

Vitamin B12 Ölçümlerinin Kısa Dönemli Analitik Performansının Değerlendirilmesinde Normallerin Ortalaması (AON) Uygulaması

[Application of Average of Normals (AON) for Evaluation of Short-Term Analytic Performance of Vitamin B12 Measurements]

Berrin Berçik İnal,
Murat Usta,
Hale Aral,
Cansel Tuhral,
Pınar Tonbaklar Bilgi,
Güvenç Güvenen

Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Merkez Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul.

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Berrin Berçik İnal

Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Merkez Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul
Tel: 212-4596014
Fax: 212-5884912
e-mail: berrin_inal@yahoo.com

* Bu çalışma, Birinci Uluslararası Kalite & Akreditasyon Sempozyumu, 2008, İstanbul, Türkiye’de poster olarak yayınlanmıştır.

Kayıt tarihi : 27 Nisan 2009 ; Kabul tarihi : 7 Ekim 2009
[Registered : 27 April 2009 ; Accepted : 7 October 2009]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada B12 vitamin ölçümlerinin analitik performansını değerlendirmek için normallerin ortalaması tekniği kullanılmıştır. Ayrıca, bu çalışma kit prospektüsündeki referans aralığını doğrulamak için bir ön çalışma niteliğindedir.

Materyal ve Metotlar: Serum B12 ölçümü (n=2106) Roche E 170 immünokimya analizörü kullanılarak yapıldı. SPSS 11.5 programı kullanılarak explore analiz yapıldı ve uç değerler atıldı (n=1884), ortalama değer $X_{\text{population}}$, standart sapma $S_{\text{population}}$ hesaplandı ve bu sonuçlardan $S_{\text{population}}/S_{\text{measured}}$ değeri elde edildi. Minimum hasta sayısı $N_{\text{population}} = 2 \times N_c \times (S_{\text{pop}}/S_{\text{meas}})^2$ formülü ile hesaplandı. Kesme sınırları ve kontrol sınırları $X_{\text{population}} \pm 2 S_{\text{pop}}$ ve $X_{\text{pop}} \pm 2.58 \times S_{\text{pop}} / (N_{\text{pop}})^{1/2}$ formülleri kullanılarak hesaplandı.

Bulgular: Ortalama değer 323 pg/mL, kesme limitleri düşük limit olarak 56 pg/mL ve yüksek limit olarak 628 pg/mL bulundu. Kontrol limitleri $X_{\text{pop}} \pm 2.58 S_{\text{pop}} / (N_{\text{pop}})^{1/2}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Düşük limit 333 pg/mL ve yüksek limit 351 pg/mL olarak bulundu.

Sonuç: Bu uygun maliyetli teknik, analitik stabilite gözlemlenmesi kapsamında kanımızca geleneksel kalite kontrol uygulamalarına ek olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: kalite kontrol, normallerin ortalaması (AON) , vitamin B12

ABSTRACT

Objectives: In this study we used averages of normals technique to evaluate the analytical performance of vitamin B12 measurements. Additionally, this study is a preliminary work for verifying of reference interval given in kit insert.

Material and Methods: Serum vitamin B12 measurements (n=2106) were performed using Roche E170 immunochemistry analyzer. By using explore analysis in SPSS 11.5 program, outliers were eliminated and using this normalized data (n=1884) mean value ($X_{\text{population}}$), standard deviation ($S_{\text{population}}$) and $S_{\text{population}}/S_{\text{measurement}}$ ratio were calculated. Minimum patient number was calculated with the formula of $N_{\text{population}} = 2 \times N_c \times (S_{\text{pop}}/S_{\text{meas}})^2$. Truncation limits and control limits were calculated using $X_{\text{pop}} \pm 2 S_{\text{pop}}$ and $X_{\text{pop}} \pm 2.58 S_{\text{pop}} / N_{\text{pop}}^{(1/2)}$ formulas.

Results: The mean value was 323 pg/mL; truncation limits were 56.8 pg/mL as the lower limit and 628 pg/mL as the higher limit. Control limits calculated by using $X_{\text{pop}} \pm 2.58 S_{\text{pop}} / (N_{\text{pop}})^{1/2}$ formula were 333 pg/mL as the lower limit and 351 pg/mL as the higher limit.

