



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**CK-MB ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN İMMÜNOİNHİBİSYON
YÖNTEM İLE İMMÜNOASSAY YÖNTEMİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE ANTİKOAGÜLANLI TÜPLERİN
CK-MB DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet Burak GÜRPINAR
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANLARI
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN
Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK**

HATAY-2013

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**CK-MB ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN İMMÜNOİNHİBİSYON
YÖNTEM İLE İMMÜNOASSAY YÖNTEMİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE ANTİKOAGÜLANLI TÜPLERİN
CK-MB DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet Burak GÜRPINAR
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANLARI
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN
Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK**

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 9183 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

CK-MB ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN İMMÜNOİNHİBİSYON YÖNTEM İLE İMMÜNOASSAY YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI VE ANTİKOAGÜLANLI TÜPLERİN CK-MB DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Ahmet Burak GÜRPINAR

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....
Prof. Dr. Ali ÖZCAN
Tıp Fakültesi Dekan V.

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN
Ana Bilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN
Tez Danışmanı

.....
Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ

1. Doç. Dr.
2. Doç. Dr.
3. Yrd. Doç. Dr.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	xi
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. AKUT KORONER SENDROMLARIN TANIMI	3
2.2. AKUT KORONER SENDROMUN SINIFLANDIRILMASI	4
2.3. MİYOKARDİYAL HASARIN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİ	4
2.3.1. Aspartat Aminotransferaz (AST)	6
2.3.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH)	6
2.3.3. Kreatin Kinaz (CK)	6
2.3.4. Myoglobin	10
2.3.5. Troponin	10
2.4. KREATİN KİNAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ İÇİN KULLANILAN BİYOKİMYASAL ANALİZER	11

2.5. KREATİN KİNAZ İZOENZİMLERİNİN TAYİNİ İÇİN KULLANILAN BİYOKİMYASAL ANALİZER	12
2.5.1. Elektroforez	13
2.5.2. İyon-değiştirici Kromatografi	14
2.5.3. İmmünolojik Yöntemler	14
2.6. LABORATUVARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİNİN SEÇİMİ VE ANALİTİK PERFORMANSLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	15
2.6.1. Metod Validasyonu Nedir? Neden Gereklidir?	16
2.6.2. Analitik Performans Parametreleri	18
2.6.3. Analitik Hedefler	23
2.7. LABORATUVARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİNİN ANALİTİK PERFORMANSLARININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE UYGULANAN PROTOKOLLER	28
2.7.1. Tekrarlanabilirlik Çalışması (EP5-A Protokolü)	29
2.7.2. Linearite Çalışması (EP6-A Protokolü)	31
2.7.3. İnterferans Çalışması (EP7-A Protokolü)	33
2.7.4. Hasta Örneklerini Kullanarak Yöntem Karşılaştırma Ve Bias Hesaplama (EP9-A Protokolü)	34
2.8. YÖNTEM KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN İSTATİKSEL TEKNİKLERİN TANIMLANMASI	37
2.8.1. F-Testi	38
2.8.2. Korelasyon Katsayısı	38
2.8.3. Eşleşmiş t-Testi	39
2.8.4. Regresyon Analizleri	40
2.8.5. Bland & Altman Grafiği	45

2.9. LABORATUVARDA YÖNTEMLERİNİN TANISAL YETERLİLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	48
2.9.1. Tanısal Yeterlilik İçin Kullanılan Ölçütler	49
2.9.2. Tanısal Yeterlilik İçin ROC Analizinin Kullanılması	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. GEREÇ	54
3.1.1. Ön Değerlendirme Deneyleri	54
3.1.2. Son Değerlendirme Deneyleri	58
3.1.3. ROC Analizi Eğrisinin Çizilmesi	59
3.1.4. Plazma Örnekleri İle Serum Örneklerinin Karşılaştırılması	59
3.2. YÖNTEM	60
3.2.1. Ölçüm Yapılan Cihazların Ölçüm Prensipleri	60
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	63
4. BULGULAR	65
4.1. TEKRARLANABİLİRLİK ÇALIŞMASINA AİT BULGULAR	65
4.2. GERİ KAZANIM ÇALIŞMASINA AİT BULGULAR	74
4.3. İNTERFERANS ÇALIŞMASINA AİT BULGULAR	77
4.4. YÖNTEM KARŞILAŞTIRMA ÇALIŞMASINA AİT BULGULAR	86
4.5. ROC ANALİZİNE AİT BULGULAR	90
4.6. PLAZMA İLE SERUM ÖRNEKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASINA AİT BULGULAR	92
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	119
7. KAYNAKLAR	125
8. ÖZGEÇMİŞ	140

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Dokularda CK izoenzimlerinin % Aktivite Olarak Dağılımı	8
Tablo 2: Yöntem Değerlendirme Deneyleri.....	29
Tablo 3: Tanı testinin değerlendirilmesinde karşılaşılan durumlar.....	49
Tablo 4: CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle için birey-içi, bireyler-arası biyolojik varyasyon değerleri ile arzu edilen belirsizlik, arzu edilen doğruluk ve izin verilebilir total hata değerleri.....	67
Tablo 5: Architect c 8000 Biyokimya cihazında deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait elde edilen bulgular	67
Tablo 6: Architect i 1000 SR Hormon cihazında deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait elde edilen bulgular	68
Tablo 7: Architect c 8000 Biyokimya cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait elde edilen bulgular	69
Tablo 8: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait değerler	70
Tablo 9: Architect i 1000 SR Hormon cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait elde edilen bulgular	71
Tablo 10: Architect i 1000 SR Hormon cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait elde edilen bulgular.....	72
Tablo 11: Architect c 8000 cihazı ve Architect i 1000 SR cihazı için hesaplanan (CVw-day), (CVb-day) ve (CVan-total) değerleri.....	74
Tablo 12: Architect c 8000 Biyokimya cihazı için normal ve patolojik serum düzeylerinde yapılan geri kazanım çalışması.....	76

Tablo 13: Architect i 1000 SR Hormon cihazı için normal ve patolojik serum düzeylerinde yapılan geri kazanım çalışması.....	77
Tablo 14: Normal düzey serum havuzunda Hb, CK-MB Aktivite, CK-MB Kütle ve % Bias değerleri	79
Tablo 15: Patolojik düzey serum havuzunda Hb, CK-MB Aktivite, CK-MB Kütle ve % Bias değerleri	80
Tablo 16: Her iki cihazdaki CK-MB ölçümlerine ait duyarlılık ve özgüllük değerleri	90
Tablo 17: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, plazma ile serum örneklerinin karşılaştırılması	93
Tablo 18: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, plazma ile serum örneklerinin karşılaştırılması	95
Tablo 19: Her iki cihazda ölçülen, plazma ve serum örneklerinin ortalama, standart sapma, ortanca, en düşük ve en yüksek değerleri	96
Tablo 20: Her iki cihaz için plazma ile serum örnekleri arasındaki ilişki	97

