önerir.

S_{toplam} <0.33 TEa

Kit prospektüsünde verilen tekrarlanabilirlik sonuçlarının da doğrulanması gerekir. Bunun için F testi kullanılır. Örneğin kolesterol kiti için firma 3 mg/dL gibi bir değer vermişse ve bunun için 31 kez ölçüm yaptığını belirtiyorsa (n = 31), laboratuvarında yakın konsantrasyondaki kontrol materyalinde 21 kez ölçüm yapılınsın ve sonuçta s = 4 mg/dL bulunsun. Bu verilere F testi uygulanır. F testinde büyük varyans küçük varyansa bölünür ve elde edilen F değeri F tablosundaki F değeri ile karşılaştırılır. Buna göre:

$$F = (4)^2 / (3)^2 = 16/9 = 1.78$$

Bu değer, 30 ve 20 serbestlik derecesinde F tablosundan elde edilen 1.93 F değerinden düşüktür. O halde firmanın verdiği RH değeri geçerlidir.

Gerekli minimum çalışma prosedürü için düşük ve yüksek tıbbi karar düzeyinde en az 2 farklı kontrol materyali gerekir. Kısa vadeli RH için her bir materyal çalışma içi veya gün içinde 20 kez çalışılır. Ortalama, s ve %CV hesaplanır. Daha ileri çalışmaya geçmeden önce kısa vadeli RH açısından yöntem yeterli mi karar verilir. Yeterliyse, uzun süreli RH'nın saptanması için her iki materyal de 20 farklı gün çalışılır. Aynı şekilde ortalama, s ve %CV belirlenerek kabul edilebilir sınırlar içinde mi, incelenir.

CLSI standartlarında ANOVA kullanılır. **EP5** protokolü üretici firmalar için, **EP15** protokolü doğrulamak amaçlı olup laboratuvarlar içindir. EP15'de günde minimum 3 tekrar yapılır ve bu işlem 5 farklı gün sürdürülerek toplam 15 sonuç elde edilir. Total imprecizyon için çalışma

içi ve çalışmalar arası bileşenler kombine edilerek total impresizyon (artık laboratuvar içi impresizyon) elde edilir. **EP5A**'da en az 20 farklı günde, her gün bir veya iki çalışma olacak şekilde ve her çalışma çift çalışılarak yürütülür. Bu verilerden çalışma içi, gün içi ve günler arası s'ler hesaplanır; bu s'ler kombine edilerek laboratuvar içi s hesaplanır.

$$S_{\text{total}} = \sqrt{(S_{\text{ç.içi}}^2 + S_{\text{g.içi}}^2 + S_{\text{g.arası}}^2)}$$

CLSI protokollerine dayanan EP Evaluator istatistik programında RH için iki farklı uygulama vardır: **Basit Presizyon** ve **Karmaşık Presizyon**.

Basit Presizyonda, bir kontrol materyalinin günlük yapılan iç kalite kontrol sonuçlarının 1 aylık değerleri üzerinden ortalama, s ve CV hesaplanır. Burada izin verilen RH'nın da girilmesi istenir.

Karmaşık Presizyonda ön veriler için 8 ila 20 sonucun girilmesi istenir. Bu aşama dışlanacak verilerin (outliers) saptanması içindir ve opsiyoneldir ama önerilir. **EP5** standardı için gereklidir de. **Karmaşık presizyon modülünde günde 2 çalışma ve her çalışma çift olmak üzere 20 günlük veri istenir.** Çalışma içi, çalışmalar arası, günler arası ve total presizyon verileri hesaplanır. Çalışma içi ve total presizyon verileri girilen RH değerinin %95 sınırını geçmiyorsa yöntem geçerli kabul edilir.

6.2. Doğruluk Çalışmaları

Doğruluk, gerçek değer, kabul edilen standart veya beklenen değer ile uyum anlamına gelir. Test sonucu için doğruluk, analitin gerçek değeri ile test sonucu arasındaki farktır. Herhangi bir analitik süreçte doğruluk belirli koşullarda elde edilen analit sonucu ile doğru veya standart kabul edilen sonuç arasındaki fark olarak ifade edilir.

EP15a'da doğruluk ile ilgili iki prosedür vardır:

1. Hasta numunelerinin başka bir yöntemle (comparative method) de çalışılması (**Yöntem karşılaştırma**). Yöntemler arasında iyi bir uyum beklendiğinde özellikle gereklidir.
2. Referans materyallerle **geri kazanım** çalışması yaparak.

6.2.1. Yöntem Karşılaştırma

Yöntem karşılaştırmada rapor aralığı sınırları içinde en az 40 numune hem test yöntemi, hem de karşılaştırma yöntemi ile paralel çalışılır. Sayı ne kadar çoksa o derece doğru karşılaştırma yapılır.

Tek çalışılabilir ama çift çalışmak daha doğrudur. Çünkü çift çalışma ile ölçümün doğruluğu kontrol edilir.

Farklı günlerde çalışmak daha doğrudur, çünkü tek bir ölçümün sistematik hatasından kaçınılmış olur. Minimum 5 gün önerilmektedir. Daha uzun süre çalışmak daha iyi sonuç verir. RH çalışması 20 güne kadar uzayacağından, yöntem karşılaştırma çalışması da günde 2-5 örnek çalışılarak bu süreye uzatılabilir.

Çalışmalar 2 saat içinde her iki yöntemle de yapılmalıdır. Eğer analit kararlı değilse, bu süre daha da kısaltılmalıdır.

Veriler çalışıldıkça verilergözden geçirilerek uyumsuzluklar görülmelidir. Çalışma tamamlandığında regresyon analizi yapılır.

Eğer korelasyon katsayısı $r > 0.975$ ise lineer regresyon, bu değer altında ise **Deming** veya **Passing Bablok** regresyon analizi kullanılır. $R < 0.975$ ise bias yöntem ortalamaları farkından hesaplanır (Westgard, Basic Method Validation).

Regresyon analizi ile $y = a + bx$ gibi bir denklem elde edilir. Burada x değeri, karşılaştırma yöntemi ile elde edilen konsantrasyon değeri, y ise test yöntemi ile elde edilendir; a ise kesim noktasını verir. Regresyon analizinde $S_{y/x}$ değeri ise grafikte elde edilen değerlerin regresyon çizgisi etrafında dağılımını verir. Yöntem karşılaştırmada regresyon denklemi verilirken eğim ve kesim değerlerinin %95 güven aralığının da verilmesi istenir.