Conclusions: In our opinion, this cost-effective technique can be used as an adjunctive control procedure to conventional QC applications in monitoring laboratory performance in terms of analytic stability.

Key Words: quality control, average of normals (AON), vitamin B12

Giriş

Normal değerlerin ortalaması (Average of Normals-AON) kavramı eski bir kavram olmasına rağmen günümüzde kalite kontrol sürecinin takibinde güncellik kazanmıştır (1). AON, hasta test sonuçlarından elde edilen kesme sınırları aralığının ortalamasının, hesaplanan kontrol sınırları içerisinde olup olmadığı değerlendirilmesidir. Başka bir deyişle AON, algoritma tekniği, süreç stabilitesinin izlenmesinde, bir ortalama hesaplamak için, normal aralık içindeki veya testin referans aralığına yakın olan kesme sınırları içindeki hasta sonuçlarını kullanmaktadır. Laboratuvarın son ürünü olan hasta test sonuçlarının değerlendirilmesinde Hoffmann ve Waid'in tanımladığı, klinik laboratuvar test sonuçlarının total dağılımlarına düşen normal değerlerin ortalaması (AON) yaklaşımı laboratuvar süreç performansının ve stabilitesinin değerlendirilmesi açısından klinik yarar sağlayabilir (2,3).

Kalite kontrol, laboratuvar test sonuçlarının güvenilirliğini göstermede hayati bir role sahiptir. Şu anda rutin olarak tüm laboratuvarlarda kullanılmakta olan iç kalite kontrol ve dış kalite kontrol işlemleri tekrarlanabilirlik (precision) ve doğruluğun (accuracy) göstergeleri olup rastgele hata ve sistematik hatanın gösterilmesinde önemli yol gösterici kalite kontrol işlemleridir. Laboratuvarların sonuçlarının güvenilirliği aynı zamanda değişik istatistiksel işlemler ile pekiştirilebilir. Böylece sonuçların güvenilirliği artırılabilir, hata oranı düşürülebilir. Normallerin ortalaması kavramı (AON), Bhattacharya metodu ve six sigma tekniği bunlara birer örnektir (4,5). Normallerin ortalamasında ortalamayı hesaplamak için hasta sonuçları kullanılır. Hasta sonuçları belirlenen kesme sınırları (truncation limits) ile karşılaştırılır. Kesme sınırlarının dışında kalan değerler dışarıda bırakılır ve hastaların ortalaması elde edilir. Bulunan ortalamanın belirlenmiş olan kontrol limitlerinin içinde olup olmadığına bakılır (4).

Genel bir ilke olarak her laboratuvar kendi referans aralığını kendi belirlemelidir. B12 vitamini referans aralığının saptanması ülkemiz açısından özellikle önemlidir. Çünkü kit prospektüslerinde verilen referans aralıkları ile bizim popülasyonumuzun B12 vitamini referans aralığı arasında büyük farklar görülmektedir. Çalışmamızda normallerin ortalaması tekniği kullanılarak B12 vitamini ölçümlerinin kısa vadeli performansının değerlendirilmesi ve referans aralığının kontrolü amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

SB İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında 2008 Şubat ayında çalışılan B12 vitamini test sonuçları (n=2106), internal kalite kontrol (İKK) ve normallerin ortalamasına (AON) göre değerlendirildi.

Analitik Metod ve Verilerin Toplanması

Serum B12 vitamini ölçümleri immünojenik elektro-

milüminesans ölçüm (ECLIA) yöntemiyle çalışan Roche Modular E170 cihazında (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) yapıldı. Aylık serum B12 vitamini hasta test sonuçlarının toplanmasında otoanalizörün bilgisayar yazılımından yararlandı. Yapılan çalışma retrospektif olarak cihaz kayıtlarından aldığımız hasta verilerinden elde edilmiştir.