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Akut koroner sendromların başvuru EKG'sine göre sınıflandırılması	4
Şekil 2: AMİ sonrasında saptanan serum enzim düzeyleri.....	5
Şekil 3: Kreatin kinaz enziminin işlevi.....	7
Şekil 4: Kreatin kinaz enzim tayininde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar	11
Şekil 5: Kreatin kinazın tipik ve atipik izoenzimleri ile izoformlarının elektroforetik göçü.....	13
Şekil 6: Toplam hata, rastgele hata ve sistematik hatayı gösteren grafik.....	19
Şekil 7: Sabit ve oransal sistematik hatanın grafiksel gösterimi	20
Şekil 8: Doğruluk ve Kesinliğin grafiksel olarak gösterimi	21
Şekil 9: Yöntem karşılaştırma deneylerinde kullanılan istatistiksel ölçütler	38
Şekil 10: Grafiksel olarak Deming ve En Küçük Kareler Regresyon Tekniği.....	44
Şekil 11: İki farklı ölçüm yönteminin Bland-Altman (ortalama ve farklar) grafiği ..	46
Şekil 12: Bland-Altman Grafiği ve % 95 uyum sınırları.....	47
Şekil 13: Bland-Altman Uyum Grafisi ile sistematik oransal farklılık ve sistematik sabit farklılığın gösterilmesi.....	47
Şekil 14: İdeal ve Kötü performans göstergesi olan ROC eğrileri	52
Şekil 15: Kreatin kinaz enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyonların gösterimi.....	61
Şekil 16: Architect c8000 Biyokimya cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait değerlerin noktasal dağılımı	68

Şekil 17: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait değerlerin noktasal dağılımı	69
Şekil 18: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı	70
Şekil 19: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı	71
Şekil 20: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı	72
Şekil 21: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı	73
Şekil 22: Normal düzey için, artan Hb konsantrasyonuna bağlı olarak, aktivite ve kütle ölçümlerinde görülen % Bias	81
Şekil 23: Patolojik düzey için, artan Hb konsantrasyonuna bağlı olarak, aktivite ve kütle ölçümlerinde görülen % Bias	81
Şekil 24: CK-MB aktivite ölçümünden elde edilen % Bias değerlerinin, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları için, izin verilen % Bias' a göre karşılaştırılması	82
Şekil 25: CK-MB kütle ölçümünden elde edilen % Bias değerlerinin, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları için, izin verilen % Bias' a göre karşılaştırılması	83
Şekil 26: CK-MB aktivite ölçümünde, normal düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki	84
Şekil 27: CK-MB aktivite ölçümünde, patolojik düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki	84
Şekil 28: CK-MB kütle ölçümünde, normal düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki	85

Şekil 29: CK-MB kütle ölçümünde, patolojik düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki	85
Şekil 30: CK-MB kütle ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite ölçüm yönteminin korelasyon analizi.....	86
Şekil 31: CK-MB kütle ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite ölçüm yönteminin lineer regresyon analizi	87
Şekil 32: CK-MB kütle ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite ölçüm yönteminin Passing-Bablok regresyon analizi	88
Şekil 33: CK-MB aktivite yöntemiyle ölçülen değerler (y) ile lineer regresyon denkleminde hesaplanan (y') değerleri	89
Şekil 34: Hesaplanan değerler ile ölçülen değerlere ait Bland-Altman Grafiği	89
Şekil 35: Her iki cihaza ait ROC eğrilerinin karşılaştırılması	91
Şekil 36: Hasta ve sağlam kişilerin, üst referans değerlerine göre dağılım grafiği ...	92
Şekil 37: Architect c 8000 biyokimya cihazında, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB aktivite ölçüm değerleri	94
Şekil 38: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB kütle ölçüm değerleri	95
Şekil 39: Her iki cihazda ölçülen, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB ölçüm değerleri.....	97

KISALTMALAR

AMI	: Akut Myokard İnfarktüsü
EKG	: Elektrokardiyogram
AST	: Aspartat Aminotransferaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
CK	: Kreatinin Kinaz
CK-MB	: Kreatinin Kinaz-MB
TnT	: Troponin-T
TnI	: Troponin-I
Myo	: Miyoglobin
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
AKS	: Akut Koroner Sendrom
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
USAP	: Unstable Angina Pektoris
ESC	: Amerikan Kardiyoloji Derneği
ACC	: Amerikan Kardiyoloji Koleji
SGOT	: Serum Glutamik Oksaloasetik Asit Transferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
Mg	: Magnezyum
Ca	: Kalsiyum
Zn	: Çinko
Cu	: Bakır
RIA	: Radyoimmünoassay
cTnI	: Kardiyak Troponin I
cTnT	: Kardiyak Troponin T
Cr	: Kreatin
CrP	: Kreatin Fosfat
HK	: Hekzokinaz
G6P	: Glukoz-6-fosfat
G6PD	: Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
EDTA	: Etilen Daimin Tetraasetik Asit
AK	: Adenilat Kinaz
Ap5A	: Adenozin Pentafosfat
AMP	: Adenozin Monofosfat
IFCC	: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
CLIA	: Clinical Laboratory Improvement Amendments
ISO	: International Organization for Standardization
LOD	: Limit of Detection
LOQ	: Limit of Quantitation
CV	: Coefficient of Variation

VK	: Varyasyon Katsayısı
SD	: Standart Sapma
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
TEA	: Total Allowable Error
CV _I	: Birey-içi Varyasyon Katsayısı
CV _G	: Bireyler-arası Varyasyon Katsayısı
CV _A	: Analitik Varyasyon Katsayısı
İKK	: İstatiksel Kalite Kontrolü
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
TE	: Total Error (Toplam Hata)
CV _w	: Bireyler-arası Varyasyon Katsayısı
CV _{w-day}	: Gün-içi Analitik Varyasyon Katsayısı
CV _{b-day}	: Günler-arası Analitik Varyasyon Katsayısı
CV _{an-total}	: Total Analitik Hata Varyasyon Katsayısı
SE	: Systematic Error
RE	: Random Error
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
EP	: Evaluation Protocol
SDd	: Farkların Standart Sapması
EKK	: En Küçük Kareler
P-B	: Passing-Bablok
CUSUM	: Cumulative Sum
ROC	: Receiver Operating Characteristic
AUC	: Area Under Curve
Hb	: Hemoglobin
J	: Jelli Biyokimya Tüpü
Li.H	: Lityum Heparinli Tüp
MES	: 2-(N-Morpholino) Etan Sülfonik Asit
CMIA	: Kemiluminesans Mikropartikül Enzim Immunoassay
RLU	: Rölatif Işık Üniteleri
MedCalc	: Medical Calculator
NACB	: National Academy of Clinical Biochemistry
UKBA	: Ulusal Klinik Biyokimya Akademisi
SKK	: Sınıf-İçi Korelasyon Katsayısı
CKK	: Concordance Korelasyon Katsayısı
SGK	: Sosyal Güvenlik Kurumu
SUT	: Sağlık Uygulama Tebliği