Regresyon denklemiyle kritik karar konsantrasyonlarında iki yöntem arasındaki fark (bias) saptanabilir. Denklemden x için y'nin alacağı değer bulunabilir. Örneğin, kolesterol için $y = 2.0 + 1.03x$ gibi bir denklem elde edilsin. Burada regresyon eğrisinin eğimi 1.03, kesim noktası ise 2.0'dır. Kolesterolün kritik karar konsantrasyonu 200 mg/dL'de iki yöntem arasındaki fark (sistemik hata) şöyle hesaplanır:

$$y = 2.0 + 1.03 \times 200 = 2 + 206 = 208$$

Bu hesap, test yönteminin karşılaştırma yöntemine göre 8 mg yüksek değer verdiğini göstermektedir.

Sodyum, kalsiyum gibi analitik aralığı dar analitler için her iki yöntemle elde edilen sonuçların ortalaması arasındaki fark da sistemik hata (bias) hesabında kullanılabilir. Örneğin test yöntemi ve karşılaştırma yöntemi ile 40 örnekte paralel Na çalışılsın ve test yönteminin ortalaması 141 mmol/L, karşılaştırma yönteminin ortalaması 138.5 mmol/L bulunsun. Burada bias $141 - 138.5 = 2.5$ mmol/L'dir. Buna göre test yöntemi daha yüksek değer vermektedir.

Kit prospektüslerinde verilen değerlerin (accuracy, inaccuracy, bias, SH) doğrulanması da gereklidir. Bunun için kit yöntemiyle ve karşılaştırma yöntemiyle paralel ölçümler yapılır. Eğer kitte sistemik hatanın olmadığı belirtiliyorsa, t testi ile önemli fark olup olmadığı kontrol edilir. Eğer kitte bias verilmişse ve bu değer yöntem karşılaştırma sonucu elde edilen bias \pm güven aralığı sınırları içinde kalıyorsa, kit yöntemi geçerlidir.

T istatistiğinde bias saptanır (yöntem ortalamaları arasındaki farktan), daha sonra iki yöntem arasındaki farkların standart sapması hesaplanır, en sonunda t değeri elde edilerek tablo t değeri ile karşılaştırılır.

$$\text{Bias} = y_{\text{ort}} - x_{\text{ort}}$$

$$S_{\text{fark}} = \sqrt{\sum[(y_i - x_i) - \text{bias}]^2 / n - 1}$$

$$T = (\text{bias}) / (S_{\text{fark}} / \sqrt{n})$$

Bunların dışında bias dış kalite değerlendirme sonuçları üzerinden de hesaplanabilir. Genelge 2016-18'de bu hesaplama için bir örnek de verilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Dış kalite değerlendirme sonuçları üzerinden bias hesabı (Genelge 2016-18)

Dış Kalite No	Glikoz Değerleri (mg/dL)		Fark	% bias
	Laboratuvar	Dış Kalite Eş Grup		
1	76	77	-1	-1.30
2	127	121	6	4.96
3	256	262	-6	-2.29
4	303	294	9	3.06
5	29	25	4	16.00
6	345	348	-3	-0.86
7	42	41	1	2.44
8	154	154	0	0
9	398	388	10	2.58
10	93	92	1	1.09
11	240	239	1	0.42
12	72	69	3	4.35
13	312	308	4	1.30
14	99	101	-2	-1.98
15	375	375	0	0
16	168	162	6	3.70
17	59	54	5	9.26
18	183	185	-2	-1.08
19	213	204	9	4.41
20	436	431	5	1.16
			Ortalama %bias	2.36

Genel olarak **CLSI EP9** Yöntem Karşılaştırma Kılavuzu esas alınmaktadır. Bu kılavuzda en az 40 farklı numunenin, her biri çift olmak üzere (her iki yöntemle de çift çalışma) gerekir. Bu 40 numunenin verileri rapor aralığına yayılmış olmalıdır. Çalışmanın 2 saat içinde tamamlanması gereklidir. Ama günde 8 örneğin üzerine çıkılmamalıdır. Birbirinden çok uzak veriler dışlanır. Ancak, veri dışlaması yapıldıktan sonra sayı 39'un altına düşmemelidir. Eğer iki yöntem arasındaki korelasyon katsayısı $r < 0.975$ ise, program veri aralığının yetersiz olması nedeniyle daha fazla sonuç girilmesini gerekli kılar.

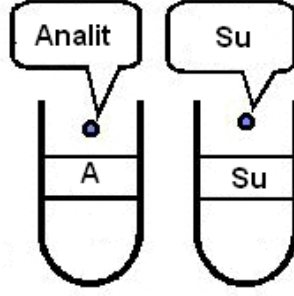
CLIA, minimum 40 örnek sayısını minimum 20 örneğe indirmiştir. CLSI EP15 de 20 sayısını yeterli bulmaktadır. EP15 alternatif bir yöntem de vermektedir. Buna göre minimum 2 referans materyal 3 ila 5 çalışmada çift olarak çalışılır. Buradaki referans materyaller, sertifikalı referans materyal olabildiği gibi, yeterlilik testi materyali, kalite kontrol materyali veya benzer grup değeri belli materyal olabilir. Bu işlem, kuşkusuz çok daha kolaydır.

6.2.2. Geri Kazanım Çalışması

Geri kazanım çalışmaları da doğruluğu yansıtır. Özellikle yöntem karşılaştırması yapılmadığında daha değerlidir. Geri kazanım çalışmaları orantılı SH'nın saptanmasında değerlidir.

Tüplerden birine su,
diğerine analit eklenir

Her iki tüpte de
analit ölçümü
yapılır



$$\%R = \left| \frac{\text{Eklenen} - \text{Geri kazanılan}}{\text{Eklenen}} \right| \times 100$$

Şekil 3. Geri kazanım çalışması.

Geri kazanım çalışmalarında seruma bilinen miktarda analit eklenir (yoğun standart çözeltisi halinde), diğer eş örneğe ise eşit miktarda su eklenir. Daha sonra her iki örnek de yöntemle analiz edilir. Burada eklenecek miktarın matrisi bozmayacak kadar küçük olmasına dikkat edilmelidir. Genel olarak seyreltmenin %10'u geçmemesi önerilir. Bu yüzden eklenecek analit çözeltisinin konsantrasyonu çok yüksek tutulur.

Pipetleme işlemi çok dikkatli yapılmalıdır.

Eklenecek analit miktarı, bir sonraki tıbbi karar konsantrasyonuna getirecek büyüklükte yapılır.