İnternal Kalite Kontrol (İKK)

Kontrol materyali olarak Elecsys PreciControl Anemia (PCA2) kullanıldı. Şubat 2008'de çalışılan (Nc=20) İKK sonuçlarının ortalama ve standart sapma (S_{meas}) değerleri belirlendi.

Normallerin Ortalaması Yaklaşımına Göre Hasta Verilerinin Değerlendirilmesi

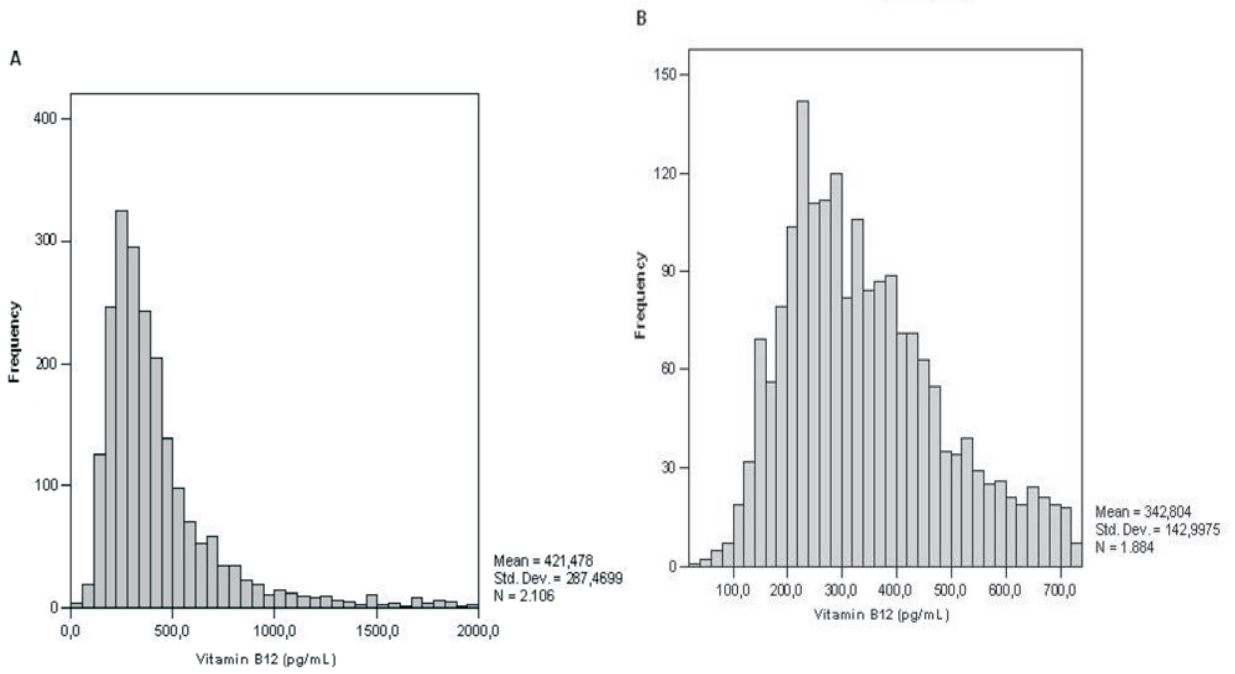
Hasta test sonuçlarının % 95 güven aralığındaki günlük dağılımlarını değerlendirmek için saçılım grafiği (scatterplot) oluşturuldu. Aylık hasta verilerinden (n=2160) elde edilen histogram, kutu grafiği (boxplot) ve dalyaprak (stem and leaf plot) grafiği incelenerek, tanımlayıcı istatistiksel değerler [ortalama, standart sapma, ortanca (medyan), tepe değeri (mod), varyans, minimum, maksimum, aralık (maksimum minimum farkı) çeyrekler arası (interquartile range), çarpıklık (skewness), basıklık (kurtosis)] saptandı. Grup dağılımının normalliği Kolmogorov Smirnov testi ile sınıandı. Tepe değerleri çevresinde saptanan aşırı uç değerler belirlenip, SPSS 11.5 Windows programındaki "explore" analizi ile hiç aşırı uç kalmayınca dek atıldı. Aşırı uç değerler atıldıktan sonra hasta verilerinin (n=1884) ortalama (X_{pop}) ve standart sapma (S_{pop}) değerleri saptanarak, standart sapma oranı (SDO) popülasyonun standart sapma değerinin (S_{pop}) analitik standart sapma değerine (S_{meas}) oranı ile hesaplandı (S_{pop}/S_{meas}). Ortalaması alınacak minimum hasta sayısı (N_{pop}), $2 \cdot N_c \cdot (S_{pop}/S_{meas})^2$ formülü ile hesaplandı (6). Formüldeki N_c kontrol sayısını bildirmektedir. Kesme sınırları $X_{pop} \pm 2 S_{pop}$ ve kontrol sınırları $X_{pop} \pm 2.58 S_{pop}/N_{pop}^{(1/2)}$ formülleri ile saptandı. Kesme sınırları içinde kalan değerlerin ortalamasının kontrol sınırları içinde olup olmadığı değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