TEŞEKKÜR

Gerek eğitimim sırasında gerekse de tez konumun belirlenmesi, tezimle ilgili pratik çalışmaların yapılması ve tezimin yazılması aşamalarında bana yol gösterici olan, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sadece hocalarım olarak görmeyip, abim olarak saydığım danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Zafer YÖNDEN ve Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK hocalarıma, Ana Bilim Dalımız öğretim üyeleri, Sayın Prof. Dr. Ali ÖZCAN ve Sayın Yard. Doç. Dr. Sedat MOTOR hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum can dostum Dr. Özgür Yıldırım KURTGÖZ' e, asistan doktor arkadaşlarım Dr. Mehmet GENÇ, Dr. Kemal Türker ULUTAŞ, Dr. Yeşim CAN, Dr. Rana YÜKSEL' e, labotaruvarında fedakarca çalışan teknisyen arkadaşlarıma ve benden maddi-manevi desteklerini eksik etmeyen, her zaman yanımda olan canım annem ve babama, ayrıca uzun süren tez çalışması ve yazım aşamalarında zamanından fedakarlık yapan sevgili eşim Yeliz ŞENGÜL GÜRPINAR' a ve biricik kızım Defne' me çok teşekkür ederim.

Ahmet Burak GÜRPINAR

HATAY/2013

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Akut Miyokard İnfarktüsü tanısında laboratuvar belirteçlerinden birisi olan CK-MB parametresinin ölçümü için kullanılan immünoinhibisyon (CK-MB aktivite) yöntemi ile immünoassay (CK-MB kütle) yönteminin analitik performansları ve tanısal yeterlilikleri değerlendirildi. Ölçüm yöntemlerinin güvenilirliği değerlendirilerek, ekonomik açıdan uygun olan yöntemin referans yöntem ile kıyaslanması amaçlandı. Ayrıca biyokimya tüpü ve antikoagülanlı tüpler kullanılarak, serum ve plazma örneklerinde CK-MB sonuçları arasında fark olup olmadığı incelendi.

Yöntem: İmmünoinhibisyon yöntemiyle çalışan Architect c 8000 cihazı ve Kemilüminesans İmmünoassay yöntemiyle çalışan Architect I 1000 SR cihazlarının analitik performansların belirlenmesi için geri kazanım, interferans, yöntem karşılaştırma ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Cihazlara ait tanısal yeterliliğin değerlendirilmesi için ROC analizi yapıldı. Ayrıca biyokimya tüpü ve antikoagülanlı tüpler kullanılarak, serum ve plazma örnekleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Architect I 1000 SR cihazına ait deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik sonuçları, CK-MB kütle ölçümü için arzu edilen %belirsizlik (%9.2) değerinden daha küçük bulundu. Architect c 8000 cihazına ait deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik sonuçları, CK-MB aktivite ölçümü için normal düzeyde arzu edilen %belirsizlik (%9.9) değerinden daha yüksek ancak patolojik düzeyde daha düşük bulundu. Architect I 1000 SR cihazında ortalama %92.5 geri kazanım, Architect c 8000 cihazında ortalama %92.9 geri kazanım tespit edildi. Yöntem karşılaştırma deneyinde, iki cihaz arasında korelasyon katsayısı (r) 0.976 olarak bulundu. ROC analizinde, 6-8 saat aralığında kan alınan sonuçlarına göre her iki cihazın duyarlılık ve özgüllüklerinin yeterli olduğu tespit edildi.

Sonuç: CK-MB ölçümüne ait iki farklı yöntemin analitik performansları ve tanısal yeterlilikleri değerlendirildiğinde, iki cihazın sonuçları birbiri ile uyumlu bulundu.

Anahtar Kelimeler: CK-MB, İmmünoinhibisyon, Kemilüminesans İmmünoassay

ABSTRACT

Background and Aim: In this study, the analytical performance and diagnostic qualification of immunoassay (CK-MB mass) method and immunoinhibition (CK-MB activity) method which are used for measurement of CK-MB parameter in the diagnosis of acute myocardial infarction were evaluated. The economically viable method was compared with the reference method by evaluating the reliability of measurement methods. Also serum and plasma samples were examined if there is difference between the results of CK-MB by using anticoagulated tubes and biochemistry tubes.

Methods: Recovery, interference, method comparison and precision experiments were carried out for the determination of analytical performance for Architect c 8000 device which uses immunoinhibition method and Architect I 1000 SR device which uses Chemiluminescence Immunoassay method. ROC analysis was performed to evaluate the diagnostic qualification of the devices. Also serum and plasma samples were compared using biochemistry tubes and anticoagulated tubes.

Results: Within-run and between-run precision results of Architect I 1000 SR device were found lower than the desirable % imprecision values (% 9.2) for the measurement of CK-MB mass. Within-run and between-run precision results of Architect c 8000 device were found higher than the desirable % imprecision values (% 9.9) for the measurement of CK-MB activity for normal levels of serum, but lower than the desirable % imprecision values (% 9.9) for pathologic levels of serum. Recovery was detected on average of 92.5% in Architect I 1000 SR, while that was on average of 92.9 % in Architect c 8000 device. In the method comparison study, correlation coefficient(r) between these two devices was found to be 0.976. According to the results of blood taken from the range of 6-8 hours, the sensitivity and specificity of the two devices were found to be adequate on ROC analysis.

Conclusion: When the analytical performance and diagnostic qualification of two different methods of CK-MB measurement were evaluated, the results of two devices were compatible with each other.