Genel olarak çift çalışılarak RH önlenmeye çalışılır. Ama üçlü ve dördümlü çalışmalar daha da iyidir; özellikle de eklenen standart miktarı orijinal değere göre düşükse üçlü veya dördümlü çalışmalar daha yararlıdır.

Eğer hastadan hastaya değişebilen bir etki söz konusu ise nispeten fazla sayıda değişik hasta serumunda çalışmak doğrudur.

Geri kazanım çalışmasının karşılaştırma yöntemi ile de paralel olarak yapılması olası hataların görülmesi açısından yararlıdır.

Geri kazanım yüzde olarak ifade edilir. İdeal geri kazanım değeri %100'dür. Örneğin %95 gibi bir değer elde edilmesi %5 kadar bir orantılı hata bulunduğu işaret eder.

Örnek: Hazırlanan 20 mg/dL stok kalsiyum çözeltisi 0.1 mL hacimde 1 mL hasta serumu üzerine konulsun. İki farklı hasta serumu kullanılsın.

Eklenen miktar $20 \times (0.1/1.1) = 1.83 \text{ mg/dL}$

A serumu için

Ekleme yapılan tüpte ölçülen Ca değerleri: 11.4 ve 11.6 mg/dL (ortalama 11.5 mg/dL)

Ekleme yapılmayan tüpte ölçülen Ca değerleri: 9.7 ve 9.9 mg/dL (ort: 9.8 mg/dL)

B serumu için:

Ekleme yapılan tüp: $(11.2 + 11.0)/2 = 11.1$ mg/dL

Dilüe olan tüp: $(9.5 + 9.5)/2 = 9.5$ mg/dL

A serumunda fark: $11.5 - 9.8 = 1.7$ mg/dL

B serumunda fark: $11.1 - 9.5 = 1.6$ mg/dL

A serumu için %R = $(1.7/1.83)*100 = \%93.4$

B serumu için %R = $(1.6/1.83)*100 = \%87.9$

Ortalama %R = $(93.8 + 87.9)/2 = \%90.6$

Orantılı hata miktarı = $100 - 90.6 = \%9.4$

Bu değer izin verilebilir total hata ile (örneğin CLIA'ya göre %10) karşılaştırılır. Buna göre %R izin verilir hatanın altındadır.

Geri kazanım çalışması başka şekilde de yapılabilir:

Serum havuzları (2 adet) hazırlanarak bu havuzlara konsantre stok analit çözeltisinden eklemeler yapılır. Örneğin glikoz için yapılacak olursa: 9.6 mL serum havuzuna 10 000 mg/dL konsantrasyondaki stok glikoz çözeltisinden 0, 100 uL ve 400 uL eklenir. Aynı sırayla tüplere 400, 300 ve 0 uL serum fizyolojik eklenir. Son hacim tüm tüplerde 10 mL olur. Her tüpte dörtlü glikoz çalışması yapılır. Şöyle sonuçlar bulunduğunu varsayalım:

	Eklenen Glikoz		Bulunan mg/dL	Geri kazanılan mg/dL	%R
	uL/10 mL	mg/dL			
A	0	0	61	-	-
A	100	100	159	98	98
A	400	400	457	396	99
B	0	0	171	-	-
B	100	100	268	97	97
B	400	400	562	391	98

Bu sonuçlardan ortalama R = %98 olarak bulunur. Buna göre yöntem %2 kadar orantılı hata göstermektedir. Başka deyişle 50 mg/dL düzeyinde 1 mg/dL, 100 mg/dL düzeyinde 2 mg/dL, 200 mg/dL düzeyinde 4 mg/dL sapmaya yol açar.

6.3. İnterferans Çalışması

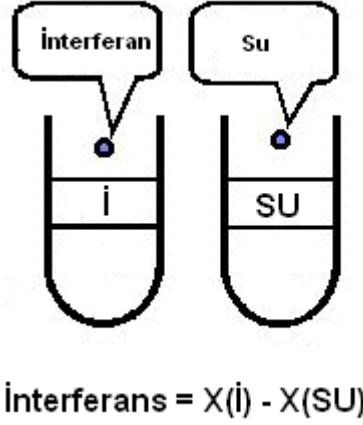
İnterferans çalışması, örnekte bulunan analit dışı materyallerin neden olduğu sistematik hatanın saptanmasında kullanılır. Bu tür sistematik hata **sabit sistematik hatadır**. Analit konsantrasyonundan bağımsız olarak her konsantrasyonda görülen sabit bir hatadır. Ancak, interferan maddenin konsantrasyonu değıştikçe hata büyüklüğü değışir.

İnterferans çalışması geri kazanım çalışmasına benzer. Bir çift numune hazırlanarak, bunlardan birisine interferan madde, diğerine seyreltme etkisini eşitlemek için interferan maddenin eklendiği hacimde saf çözücü eklenir.

Tüplerden birine su,
diğerine interferan
eklenir

Her iki tüpte de
analit ölçülür

Ortalamalar
arasındaki fark
alınır



Şekil 4. İnterferans çalışması.

Analit çözeltisi olarak standart çözeltileri, hasta örnekleri veya hastalardan elde edilen numune havuzları kullanılabilir. Hasta numunelerinin kullanılması aynı matrikse sahip olması nedeniyle tercih edilir.

Tüm numunelerin çift çalışılması uygundur. Rastlantısal hataları savuşturmak açısından üçlü çalışmak daha üstündür.

İnterferan madde eklenirken orijinal materyalin seyreltilmemesi gerekir. Seyreltme %10'u geçmeyecek şekilde yapılmalıdır. Seyreltme etkisi interferan eklenmeyen materyalde eşitlenmelidir.

Pipetleme çok önemlidir, çok dikkatli yapılmalıdır.

İnterferan konsantrasyonu, interferanın biyolojik materyalde bulunabilecek maksimum miktarı kadar yapılmalıdır. Örneğin glikoz ölçümlerinde askorbik asit etkisi araştırılacaksa, askorbik asit eklendiğinde örnekteki konsantrasyonu 15 mg/dL civarında olmalıdır. Eğer bu noktada bir sistematik hata görülürse, daha düşük askorbik asit konsantrasyonlarına da inilir.

İnterferans çalışmasında test yöntemiyle birlikte karşılaştırma yönteminin de bulunması yararlıdır. Eğer karşılaştırma yöntemi interferansa açıksa ve test yöntemi de karşılaştırma yöntemi kadar etkileniyorsa, yeni yöntemi reddetmek doğru olmaz. Ama amaç interferansı ortadan kaldırmaksa, tabii ki etkilenen yeni yöntem reddedilebilir.