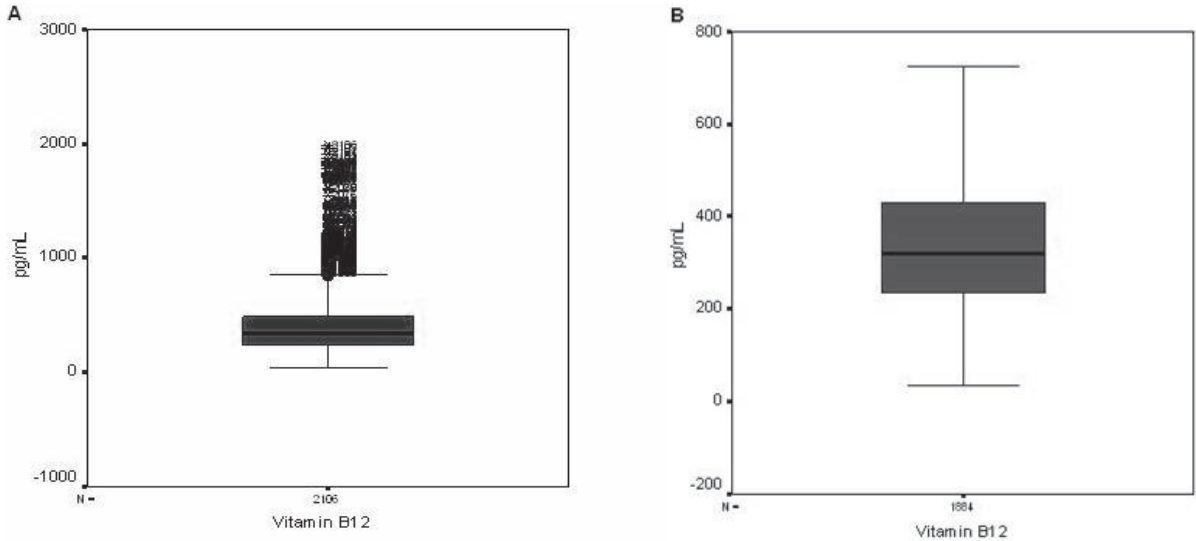
İstatistiksel işlemler ve hesaplamalar SPSS Windows 11.5 versiyonu ile yapıldı.

Sonuçlar

Aylık hasta verilerinde (n=2106) aşırı uç değerler atılmadan önceki tanımlayıcı istatistiksel ölçümler Tablo 1'de, histogram Şekil 1A'da ve boxplot çizimleri Şekil 2A'da görülmektedir. Tepe değerleri çevresinde saptanan aşırı uç değerler, SPSS 11.5 Windows programındaki "explore" analizi ile atıldı ve aşırı uç değer kalmayınca kadar bu analiz tekrarlandı. Aşırı uç değerler atıldıktan sonraki tanımlayıcı istatistiksel ölçümleri Tablo 1'de, histogramı Şekil 1B'de ve boxplot çizimleri Şekil 2B'de görülmektedir. Grup dağılımının normalliğinin sınıandı Kolmogorov Smirnov testinde aşırı uç değerler atılma-



Şekil 1. Şubat 2008 verilerinin histogramları . (A) Uç değerler atılmadan önceki histogram. (B) Uç değerler atıldıktan sonraki histogram.