Keywords: CK-MB, Immunoinhibition, Chemiluminescence Immunoassay.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde Koroner Arter Hastalığı ve sonrasında gelişen Akut Miyokard İnfarktüsü (AMI) önemli bir sağlık sorunudur. Akut Miyokard İnfarktüsü tanısı; klinik, laboratuvar ve elektrokardiyogram (EKG) değişiklikleri tespit edilerek konmaktadır (1). Ateroskleroz sonucu daralmış bir koroner arterin trombus nedeniyle tıkanmasını izleyerek koroner kan akımında ani azalma sonrası infarktüs ortaya çıkar (2). Hastalığın teşhisinin erken dönemde konulması ve trombolitik tedavinin zamanında yapılmasıyla morbidite ve mortalite olumlu etkilenecek ve hastalığın takibi esnasında çıkabilecek komplikasyonların daha kolay kontrol altına alınması sağlanacaktır (3). Tanının erken konulmasında göğüs ağrısını takiben ortaya çıkan enzim değişikliklerinin EKG değişikliklerinden daha önemli olduğu vurgulanmaktadır. Günümüzde rutin olarak incelenen enzimler aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), kreatin kinaz (CK) ve onun kardiyak izoenzimi kreatin kinaz MB (CK-MB) ve son zamanlarda kullanılmaya başlanan Troponin T (TnT) ve Troponin I (TnI) ile myoglobin (Myo)' dir. Göğüs ağrısı ortaya çıktıktan sonra CK' nin yükselmeye başlaması 12 saati ve pik değer oluşturması 36-48 saati bulur (4, 5). AST ve LDH' in yükselmeye başlaması ve pik oluşturmaları ise daha da uzun sürer. Bu yüzden erken tanıda değerleri yoktur (6). CK-MB ise 3-6 saat içinde yükselmeye başlamakta ve 12-24 saat içinde pik yapmaktadır (4, 5). Benzer şekilde serum Troponin-T düzeyi de erken dönemde yükselmeye başlamaktadır (7, 8). Plazma CK aktivitesi kas yaralanmalarında, akut miyokart enfarktüsü sonrasında ve proteinlerin enerji metabolizması olarak kullanıldığında artmaktadır (9). CK-MB akut kalp dokusu hasarının tespiti ve miyokart enfarktüsünün tanımlanmasında ilk ve önemli bir göstergedir (10, 11). Kreatin kinaz (CK) izoenzimlerinin tayininde elektroforez,

iyon-değiştirici kromatografi ve çeşitli immünoojik yöntemler olmak üzere genellikle üç yöntem, ayırım ve miktar ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır (12). CK-MB' nin katalitik aktivitesinin, immünoinhibisyon yöntemi ile ölçülmesine karşılık, son yıllarda immünokimyasal yöntemler kullanılarak CK-MB kütle konsantrasyonu ölçülebilmektedir. Kütle ölçüm yöntemleri, aktiviteye dayalı ölçüm yöntemlerine göre daha hassastır (13).

Bu çalışmada; AMI tanısında, laboratuvar belirteçlerinden birisi olan CK-MB parametresinin ölçümü için kullanılan immünoinhibisyon (CK-MB enzim aktivite) yöntemi ile immünoassay (CK-MB kütle) yönteminin analitik performansları ve tanısal yeterlilikleri değerlendirildi. Ölçüm yöntemlerinin güvenilirliği değerlendirilerek, ekonomik açıdan uygun olan yöntemin referans yöntem ile kıyaslanması amaçlandı. Ayrıca antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüpler kullanılarak, serum ve plazma örneklerinde CK-MB sonuçları arasında fark olup olmadığı incelendi.

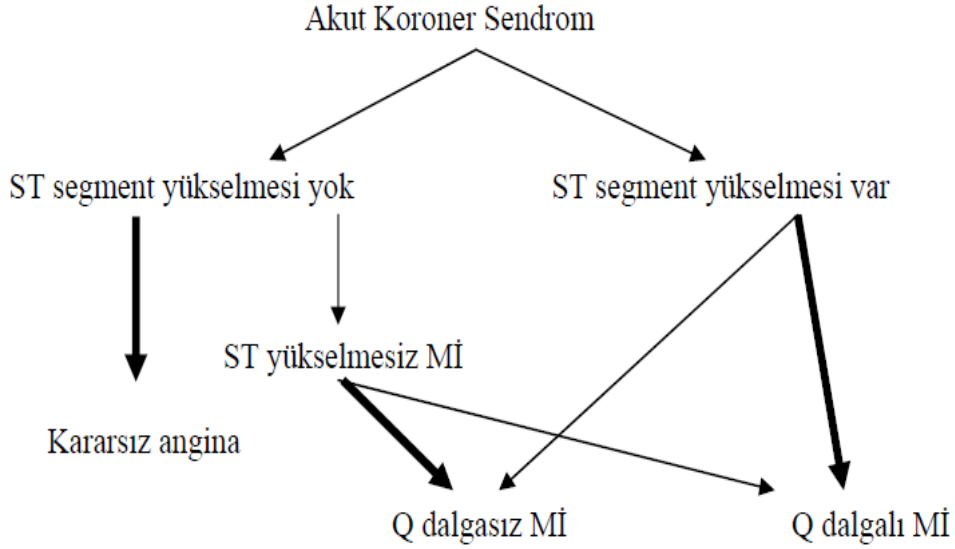
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Koroner Sendromların Tanımı

Kardiyovasküler hastalıklar birçok ülkede tüm etnik gruplardaki erkek ve kadınlarda ölüm nedeni olarak ilk sırada yer almakta ve aynı derecede önemli olarak yaşamı kısıtlamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2020 yılı için hazırladığı yaşamı kısıtlayan hastalıklar listesine göre; tüm dünyada, koroner kalp hastalığının (KKH) birinci, inmenin ise dördüncü olacağı belirtilmiştir (14). Koroner kalp hastalığının yıllık maliyeti, birçok hastalık ile kıyaslandığında en üst sırada almaktadır (15). Kardiyovasküler hastalıklar, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de başta gelen ölüm nedenlerindedir. Akut koroner sendrom (AKS), stabil olmayan göğüs ağrısından (USAP), akut miyokard infarktüsüne (AMİ) kadar değişebilen farklı klinik tablolarla karşımıza çıkar (16). Akut koroner sendrom (AKS); koroner arter plağının yırtılması sonucu, tromboz veya miyokard perfüzyonunun farklı derecelerde bozulmasına neden olan acil klinik sendromlar olarak tanımlanmaktadır (17). Göğüs ağrısı akut koroner sendromun (AKS)' un başlangıcındaki ilk ve tek şikâyet olabilir. Akut koroner sendromun tanısı, risk faktörlerinin değerlendirilmesi, dikkatli ve hızlı EKG değerlendirilmesi ve kardiyak enzimlerin ölçülmesi temelindedir. Plazmaya, hasarlanmış kardiyak dokudan kardiyak proteinlerin salınması, akut miyokard infarktüsünün (AMI) varlığı veya yokluğu için önemli bir tanısal parametredir (18).