Hesaplamalar. Glikozda İnterferans

Örnek	Analit Eklenen Örnek Değerleri (mg/dL)			Seyreltilen Örnek Değerleri (mg/dL)		
	1. Çalışma	2. Çalışma	Ortalama	1. Çalışma	2. Çalışma	Ortalama
A	110	112	111	98	102	100
B	106	108	107	93	95	94
C	94	98	96	80	84	82

Daha sonra ortalamalar arasındaki farklar ve sonra da farkların ortalaması alınır:

A: 111 – 100 = 11 mg/dL
B: 107 – 94 = 13 mg/dL
C: 96 – 82 = 14 mg/dL
Farkların Ortalaması: 12.7 mg/dL

Genel olarak interferans etkisinin <%10 olması beklenir.

Glikozun referans üst sınırında farkların ortalaması %12.7 hata gibi düşünülebilir ve %10'u aşmaktadır; 110 mg/dL düzeyinde %10 fark 11 mg/dL eder ki, 12.3 mg/dL bu değerinde üzerindedir.

CLSI EP7 Kılavuzunda bir düşük havuz (%0 havuzu), bir de yüksek havuz (%100 havuzu) oluşturulur. Bu havuzlar interferan miktarı %25, %50 ve %75 olacak şekilde karıştırılır. Her havuzdan üçer numune ayrılarak, her bir numunenin çalışıldığı 3 ayrı çalışma yapılır. Numuneler ilk çalışmada düşükten yükseğe, ikincide yüksekten düşüğe, üçüncüde yeniden düşükten yükseğe doğru sıralanır. Sonuçlar, yatay eksene interferan miktarı, düşey eksene elde edilen analit sonucu gelecek şekilde grafiğe geçirilir (doz cevap eğrisi). Sıfır havuzuna göre klinik olarak önemli fark görülen interferan miktarı matematiksel fonksiyon (polinomial) ile belirlenir.

6.4. Rapor Aralığının Belirlenmesi (Lineerite Çalışması): Doğrusallık

Rapor aralığı (CLIA), **analitik ölçüm aralığı, lineer aralık, analitik aralık, çalışma aralığı, doğrusallık** gibi adlarla da adlandırılır. Rapor aralığı, güvenilir olup rapor edilebilen en küçük ve en yüksek test sonuçları ile ifade edilir. Üretici firmalar da rapor aralığı verirler ve bu sınırların, özellikle de 2 nokta kalibrasyon kullanılıyorsa, doğrulanması gerekir. Bazı yöntemler uzun süreli, hatta lot boyu geçerli olan kalibrasyon ile çalışır. Böyle durumlarda da kalibrasyonun doğrulanması gerekir.

Otomatik cihazlarda 2 nokta kalibrasyon sık kullanılır. Bu kalibratörlerden birisi sıfır kalibratördür. Bu iki kalibratör noktası arasında doğrusal bir gidişin olduğu, hatta doğrusal bölgenin ikinci kalibratör değerinin üzerinde de sürdüğü kabul edilir.

Kalibrasyon doğrulamasında (verifikasyon) yöntemin rapor aralığı içinde yer alan ve değeri bilinen materyaller hasta numuneleri gibi çalışılır.

6.4.1. Doğrusallık (Lineerite) Çalışması

Doğrusallık çalışmasında değeri belli bir dizi numune çalışılır. Değeri yüksek bir numune veya hasta havuzu seri halde seyreltilerek elde edilen numuneler çalışılır. Elde edilen değerler bilinen değerlerle karşılaştırılır. Bilinen değerler yatay eksene, ölçülenler düşey eksene yerleştirilerek grafiğe geçirilir. Elde edilen noktalardan geçen çizgi görsel olarak doğrusal mı incelenir. Veya daha ileri karmaşık istatistiksel analizler yapılır. **CLSI EP-6**'da bu istatistiksel işlemler verilmektedir. Ancak, görsel incelemenin yeterli olduğu genel kabul görmüştür.

Seyreltme işlemi önemlidir. Seri seyreltme önerilmez, çünkü seyreltme yaptıkça varolan bir hacim hatası katlanarak büyür. Bunun yerine her numunenin orijinal yüksek materyalden direkt seyreltme ile hazırlanması önerilir.

CLSI, minimum 4, daha iyisi 5 farklı konsantrasyon noktası önerir. (CLSI EP-6, minimum 5 düzeyi gerekli kılar.) Hatta eğer rapor aralığını genişletmek amaçlanıyorsa, 5'in üzerinde de olabilir. Ama 5 nokta hemen her zaman yeterlidir.

Bu amaçla standart çözeltileri kullanılabilir. Üreticiler veya yeterlilik testi yürüten kuruluşlar "lineerite setleri" üretmektedir. Yüksek hasta numunelerinin seri seyreltimi en ucuz ve kolay yoldur. Yüksek değere ulaşmak için numune havuzuna saf analit de katılabilir.

Seyreltmeler sırasında numune matriksi değişmemelidir. Genel kimya testleri için su veya serum fizyolojik ile seyreltim kabul edilebilir. Diğer testler için sığır albumini veya serum albumini çözeltileri kullanılır. İlaç çalışmalarında ilaç içermeyen serum ile seyreltme yapılabilir.

Çalışmanın iki havuz ile yapılması uygundur. Bunlardan birisi sıfır düzeyine veya saptama sınırına yakın, diğeri beklenen rapor aralığı üst sınırına yakın olmalıdır. Yapılacak işleme göre hacimler hesaplanır. Çalışma şöyle yürütülür:

1. Düşük havuzu 1, yüksek havuzu 5 olarak işaretle.
2. 3 kısım havuz 2 + 1 kısım havuz 5'i karıştır (75/25)
3. 2 kısım havuz 1 + 2 kısım havuz 5'i karıştır (50/50)
4. 1 kısım havuz 1 + 3 kısım havuz 5'i karıştır (25/75)

Bu seyreltme işlemi değiştirilerek sayı artırılabilir. Daha sonra bu oluşturulan havuzlar CLSI'ye göre dördü çalşılır. Ama üçlü çalşmak da yeterlidir.

Veriler grafiğe geçirilir. Noktaların çizgiden ayrıldığı noktada SH hesaplanır.