Şekil 2. Şubat 2008 verilerinin boxplot çizimleri. (A) Uç değerler atılmadan önceki boxplot. (B) Uç değerler atıldıktan sonraki boxplot.

Tablo 1. Aşırı uç değerler atılmadan önce ve atıldıktan sonra hesaplanan istatistiksel ölçümler

	Uç değerler atılmadan önce	Uç değerler atıldıktan sonra
N	2106	1884
Ortalama (pg/mL)	421.48	342.8
SD	287.47	142.99
Medyan	341.9	320.3
Varyans	82638.92	20448.29
Aralık	1953.7	692.4
Minimum	33.3	33.3
Maksimum	1987	725.7
İnterkartil aralık	244.725	197.1

dan önceki ve sonraki varyans değerleri sırası ile 82638 ($p < 0.0001$) ve 20448 ($p < 0.0001$) olarak saptandı.

S_{pop} / S_{meas} ile standart sapma oranı 6.56 olarak hesaplandı ($S_{pop} = 142.99$, $S_{meas} = 21.48$). Ortalaması alınacak minimum hasta sayısı (N_{pop}), $2 N_c (S_{pop} / S_{meas})^2$ formülünden 1721 olarak saptandı. Kesme sınırları $X_{pop} \pm 2 S_{pop}$ ile değerlendirilip alt ve üst sınır sırasıyla 56.8 pg/mL ve 628.8 pg/mL; sınırlar içinde kalan değerlerin ortalaması 323.9 pg/mL olarak saptandı. Kontrol sınırları $X_{pop} \pm 2.58 S_{pop} / N_{pop}^{(1/2)}$ ile değerlendirilip alt ve üst sınırlar sırası ile 333 pg/mL ve 351 pg/mL olarak belirlendi.

Tartışma

James O. Westgard ve arkadaşlarının 1996 yılında yayınlanan bir makalesinde birçok biyokimyasal parametreye yanında Vitamin B12 de değerlendirilmiş ve total kabul edilebilir hata yüzdesi (% TE_a) % 24, S_{pop} / S_{meas} 13.77 olarak alınmıştır (7). Biz CLIA'nın son bildirimine göre % TE_a 'ni % 30 olarak aldık ve S_{pop} / S_{meas} oranını 6.56 olarak hesapladık (8). $s_{pop}^2 = s_{biyolojik\ de\ i\ s\ kenlik}^2 + s_{meas}^2$ eşitliğine göre bir parametrenin biyolojik değişkenliği arttıkça S_{pop} / S_{meas} oranı artacak ve dolayısıyla AON yaklaşımına hassasiyet azalacaktır (7). Westgard'a göre Vitamin B12, amilaz, total ve HDL kolesterol, kreatin kinaz (CK), FSH, lipaz, luteinize hormon (LH), prolaktin, total protein, total T4, trigliserid, AON yaklaşımına hassasiyeti az olan parametrelerdir. Ancak kalite kontrol sürecinde iç ve dış kalite kontrollerimizin iyi olmasına rağmen klinisyenlerin vitamin B12 düzeylerinin düşük değerlerde olduğu şeklindeki geri bildirimleri üzerine bu çalışmaya ihtiyaç duyduk. Hasta sayısının yüksek olması AON yaklaşımına uygulanabilirliği kolaylaştırdı (7). Bizim çalışmamızda kesme değerlerinin (56.8-628 pg/mL) ortalaması olan 323 pg/mL, kontrol sınırları (333-351pg/mL) içerisinde olmamasına rağmen bu değerlerin alt sınırına yakındı. Bu aşamada cihaz ve hasta popülasyonunu değerlendirerek, prospektif olarak bu çalışmanın tekrarlanması gerekmektedir. B12 vitamini için birey içi ve bireylerarası biyolojik varyasyonların büyük olması (CVw= % 15, CVg= % 69) laboratuvarlar arasında referans aralıklarının farklılığına sebep olmaktadır. Roche üretici firmasının Vitamin B12 için prospektüste bildirdiği referans değerler Avrupa için 191-663 pg/mL, ABD için 211-946 pg/mL'dir. Tanyaçın ve arkadaşlarının Denizli ilinde RIA yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada serum B12 düzeyleri referans aralığı erkeklerde (n=124) 100-699.57 pg/mL, kadınlarda (n=155) 101-666.7 pg/mL olarak bulunmuştur (9). Yine başka bir çalışmada, üretici tarafından prospektüste her iki cinsiyet için referans aralığı 200-950 pg/mL olarak önerilmesine rağmen erkeklerde (n=143) 214-1544 pg/mL, kadınlarda ise (n=184) 319-1996 pg/mL olarak bulunmuştur (10). Bu çalışmalarda referans aralıklarının birbirinden oldukça farklı olması ve AON yaklaşımında kendi ortalamamızın kontrol sınırlarının altında kalması verileri, kendi laboratuvarımızın B12 vitamini için referans aralık oluşturma gereksinimini ilk planda akla getirmektedir.