2.2 Akut Koroner Sendromun Sınıflandırılması

Akut miyokard iskemisine bağlı gelişen klinik tabloların tümü AKS olarak tanımlanır. Bu klinik tablo, kararsız angina, ST-segment yükselmesi olan ve olmayan miyokard infarktüsünü içerir (Şekil-1) (17).



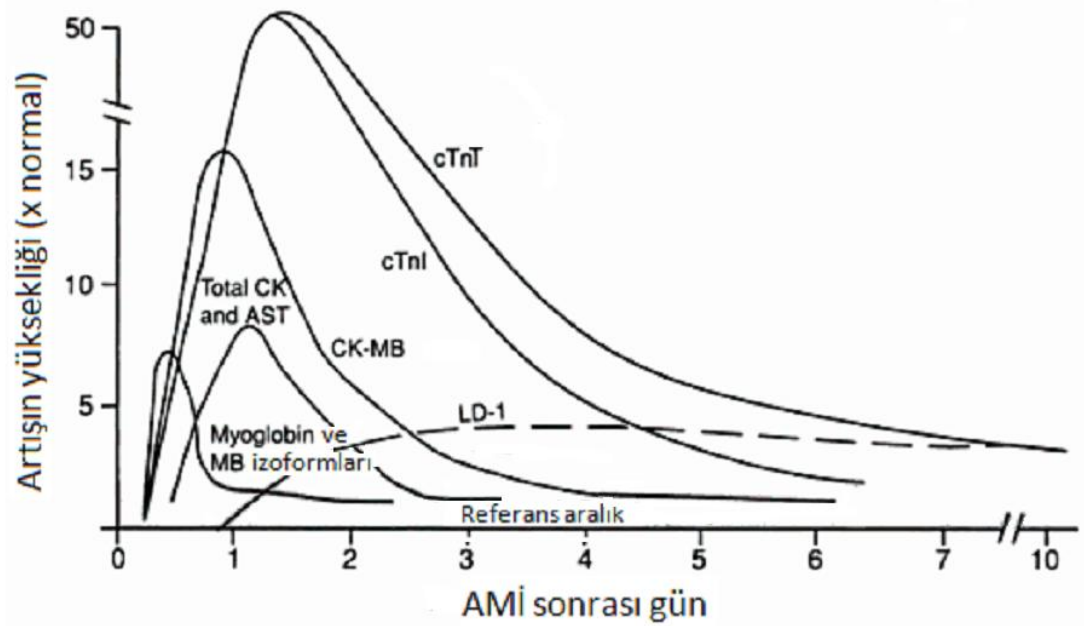
Şekil 1: Akut koroner sendromların başvuru EKG'sine göre sınıflandırılması

2.3. Miyokardiyal Hasarın Biyokimyasal Belirteçleri

Miyokard infarktüsü tanısı, Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) ve Amerikan Kardiyoloji Koleji'nin (ACC) son ortak raporuna göre, biyokimyasal belirteçlerden CK-MB ve/veya Troponin T veya I yüksekliğine ilaveten miyokardiyal iskemi ile uyumlu belirtilerin varlığı (özellikle angina pectoris) ile konabilir (17). Miyokard infarktüsü uzamış iskemi sonucu meydana gelen irreversibl kalp kası nekrozudur. Miyokard infarktüsünün şiddeti, miyokard hücrelerinin oksijen ihtiyacı ile koroner kan akımı arasındaki dengesizliğin derecesi ve süresi ile yakından ilişkilidir. İnfarktüsün ileri dönem bulguları, nekroze olmuş miyokard dokusunun yaygınlığına bağlıdır. Semptom ve bulgular, uzamış iskemi esnasında gelişen fizyolojik, hücresel ve biyokimyasal değişikliklerin göstergesidir (19). Miyokardiyal hücreler nekroza uğradıklarında membran bütünlüğü kaybolur ve hücre içi makromoleküller kardiyak interstisyuma diffüze olurlar. İnfarktüs bölgesinden de mikrovasküler yapı ve

lenfatikler ile dolaşıma geçerler (20). Bunlara “serum kardiyak belirteçleri” denir. Hasarlı miyositlerden dolaşıma salınan başlıca proteinler miyoglobin, CK ve CK-MB, troponinler (I ve T), aspartat aminotransferaz ve laktat dehidrogenazdır. Kardiyak spesifik troponin T ve I, akut MI’ da yeni markerler olarak kullanıma girmiştir (21).

Optimal bir özgünlük için; biyokimyasal belirteçlerin miyokarda yüksek oranda bulunması, buna karşılık başka dokuda ve serumda hiç bulunmaması gerekir. Optimal duyarlılık için ise miyokard hasarını takiben süratle seruma çıkması ve serumdaki miktarı ile hasarın derecesi arasında uyum olması gereklidir. Ayrıca ölçüm metodunun kolay ve ucuz olması ve tanıya olanak sağlayacak kadar yeterli sürede serumda yüksek düzeyde kalması gerekmektedir (22). Miyokard hasarının tanımlanmasında sıklıkla kreatin kinaz-miyokardiyal band (CK-MB), Myoglobin, Troponin T ve I kullanılmaktadır. LDH ve AST, duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (23). AMI sonrası kanda saptanan serum enzimlerinin günlere göre yükselme eğrileri Şekil-2’ de gösterilmiştir (24).



Şekil 2: AMI sonrasında saptanan serum enzim düzeyleri

2.3.1. Aspartat Transaminaz (AST)

Serum glutamik oksaloasetik asit transferaz (SGOT) olarak bilinen bu enzim uzun yıllardan beri akut miyokard infarktüsü tanısında kullanılmaktadır. Miyokard infarktüsünün 8-12. saatlerinde yükselmeye başlar, 24-72 saatte pik yapar ve 2-5 gün yüksek olarak devam eder. Serum seviyeleri konjestif kalp yetmezliğinde, karaciğer hastalığı durumunda, iskelet kası hasarında, miyokarditte, paroksizmal taşikardi ataklarında, dissekan anevrizmada ve pankreatitte de yükseldiği için çok spesifik değildir (25). Aspartat transaminaz ölçümleri (AST) bugün artık tanı koymada çok fazla kullanılmamaktadır (26).