Örnek: Kolesterol

Havuz No	Havuz Değeri mg/dL	Ölçüm 1 mg/dL	Ölçüm 2 mg/dL	Ölçüm 3 mg/dL	Ortalama mg/dL
1	0	0	5	10	5
2	100	95	100	105	100
3	200	300	195	205	200
4	300	310	300	290	300
5	400	380	390	400	390
6	500	470	460	480	470

Bu verilere göre 5. noktada 10 mg/dL, 6. noktada 30 mg/dL sapma vardır. Bu sapmalar, izin verilebilir hata ile karşılaştırılır. Örneğin 500 mg/dL düzeyinde %CV %3 olarak saptansın (s = 15 mg/dL). Buna göre RH, $2 \times 15 = 30$ mg/dL'dir. Bu noktada nonlineeriteden kaynaklanan sistematik hata 30 mg/dL'dir. RH ise ± 30 mg/dL'dir. Bu şu anlama gelir ölçülen değer 440 ile 500 mg/dL arasında değişebilir. Genelge 2016-18'e göre (Tablo 2) izin verilen toplam hata %11'dir. Bu 500 mg/dL düzeyinde 55 mg/dL anlamına gelir. O halde 500 mg/dL düzeyinde 55 mg/dL sınırı aşılmaktadır. Bu yüzden 500 mg/dL rapor aralığı için uygun değildir; bu değer düşürülmelidir.

400 mg/dL düzeyinde RH 12 mg/dL'dir. İki standart sapma RH'yı vereceğinden, $2 \times 12 = 24$ mg/dL'dir. Bu noktada lineer olmayıştan kaynaklanan sistematik hata 10 mg/dL'dir. Ortalama 390 mg/dL'ye RH da eklenince karşılaşılabilecek değerler aralığı 366 ile 414 mg/dL arasında değişir. Genelgeye göre total izin verilebilir hata %11 idi, dolayısıyla 400 mg/dL düzeyinde 44 mg/dL'dir. Toplam hata en kötü olasılıkla $10 + 24 = 34$ mg/dL bulunur. Bu değer izin verilebilir hata olan 44'ün altındadır. O halde rapor aralığı 400 mg/dL'ye kadar uzatılabilir.

6.4.2. Kalibrasyonun Doğrulanması (Kalibrasyon Verifikasyonu)

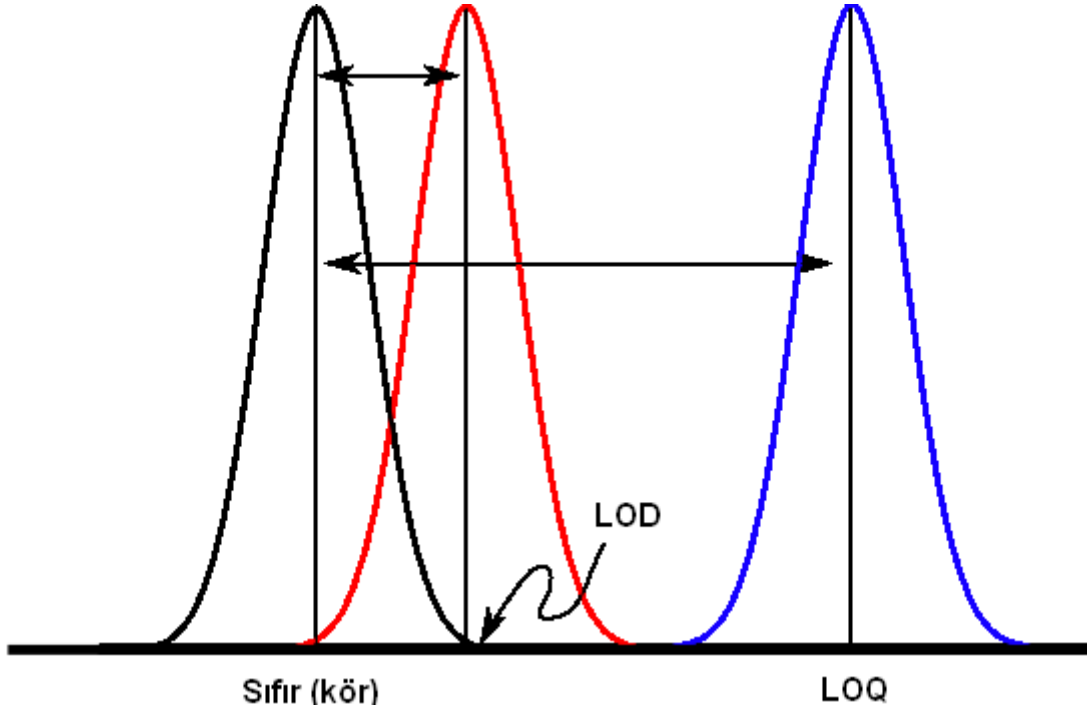
Kalibrasyonun doğrulanması ABD'de uygulanan ve gerekli bir işlemdir. CLIA'ya göre rapor aralığı boyunca konsantrasyonu bilinen materyallerin hasta numunesi gibi çalışılarak cihaz veya test sisteminin kalibrasyon doğruluğunun kanıtlanması gerekir. Seyrek kalibre edilen sistemler için en az 6 ayda bir kalibrasyon doğrulanmalıdır. Bu işlem ayrıçlarda köklü değişiklik, sistemin ana bileşenlerinde değişiklik, esaslı bakım durumlarında, düzeltilemeyen kalite kontrol sorunları olduğunda daha sık yapılmalıdır. Diğer ülkelerde böyle bir gereklilik henüz yoktur.

Kalibrasyon doğrulama işlemi, rapor aralığı saptama işlemine benzer. Fark şuradadır: Çalışılan numunelerin değerleri kesin olarak bilinmelidir. Bu amaçla üretici firmalar tarafından özel kalibrasyon serileri hazırlanmıştır. Ayrıca, hasta numunesi gibi çalışılan kalibratörler veya değeri belli kontrol materyalleri veya değeri belli yeterlilik testi materyalleri, hatta çalışılarak değeri belirlenmiş hasta numuneleri de bu amaçla kullanılabilir. Bu materyaller hasta numunesi gibi çalışılır. Bu materyallerin birden fazla çalışılması sistematik hataları azaltmak açısından önerilir. Elde edilen değerler ile gerçek (saptanmış) değerler arasındaki farklar saptanarak kabul edilebilirlik kriterleri ile karşılaştırılır