dir. Çalışmamızda kesme değerlerinin (56.8-628 pg/mL) ortalaması olan 323 pg/mL değeri, kontrol sınırları (333-351 pg/mL) içerisinde olmamasına rağmen bu değerlerin alt sınırına yakındı.

Başka bir çalışmada Lott ve arkadaşları normallerin ortalamasını 31 parametrede 4 yıllık bir süreç için medyan değerle karşılaştırarak uygulamışlardır (11). Lott ve arkadaşları hasta verilerinin kullanılmasının uzun ve kısa dönem işlem kontrolünün değerlendirilmesinde yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda öncelikle, AON uygulamasının nasıl yapılacağını gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hastanemiz klinisyenlerinin B12 seviyelerinin düşük olduğu geri bildirimlerinden yola çıkılmış ve B12 testi seçilmiştir.

Bu aşamada cihaz ve hasta popülasyonunu değerlendirerek, prospektif olarak bu çalışmanın tekrarlanması gerektiği düşünülebilir. Ancak yerel farklılıkların (toplum, diyet) beslenme alışkanlıkları, sosyo-kültürel ve ekonomik temele dayanması nedeniyle, serum B12 vitamini düzeylerinin tanısal değerlendirilmesi için referans aralığının belirlenmesinde referans bireylerin seçimine yönelik olağanüstü özen gösterilmesini gerektirmektedir. Serum B12 vitamini eksikliğinin kliniğe yansımalarının çok yönlü, nonspesifik ve belirsiz oluşu referans bireylerin seçimini zorlaştıran diğer önemli bir durumdur; kendi referans aralığını oluşturmak isteyen laboratuvarlar, sağlıklı kontrol grubu bulmakta sorun yaşayabilmektedir. Örneklerin alındığı kişilerin hepsi sağlıklı bireyler olmayabilir. Bu amaçla grup tanımlamada daha özgün kriterlere ihtiyaç duyulmaktadır (12). AON yaklaşımında kendi ortalamamızın kontrol sınırlarının çok az altında kalmasının, serum B12 vitamini düzeylerinde biyolojik varyasyonun yüksek oluşu ve laboratuvarımıza başvuran olgulardan kaynaklanan yerel nedenlere bağlı olabileceği düşünülerek kit prospektüsünde Avrupa için bildirilen referans aralıklarının kullanımına devam edilmesinde mahzur görülmemiştir.

AON uygulaması birkaç faktörden etkilenmektedir: Popülasyon standart sapma değerinin analitik standart sapma değerine oranı (sp/sa), ortalaması alınan hasta sayısı, kontrol sınırlarının seçimi, kesme sınırlarının seçimi, kesme sınırlarının arasında kalan popülasyonun yüzdesi (13). sp/sa oranı AON prosedür uygulamasında belirleyicidir. AON prosedürlerinin ortaya konulmasındaki güçlüklerden dolayı, en azından kontrol materyallerinin kullanıldığı durumlarda ek değerlendirme olarak seçilebilir. Kanımızca, rutin kalite kontrol uygulamaları yanı sıra maliyeti olmayan AON uygulamalarının yapılması laboratuvar performans değerlendirmesinde önemli katkılar sağlayacaktır.