2.3.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Laktat dehidrogenaz, kreatin kinaz enzimi gibi kalp dışında böbrekler, eritrositler, beyin, mide ve iskelet kasında da yaygındır. LDH' in 5 izoenzimi vardır, bunlardan LDH-1 ve LDH-2 izoenzimleri miyokard iskemisi tanısında kullanılır. LDH-1 enzimi miyokard infarktüsünde ve lösemi gibi durumlarda yükselir. LDH-2 iskelet kası hariç vücudun diğer bütün dokularından ama en belirgin olarak kalpten salınır (27). Serum total LDH aktivitesi göğüs ağrısı başladıktan 8-12 saat sonra yükselir, 24-48 saat sonra tepe değerine ulaşır, yedi gün veya daha uzun süre yüksek kalır. Aktivitedeki artış genellikle referans değerinin üst sınırının 3-4 katı olmakla birlikte 10 katı kadar da olabilir. LDH-1 izoenzimi kalp kasına daha spesifik olduğundan tanı koymada daha yararlıdır (26). LDH-1/LDH-2 oranı 1'den büyükse miyokard nekrozunu gösterir (25). Normalde serumda LDH-2, LDH-1' den daha fazla miktarda bulunur. Miyokard infarktüsü durumunda ise LDH-1, LDH-2' den daha fazla yükselir. Bu durum 7-10 gün içinde normale döner (28). LDH' in günümüzde tek kullanım alanı; geç dönemde başvuran, troponinleri pozitif, CK ve CK-MB düzeyleri normale dönmüş olan hastalarda akut-subakut MI ayrımını yapmaktır (29).

2.3.3. Kreatin Kinaz (CK)

Kreatin kinaz, (adenozin trifosfat: kreatin N-fosfotransferaz; CK) 82 kDa ağırlığında dimerik bir enzim olup ATP tarafından kreatinin tersinir fosforilasyonunu katalize eder (Şekil-3).



Şekil 3: Kreatin kinaz enziminin işlevi

Fizyolojik olarak, kas kasılması sırasında ATP, ADP' ye dönüşür. CK, kreatin fosfatı fosforilasyon kaynağı olarak kullanıp ADP' yi tekrar ATP' ye fosforile eder. İleri yönlü reaksiyonun optimal pH değeri 9.0 iken, geri tepkimenin optimal pH değeri 6.7'dir. Bu yüzden fizyolojik pH' da reaksiyon sola doğru olup, ATP oluşumu yönündedir. Tüm kinazlarda olduğu gibi magnezyum (Mg) zorunlu aktivatör iyondur. Enzim, mangan (Mn), kalsiyum (Ca), çinko (Zn), ve bakır (Cu) gibi metal iyonları tarafından inhibe edilir. Ayrıca iodoasetat, sülfidril bağlayan bileşikler, yüksek ADP konsantrasyonu, sitrat, nitrat, bromür, malonat, urat ve sistin serumda bulunan enzimin güçlü inhibitörüdürler. Serumda bulunan kreatin kinaz enzimi göreceli olarak kararsızdır ve enzimin aktif bölgelerinde bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu ile aktivitesi kaybolur. Enzim aktivitesi enzimin sülfidril bileşikleri (N-asetilsistein, monotiyoğliserol, ditiyoeritritol, glutatyon) ile inkübe edilmesi ile kısmen geri kazanılabilir (13).

Kreatin kinaz aktivitesi en yüksek olarak sırasıyla çizgili kas ve kalp kasında bulunur. Beyin, gastrointestinal sistem ve mesanede daha az oranda bulunurken, eritrositte bulunmaz. Serum CK aktivitesi, cinsiyet, yaş, kas kütlesi, fiziksel aktivite ve ırk gibi birçok fizyolojik faktörden etkilenir (30).

Plazma CK aktivitesi kas yaralanmalarında, akut miyokart enfarktüsü sonrasında ve proteinlerin enerji metabolizması olarak kullanıldığında artar (9).

- Kreatin Kinaz (CK) İzoenzimleri

CK dominant bir enzimdir. Çizgili kas, kalp kası ve beyinde bulunur (31). Kreatin kinaz B ve M olmak üzere iki alt birimden oluşan bir dimerdir. Enzimin aktif formu dimer olduğundan üç tip dimer mevcuttur. Bunlar BB (CK-1), MB (CK-2), MM (CK-3) şeklinde gösterilir.

Kalp dokusunda CK aktivitesinin %70-85' ini CK-MM oluşturur. Geriye kalan kısmı da CK-MB oluşturur (32). İskelet kasındaki CK aktivitesinin %99' unu CK-MM izoenzimi oluşturur (33). CK-MB' nin nerdeyse tamamı miyokartta üretilir. Bununla birlikte çok düşük miktarlarda ince bağırsakta, dilde, diyafragmada, uterus ve prostatta bulunur (34). CK-MB, miyokardiyuma özel bir enzim yapısı olmasına rağmen miyokardın toplam CK aktivitesinin % 15- 30' unu oluşturur (35). Dokulara göre CK izoenzimlerinin dağılımı Tablo-1' de gösterilmiştir (36).

Tablo 1: Dokularda CK izoenzimlerinin % Aktivite Olarak Dağılımı

DOKU	CK-MM %	CK-MB %	CK-BB %
Çizgili Kas	99	1	0
Miyokardium	77	22	1
Beyin	4	0	96

CK-MB, akut kalp dokusu hasarının tesbiti ve miyokart enfarktüsünün tanımlanmasında ilk ve önemli bir göstergedir (10, 11). Akut miyokard infarktüsünün tanımlanmasında kullanılan CK-MB, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir enzimdir (37).

Birçok çalışmada CK-MM ve CK-MB elektroforez ile daha ileri düzeyde ayrıştırılmıştır. En az 3 adet CK-MM izoformu ve en az 4 adet CK-MB izoformunun varlığı gösterilmiştir (38). CK-MM' in doku izoformu CK-MtMt (MM_3) olarak tanımlanır. Bu enzim dolaşıma çıktığında C-terminal lizin residüleri, karboksipeptidaz ile hidroliz olur ve sonuçta CK-MtMs (MM_1) ile CK-MsMs (MM_2) oluşur. Aynı şekilde CK-MB doku izoformu dolaşıma salındığında aynı enzim tarafından CK-MB₁ ve CK-MB₂ oluşturulur (39).

CK-MB miktarının, serumdaki total CK' nin %5' ini aşması, miyokardiyal hasar olarak değerlendirilir. Bununla beraber bir kez ölçülen CK-MB ile AMI için tanısal değer yaklaşık %60 civarındadır. Seri CK-MB ölçümleri ile tanısal değer % 80-96' ya kadar yükselmektedir. CKMB' nin özgüllüğünü arttırmak için bu miyokardiyal bandın alt formları miyozin zincirinin bulunduğu yere göre tanıda

kullanılabilir. CK-MB₂/CK-MB₁ oranında artış ilk 72 dakikada erken tanıda %95.7 doğruluk sağlamaktadır (23). Akut miyokard infarktüsü başladıktan 4-6 saat sonra CK-MB düzeyinde artış meydana gelir. Bu düzeydeki artış yaklaşık 24 saat sonra maksimum düzeye ulaşır ve 36-72 saat sonra başlangıç düzeyine döner. CK-MB izoenzimi sadece kalp dokusuna özgü olmadığı için, tek bir CK-MB ölçümü ile elde edilen sonuçlar miyokardiyal enfarktüs (MI) göstergesi sayılamaz. Genel olarak MI teşhisi, 6-9 saatlik bir süre için 3 saatlik aralıklarla veya 24 saatlik bir süre için 6-9 saatlik aralıklarla yapılan CK-MB ölçümleri sonucuna göre değerlendirilir (26).