CLSI kılavuzlarına / standartlarına göre hazırlanmış olan EP Evaluator Programında lineeritenin yanı sıra kalibrasyon doğrulanması, doğruluk (accuracy) ve rapor aralığı çalışmaları da yapılmış olur. Bu amaçla konsantrasyonu belli olan 3-11 numunede çift çalışma yapılır. İdeal olarak en düşük ve en yüksek numuneler, yöntemin rapor aralığı sınırlarını zorlamalıdır. Bilinen geri kazanım hesabı yapılır (%R). Aynı çalışmada yöntemin rapor aralığı da doğrulanır. Eğer en alt ve en üst numune değerleri gerçek değerlerin %95 sınırları içinde ise rapor aralığı geçerlidir. Kalibrasyonun doğrulanması da geri kazanım ve rapor aralığı gibi yapılır, tek fark yasal düzenlemelere uyulması gereğidir. **CLIA en az 3 farklı düzeyde numuneyi gerekli kılar.** Her bir numune çift çalışılır. Bu üç numuneden ikisi alt ve üst rapor aralığı sınırlarında olmalıdır, üçüncüsü ara bölgede olabilir. Burada doğrusalılık üç şekilde değerlendirilir: (1) Geleneksel yol, yani görsel olarak. (2) İstatistiksel yolla (**CLSI EP6P ve EP6-A**): İstatistiksel öneme göre (EP Evaluator ver. 8'de bu işlem yapılmaz). (3) Klinik lineerite: Eğer sonuçlar her bir örnek için laboratuvarcı tarafından girilen izin verilen hata sınırlarını aşmıyorsa yöntem geçerlidir.

6.5. Limitler

Rapor aralığı ile amaçlanan genellikle yöntemin üst sınırını saptamaktır. Yöntemin alt saptama sınırının belirlenmesi de gereklidir. Özellikle **PSA, TSH, kardiyak belirteçler** gibi testler için alt saptama sınırı çok daha önemlidir. Glikoz, kolesterol, enzimler gibi çok düşük düzeyleri klinik açıdan önemsiz olan testler için saptama sınırının saptanmasına gerek yoktur.



Şekil 5. LOB, LOD ve LOQ.

Bu alanda terminoloji kargaşası vardır: Bu amaçla kullanılan sözler şunlardır: **Sensitivite**, **analitik sensitivite**, **minimum saptama sınırı**, **alt saptama sınırı**, **kör sınırı (limit of blank)**, **biyolojik saptama sınırı**, **saptama sınırı (limit of detection)**, **ölçüm sınırı (limit of quantitation)** gibi. CLSI EP17-A bu kargaşaya son vermek amacıyla **LOB**, **LOD** ve **LOQ** tanımlarını yapmıştır.

LOB, sıfır konsantrasyondaki numunenin (kör) belirli bir olasılıkla karşılaşılabilecek en yüksek değeridir. Genellikle %95 olasılık alınır; bu da tek yönlü alındığında 1.65'dir.

$$\mathbf{LOB = Ortalama_{kör} + z * S_{kör}} \text{ {Burada } z = 1.65 \text{'tir}}$$

LOD, bir numunede kesin bir değer olarak konulmasa da, belirli bir olasılıkla saptanabilen en düşük analit miktarıdır. Gene %95 olasılık oranı olan 1.65 değeri alınır. Hesabında kör ortalamasına 1.65 ile çarpılarak kör standart sapması ve gene 1.65 ile çarpılarak düşük konsantrasyondaki örneğin standart sapması eklenir.

$$\mathbf{LOD = Ortalama_{kör} + z * S_{kör} + z * S_{dö}}$$

Veya:

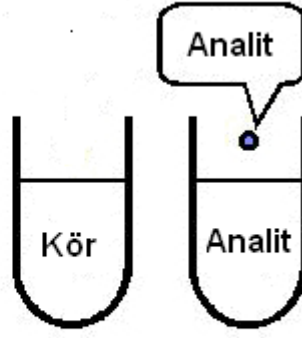
$$\mathbf{LOD = LOB + z * S_{kör} + z * S_{dö}}$$

LOQ, hedef olarak konulmuş belirli presizyon ve gerçeklik değerinde kantitatif olarak belirlenebilen en düşük analit miktarıdır. Yöntem %95 total hata düzeyinde, yani bias + 2s, izin verilen hata sınırları içinde kalmalıdır.

$$\mathbf{LOQ = Ortalama_{dö} + bias_{dö} + 2S_{dö}}$$

Kör ve düşük miktarda analit içeren örnekler hazırlanır

Çok sayıda ölçüm yapılarak ortalama ve standart sapma hesaplanır



$$LOB = \text{Ortalama}_{\text{Kör}} + z * s_{\text{Kör}}$$

$$LOD = LOB + z * s_{\text{Kör}} + z * s_{\text{dö}}$$

Şekil 6. LOB ve LOD'un saptanması (dö: düşük değerli numune).

Bu tanımlara göre, LOB ifadesi, eskiden kullanılan alt saptama sınırı (Lower Limit of Detection: LLD) ifadesinin yerini almıştır. Tek fark, çarpım faktörünün 2 veya 3 değil, 1.65 oluşudur.

Benzer şekilde LOD da biyolojik saptama sınırı (Biological Limit of Detection: BLD) ifadesinin yerini almıştır. Burada da tek fark, 2 veya 3 ile çarpmak yerine 1.65 faktörüyle çarpmaktır.

LOQ, eskiden kullanılan ve bugün hala kullanılmakta olan **Fonksiyonel Sensitivite** ifadesi ile benzerdir. Fonksiyonel sensitivite genellikle, yöntem CV'sinin %20 olduğu analit konsantrasyonudur (Ancak analite göre değişebilir. Örneğin troponin için bu %CV değeri %10'dur). LOQ için ise, yöntemin bias + 2s sınırının izin verilebilir hata eşliğinin altında olması istenir. Burada yöntem bias'ının da kullanılması gerektiğinden LOQ hesabı daha zordur. Üretici firmalar ABD'de LOQ değeri vermeyebilir, çünkü FDA bu değerlerin verilmesini şart koşmamaktadır.

Bu limitlerin saptanmasında iki farklı numune kullanılır. Bunlardan birisi analit içermeyen numunedir (kör). Diğeri, az miktarda analit katılan numunedir (düşük numune, dö). Bazı durumlarda, fonksiyonel sensitivite ve LOQ hesabında giderek artan konsantrasyonda analit içeren çok sayıda numune hazırlanır. Bu numunelerde tekrarlar çalışmasında olduğu gibi analit ölçümü yapılır, ortalama ve s hesaplanır.