Klinik biyokimya laboratuvarları bütün bu uygulamalarının yanında kalitenin artırılması doğrultusunda, akreditasyonun da gereği olarak yeni metodolojilerin arayışı içindedir. Bu süreç içinde sonuç güvenilirliği için AON uygulaması kalite kontrol prosedürlerine ek olarak önerilir. Ayrıca bu çalışma herhangi bir testi irdelerken analitik performansının değerlendirilmesinden sonra bir

testin referans aralığının tayinine ihtiyaç olup olmadığını rutin kullanıma koymadan değerlendirmek için bir ön çalışma niteliğindedir. Çünkü hasta popülasyonunu irdelemeden önce analitik süreci pratik olarak irdelemek gerekir. Çalışmamızda kısa süreli hasta verilerinin kullanılması ve vitamin B12'nin yanı sıra B12 metabolizması ile ilgili holotranskobalamin, homosistein veya metilmalonik asit gibi değerli analitlerin ölçülmemiş oluşu çalışma sınırlamamızı oluşturmaktadır. Ancak, bu ön çalışmada amacımız AON yaklaşımına katkıda bulunmak, uygulanabilirliğini göstermek ve klinik biyokimya laboratuvarlarında kullanımı ve özellikle maliyetsiz olarak kalite kontrole katkısı olduğu için güncelliğini ve nasıl uygulanabileceğini göstermektir. Bu konuda daha uzun süreli, daha çok hasta verisi içeren çalışmalara gerek duyulacağı yadsınamaz.

Referanslar

- [1] Westgard JO. (Erişim: Mart 2008) Six sigma-patient data for assessing process performance and stability. <http://www.westgard.com/qcapp17.htm>
- [2] Hoffmann RG, Waid ME. (1965) The 'average of normals' method of quality control. *Am J Clin Pathol.* 43:134-141.
- [3] Solberg HE. (1994) Using a hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clin Chem.* 40:2205-2206
- [4] Kazmierczak S C. (2003) Laboratory quality control: using patient data to assess analytical performance. *Clin Chem Lab Med.* 41: 617-27.
- [5] Westgard JO. (1992) Charts of operational process specifications ("OPSpecs charts") for assessing the precision, accuracy, and quality control needed to satisfy proficiency testing criteria. *Clin Chem.* 38: 1226-1223
- [6] Cembrowski GS. (1997). Thoughts on quality – control systems: a laboratorian's perspective. *Clin Chem.* 43:886-892.
- [7] Westgard JO, Smith FA, Mountain PJ, Boss S. (1996) Design and assessment of average of normals (AON) patient data algorithms to maximize run lengths for automatic process control. *Clin Chem.* 42:1683-1688.
- [8] Westgard JO. (Erişim: Mart 2008). Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from biologic variation. <http://www.westgard.com/biodatabasel.htm>.
- [9] Tanyalcin T, Aslan D, Kurtulmus Y, Gökalp N, Kumanlioğlu K. (2000) Reference intervals of serum folate and vitamin B12 developed from data of healthy subjects. *Accred Qual Assur.* 5:383-387.
- [10] İlçöl YÖ, Aslan D. (2004) Determining reference value of blood chemistry profile in healthy subjects in Bursa. *Turk J Biochem.* 29:183-192.
- [11] Lott JA, Smith DA, Mitchell LC, Moeschberger ML. (1996) Use of medians and "use of average of normals" of patients data for assessment of long-term analytical stability. *Clin Chem.* 42: 888-892.
- [12] Martin HF, Hologgitas JV, Driscoll J, Fanger H, Gudzinowicz BJ. (1981) Reference values based on populations accessible to hospitals. (Editors:) Gräsbeck R, Alström T, Reference values in laboratory medicine. pp. 233-62. Chichester. Willey.
- [13] Cembrowski GS, Chandler EP, Westgard JO. (1984) Assessment of 'average of normals' quality control procedures and guidelines for implementation. *Am J Clin Pathol.* 81:492-499.