CK-BB beyin dokusuna özgü CK izoenzimidir. Ancak; az da olsa iskelet ve kalp kasındaki toplam CK aktivitesine, özellikle diğer CK formlarının eksikliğinde etkisi vardır. CK-BB' nin yüksekliği beyin dokusundaki hasarı tanımlar (40). İlk olarak Radyoimmünoassay (RIA) metodu ile serumda ve beyin-omurilik sıvısında, akut beyin hasarında CK-BB düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir (41). O zamandan beri CK-BB, merkezi sinir sisteminde kafa travmasına bağlı sinir hasarında prognostik faktör olarak kullanılmaktadır (42, 43). Ayrıca bazı kanser türlerinde CK-BB izoenziminin serumda arttığı tespit edilmiştir. Adenokanserlerde ve anaplastik karsinomalı plevral sıvılı olgularda, CK-BB izoenziminin arttığı bildirilmektedir (44).

İmmünolojik ve elektroforetik hareketliliği nedeni ile diğerlerinden ayrılan dördüncü bir CK izoformu daha mevcuttur. Bu izoenzim mitokondri iç ve dış membranı arasında bulunan mitokondriyal kreatin kinazdır (CK-Mt). Mitokondriyal kreatin kinazın iki izoformu vardır ve her izoform da dimerik yapıdan oluşmuştur. Özellikle kalpte, total CK aktivitesinin % 15' ini CK-Mt oluşturur (45).

CK aktivitesi, ayrıca makromoleküler form olarak da bulunabilir (makro-CK). İki tür Makro CK tarif edilmiştir. Makro CK Tip-1; antijen-antikor reaksiyonu ile oluşan bir İzoenzim-İmmüoglobülin kompleksidir. Tip 1 Makro CK' nin en yaygın biçimi CKBB-IgG kompleksidir. Makro CK Tip-2' nin ise sitoplazmik olmasından ziyade mitokondriyal kökenli olduğu düşünülmektedir (46). Makro CK Tip-2 elektroforetik olarak CK-MM' nin katoda yakın bölümünde saptanır ve yüksek enerjik aktiviteye sahiptir (47). Hastanede yatmakta olan hastalarda geçici olarak %6' ya kadar Makro-CK varlığı bulunabilir. Ancak bunların çok azında yüksek

serum CK aktivitesi mevcuttur. Makro-CK, CK-MB' nin immünoinhibisyon metoduna dayalı ölçümlerini interfere edebilir (48).

2.3.4. Myoglobin

Miyokard hasarında en erken yükselen biomarkerlardan birisi de miyoglobindir. İlk 3 saatte yükselmesine karşın hem kasta hem de kalpte bulunması özgüllüğünü azaltmaktadır. Özgüllüğünü artırmak için yapılan araştırmalarda Miyoglobin/Carbonik Anhidraz III oranı kullanılır. Bu oranın 1 olması durumunda miyoglobindeki yükselmenin kardiyak kökenli olduğu söylenmektedir (49). Miyoglobin aynı zamanda reperfüzyonun da erken ve iyi bir göstergesidir. Nöromusküler hastalıklar, böbrek yetmezliği, intramusküler enjeksiyon, aşırı egzersiz, çeşitli ilaçlar ve toksinler miyoglobin düzeyinin yükselmesine neden olabilir (50).

2.3.5. Troponin

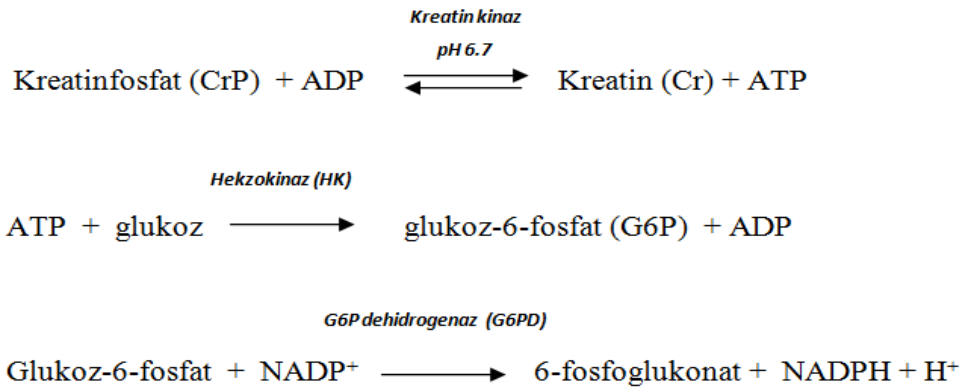
Kardiyak troponinler (cTn), kalp kasındaki yapısal ve düzenleyici proteinler arasında yer alır. Yüksek klinik duyarlılık ve özgüllüklerinin olması, troponinleri akut koroner sedromlarda tanı, risk belirleme ve tedavi yaklaşımında tercih edilen markerlar haline getirmektedir (51). Troponin çizgili kasın miyofibril şeklindeki proteindir. Troponin kompleksi Troponin I, Troponin C, ve Troponin T' den oluşur. Troponin-C (Tn-C) kalsiyumu bağlar, Troponin I (Tn-I) aktine bağlanır ve aktin miyozin etkileşimini önler, Troponin T (Tn-T) ise tropomiyozine bağlanır ve troponin kompleksinin ince flamana bağlanmasını sağlar. Aktin ve miyozininin kalsiyum bağımlı etkileşimini sağlarlar. Troponin kompleksinin % 6' sı sitoplazmada çözülmüş halde bulunur. Miyokarda Tn-T' nin ise % 5' i sitoplazmada çözülmüş halde bulunurken % 95' i miyofibrillere bağlı olarak bulunmaktadır. Tn-T' nin yarı ömrü 120 dakika olmakla beraber serumda uzun süre bulunması harabiyete uğramış miyofilamanlardan sürekli salınmasının sonucudur (52). Tn-I' nin sadece kalpte bulunması nedeniyle özgüllüğü %100' dür. Tn-I ilk 6 saatte yükselir ve 7 gün kadar serumda bulunur (53).