Kör çözeltisinin hazırlanmasında numune matriksi hasta numunelerinin matriksine benzerse daha iyidir. Ama sıfır standardı kör, en düşük kalibratör de düşük numune olarak alınabilmektedir ve bu uygulama daha yaygındır.

Eğer üreticinin verdiği saptama sınırı varsa, kör üzerine bu sınıra karşılık gelen miktarda analit eklenerek numune hazırlanır. Saptama sınırının hesabında, beklenen saptama sınırı aralığında çok sayıda numune hazırlanır.

Kaç çalışma yapılacağı konusunda çelişkiler olmakla birlikte minimum 20 çalışma gerekir. CLSI kılavuzu, kit prospektüsünde yer alan değerin saptanmasında 20 tekrarı gerekli kılar. Ama üretici firmalara minimum 60 tekrarı zorunlu kılar.

Kör çözeltileri için ortalama ve s'in belirlenmesinde çalışma içi tekrarlar çalışma uygundur. Ama düşük numunenin verilerinin elde edilmesinde farklı günlerde elde edilen sonuçlar kullanılır. CLSI kılavuzu LOD için "çok sayıda gün" ifadesini, LOQ için "minimum farklı 5 gün"de yapılmış 5 farklı çalışma ifadesini kullanmaktadır.

Rutin laboratuvarlar için genel olarak LOB'u veya tercihen LOD'u belirlemek çok daha pratiktir. Kit prospektüsünde belirtilen fonksiyonel sensitivite veya LOQ için üreticinin belirttiği protokol uygulanır.

Örnekler

LOD hesabında kör için yapılan 20 çalışmada $s = 1.0 \text{ ug/L}$ olsun ve fonksiyonel sensitivite için 10 ug/dL düzeyine kadar analit eklenmiş düşük düzeyli numuneler kullanılsın. Bu bir ilaç testi olsun ve CLIA'ya göre kabul edilebilirlik kriteri %25 olsun. Buna göre:

$$\text{LOB} = 0 + 1.65 * 1.0 \text{ ug/L} = 1.65 \text{ ug/L}$$

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.65 * 1.0 = 3.30 \text{ ug/L}$$

Fonksiyonel sensitivite (FS), CV'nin %20 olduğu konsantrasyon olarak esas alındıysa şöyle hesaplanabilir.

$$\%CV = (s) * 100 / \text{FS}$$

$$\text{Buradan FS} = (1) * (100) / 20 = 5 \text{ ug/L}$$

LOQ için bias sıfır kabul edildiğinde Toplam izin verilen hata %25 = $2 * \%CV$ olacağından, $\%CV = 12.5$ olur ve bu CV'ye karşılık gelen konsantrasyon da $(s * 100) / 12.5 = 8 \text{ ug/L}$ bulunur.

Pratikte, hazırlanan çok sayıda numunde çalışma yapılır. Örneğin 0.0 ug/L , 3.0 ug/L , 6.0 ug/L ve 9.0 ug/L konsantrasyonda numuneler hazırlanır. Standart sapmanın tüm numunelerde aynı kalması mümkün değildir. 0.0 mg/dL değerli numuneden elde edilen s ile LOB, 3.0 ug/dL 'den elde edilen ile LOD, 6.0 ug/dL 'den elde edilenle FS ve 9.0 ug/L 'den elde edilenle LOQ hesaplanır.

Kit üreticilerinin verdiği değerlerin doğrulanmasında CLSI kılavuzu 20 çalışma önerir. LOB için 20 sonuçtan 3 veya daha azı prospektüste verilen sınırı aşıyorsa bu sınır doğrulanmış olur. LOD için düşük konsantrasyondaki numunede yapılan çalışmadan elde edilen 20 sonuçtan 1'i bile $< \text{LOB}$ değilse verilen sınır doğrulanır.

Üretici firmalar daha çok LOB değeri verirler. Çünkü daha kolaydır ve daha düşüktür; bu yüzden ticari açıdan caziptir. Tıbbi uygulamalar için LOD veya LOQ hesabı daha yararlıdır. Firmalar LOQ'dan çok LOD'u vermeyi yeğlerler. Dolayısıyla LOD hesabı yapmak daha kestirme bir çözümdür.

LOB için CLSI prosedüründe biri sıfır, diğeri düşük miktarda analit içeren numunede tekrar tekrar ölçümler yapılır. Sıfır düzeydeki numune için en az 10, düşük konsantrasyonlu numune için en az 3 tekrar gereklidir. Ortalama + 2s kör sınırı, alınabilecek en yüksek cevap sınırır.

LOQ için önce hedef CV girilir (genellikle %20'dir); hedef CV'nin karşılanabileceği umulan konsantrasyonlarda 5 ila 10 numune hazırlanır (bu konsantrasyonların lineer değil, logaritmik gitmesi istenir: 1, 2, 5, 10, 20 gibi); her bir numuneden 20 ila 50 kısım (alikota) ayrılır ve dondurulur; her alikota farklı bir günde olacak şekilde en az 10 gün süreyle çalışılır, 20 güne kadar uzatılması önerilir. Bu değerlerden CV hesaplanır; LOQ CV'nin hedef CV'den küçük olduğu minimum analit konsantrasyonudur.

6.6. Taşıma (Carryover) Hatalarının Saptanması

Taşıma (carryover) hataları, otomatik analizörlerle çalışmada kontaminasyona bağlı hataların ortaya çıkarılması için yapılır. Burada bir düşük miktarda analit içeren numune havuzu (D), bir de yüksek miktarda analit içeren numune havuzu (Y) vardır. Bunlar analizöre şu sıra ile yerleştirilir ve çalışılır:

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4—D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11

Bir yüksek havuzdan gelen düşük havuz sonuçları ve bir düşük havuzdan sonra gelen düşük havuz sonuçları derlenir, ortalama ve standart sapmaları hesaplanır.

Buna göre D2, D3, D6, D7 ve D8 bir grup, D4, D5, D9, D10 ve D11 bir grup oluşturur.

Örneğin, bir glikoz uygulamasının taşıma hatası çalışmasında D konsantrasyonu 53 mg/dL olsun, Y konsantrasyonu 500 mg/dL olsun.

D2, D3, D6, D7, D8 ortalaması 52.3 mg/dL, s = 1.2 mg/dL olsun.

D4, D5, D9, D10, D11 ortalaması 54.3 mg/dL, s = 1.5 mg/dL olsun.

Ortalamalar arasındaki fark $54.3 - 52.3 = 2.0$ mg/dL'dir.

Genelge 2016-18'e göre glikoz için izin verilen toplam hata 50 mg/dL düzeyinde 5.5 mg/dL'dir. Bias ise 2.75 mg/dL olacaktır. Bu durumda taşıma hatasına bağlı fark bu bias değerinden küçük kaldığından yöntemde taşıma hatası önemsizdir sonucuna varılır.

Diğer bir değerlendirme ise şöyle yapılabilir: D'den sonra gelen D'lerin standart sapmasının 3 katı hata sınırı olarak alınır (EP Evaluator Programın). Buna göre $1.2 * 3 = 3.6$ mg/dL. Bu verilere göre de yöntem geçerlidir.

Farklı Geçerlilik Çalışmalarında Sonuçların Değerlendirilmesi

Hata Tipi	Çalışma	Sınırlar
Rastlantısal hata	Tekrarlama çalışması	$S_{\text{çalışma}} < s_A$ veya $4 \times S_{\text{çalışma}} < TH$
Orantılı hata	Geri kazanım	$\left \frac{(R - 100)}{100} \right X_c < B_A$
Sabit hata	İnterferans	$ \text{Bias} < B_A$
Sistemik hata	Yöntem karşılaştırma	$ (a + bx_c) - x_c < B_A$
Toplam hata	Tekrarlama ve yöntem karşılaştırma	$4 \times S_{\text{çalışma}} + (a + bx_c) - x_c < TH$

TH: Toplam izin verilen hata; s_A : İzin verilen standart sapma; B_A : İzin verilen bias; R: Ortalama % geri kazanım; x_c : kritik (tıbbi) karar düzeyi.

7. Referans Aralıklarının Doğrulanması

ISO 15189:2012'ye göre laboratuvar personeli tarafından "biyolojik referans aralıkları periyodik olarak gözden geçirilmelidir." Analitik veya preanalitik işlemlerde herhangi bir değişiklik durumunda referans aralıkları doğrulanmalıdır.

Ancak referans aralık çalışması klinik laboratuvarlar için çok zordur ve pahalıdır. Referans aralıkları en az 120 sağlıklı bireyde çalışma yaparak saptamak gerekir. Bu zorluğu göz önüne alarak, Avrupa Birliği İn Vitro Tıbbi Cihazlar Direktifi (Direktive 98/79/EC), IVD üreticilerinin "elde edilen sonuçlarla ilgili olarak referans popülasyon hakkındaki bilgiler de dahil, referans aralıklarla ilgili ayrıntılı bilgi vermesini" şart koşar.

Firmaların verdiği referans aralıklarının laboratuvar tarafından doğrulanması nispeten daha kolay ve ucuzdur. CLSI C28-A3'dokümanına göre, laboratuvarın kendi popülasyonundan 20 sağlıklı bireyde referans aralıklarının doğrulanması / geçerli kılınması için ölçüm yapılması yeterlidir. Buna göre, firma tarafından verilen referans aralıklarının geçerli olabilmesi için 20 kişiden sadece 2 kişinin değerlerinin söz konusu referans aralıklarının dışında kalmasına izin verilebilir. Dışarıda kalanların sayısı 2 veya daha azsa (<%10), referans aralıkları geçerlidir.

8. Kalitatif Testlerin Verifikasyonu

Genel olarak kalitatif testlerle iki olası sonuç verilebilir: "Pozitif" veya "negatif". Bazı kalitatif testler semikantitatif olarak da raporlanabilir. Klinik laboratuvarda kalitatif testlere örnek olarak stripe idrar analizi, bazı moleküler testler ve immünfloresan immünolojik tarama testleri verilebilir. ISO 15189:2012 standardına göre verifikasyon işlemi kalitatif testler için de geçerlidir. Ancak her laboratuvarın verifikasyon protokolü aynı olmak zorunda değildir. Ama sonuçlar, önceden belirlenmiş performans özelliklerine uygun olmalı, bu kalitatif testlerle yeniden üretilebilir ve doğru sonuç alınmalıdır.

CLSI, kalitatif yöntemlerin verifikasyonunun impresizyon, bias ve yöntem karşılaştırma çalışmalarını kapsamı gerektiğini belirtmektedir. Kalitatif yöntemler eğer konsantrasyon ölçümü için öneriliyorsa, yöntemin gerçekliği (trueness) özellikle doğrulanmalıdır. Eğer sonuçlar kantitatif değerlerden türetilmiş ve pozitif veya negatif şekilde veriliyorsa, yeniden üretilebilirlik çalışması, kesim (cut-off) konsantrasyonlarına yakın değerlerde yapılmalıdır. Pozitif ve negatif numunelerin, kesim değerlerinin %20 altında veya üstünde olması önerilir. Eğer yüksek pozitif veya düşük negatif numuneler kullanılırsa, klinik karar düzeyindeki sorunlar saptanamaz.

Kullanımdaki bir karşılaştırma yöntem, referans alınarak kalitatif test için bir yöntem karşılaştırma çalışması yapılmalıdır. Buradaki yöntem karşılaştırma çalışması, kantitatif yöntemler için olandan farklıdır. Burada klinik performans kapsamında diagnostik duyarlılık ve özgüllük de kontrol edilebilir.

Referans aralıkları da saptanmalıdır. Burada da kesim değerinin %20 altı ve üstü değerler esas alınmalıdır.

Yeniden üretilebilirlik çalışması için en az 20 numune kullanılmalı ve ağırlıklı kappa katsayıları hesaplanmalıdır. Kapp katsayısının hesaplanabilmesi için en az 30 numune ve her kategoride (pozitif – negatif gibi) en az 10 numune gereklidir.

Kaynaklar

1. Koch DD, Peters T. Selection and evaluation of methods. Tietz textbook of clinical chemistry (Burtis CA, Ashwood ER, ed.), 3. baskı, Saunders; Philadelphia: 1999, 320-335.
2. Linet K, Boyd JC. Selection and analytical evaluation of methods – with statistical techniques. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics (Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, ed.), 4. baskı, Elsevier, St. Louis, 2006: 353-407.
3. Garber CC, Carey RN. Evaluation of methods. Clinical chemistry – theory, analysis, correlation (Kaplan LA, Pesce AJ, ed.), 5. baskı, Mosby, St. Louis, 2010: 480-506.
4. Westgard JO. Basic method validation, 3. baskı, Madison, 2008.
5. Westgard JO, Ehrmeyer SS, Darcy TP. CLIA final rules for quality systems. Quality assessment issues and answers, Madison, 2004.
6. ISO 15189:2012. Medical laboratories – Requirements for quality and competence.