Akut miyokard infarktüsünden sonra Tn-T ve I konsantrasyonları serumda artmaya başlar. Bu artış CK-MB' ye benzer ancak normale dönüşleri daha uzun

zaman alır. Yüksek kardiyak özelliklerinden dolayı troponinin alt üniteleri miyokardiyal hasar ve kas hasarının teşhisleri için oldukça uygundur (54). Ayrıca kardiyak hastalığı olmayanlarda serum troponin seviyesi çok düşük miktarda olduğundan, kardiyak hasarın tespitinde CK-MB' ye göre daha düşük ayırt edici konsantrasyonların kullanımına izin vermektedir (55). Troponinlerin kardiyak özgüllüğü yüksek olduğundan, serumda referans limitlerin üzerinde artmış troponin seviyelerinin varlığı kardiyak hasar için iyi bir göstergedir. Böylelikle iskelet kası yaralanmalarına bağlı CK-MB yüksekliklerinin, kardiyak hasara bağlı olan yüksekliklerden ayırt edilmesine imkan sağlarlar. cTnI, CK-MB' den farklı olarak maraton koşucularında, akut veya kronik kas hastalıkları olanlarda veya böbrek hastalıklarında akut kardiyak hasar olmadıkça yükselmez (27, 56). Günümüzdeki kardiyak troponin kitlerinin önemli bir dezavantajı, AMI' ın ilk saatlerinde dolaşımında yeterince troponin bulunmadığından duyarlılıklarının düşük olmasıdır. Bu testlerin periferik kanda ölçülebilmesi için 3-4 saatin geçmesi gerekir (57).

2.4. Kreatin Kinaz (CK) Aktivitesinin Tayini İçin Kullanılan Biyokimyasal Analizler

CK aktivitesinin ölçümünde çok sayıda fotometrik, florometrik ve eşlenmiş enzim yöntemi geliştirilmiştir. Hem Cr (Kreatin) > CrP (Kreatin Fosfat) yönünde ileri reaksiyon, hem de CrP > Cr yönünde ters reaksiyonlar kullanılır (Şekil-4). Günümüzde, Total CK ölçümünde kullanılan tüm ticari kitler ters reaksiyon prensibine göre hazırlanmıştır. Ters reaksiyon, ileri reaksiyona göre 6 kat daha hızlıdır.



Şekil 4: Kreatin kinaz enzim tayininde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar

CK, CrP' ın Cr' ne dönüşümünü katalize eder. Eş zamanlı olarak Adenozin Difosfat (ADP)' ın Adenozin Trifosfat (ATP)' a fosforilasyonu gerçekleşir. Üretilen ATP sonuçta Hekzokinaz/Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (HK/G6PD) enzim sistemi ile Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADP)' ın NADPH' a dönüşümünde kullanılır. Bu dönüşüm de 340 nanometrede spektrofotometrik olarak izlenir. Szasz ve arkadaşları CK aktivasyonu için N-asetilsistein ekleyerek, Ca²⁺ iyonunu bağlamak ve reaksiyon karışımının dayanıklılığını artırmak için etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ekleyerek, ayrıca Adenilat kinaz (AK) inhibisyonunda kullanılmak üzere adenozin pentaşosfat (Ap5A) ve Adenozin monofosfat (AMP) ekleyerek, yöntemi optimize etmişlerdir (58). Daha önce yapılan çalışmalara dayanarak, IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) tarafından 37 °C' de CK ölçümü için referans metod geliştirilmiştir (59).

CK ölçümü için serum ve heparinli plazma örnekleri tercih edilir. Heparin dışındaki diğer antikoagülanlar, CK aktivitesini olumsuz yönde etkilediği için tercih edilmemelidirler. Serumdaki CK aktivitesi, göreceli olarak kararsızdır ve saklanma sırasında hızla kaybolur. Ortalama stabilitesi oda sıcaklığında 8 saatten az olup +4 derecede 48 saat, -20 derecede ise 1 aydır. Örnekler için hafif derecede hemoliz tolere edilebilir, çünkü eritrositler CK aktivitesi içermezler. Ancak orta ve şiddetli hemoliz içeren örneklerde eritrosit içerisinden salınan AK, ATP ve G6P' a bağlı olarak CK ölçümü interfere olmaktadır (13).

CK aktivitesi, zencilerde beyazlara göre ve erkeklerde bayanlara göre daha yüksek düzeylerde bulunmaktadır. IFCC' nin referans prosedürüne göre CK için normal değerler, erkekler için 46-171 IU/L ve bayanlar için 34-145 IU/L' dir (60).

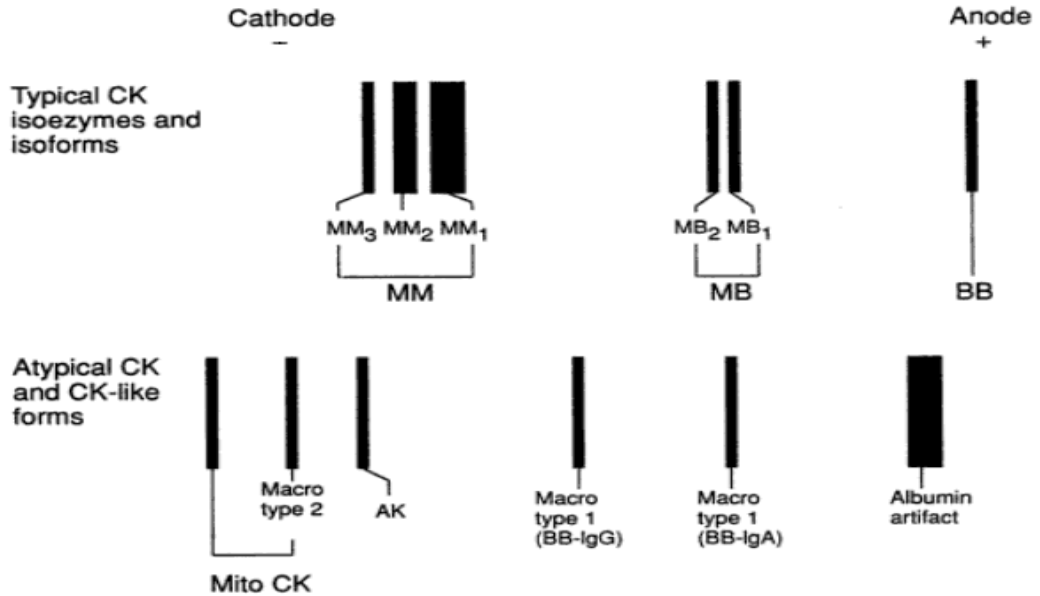
2.5. Kreatin Kinaz (CK) İzoenzimlerinin Tayini İçin Kullanılan Biyokimyasal Analizler

Kreatin kinaz (CK) izoenzimlerinin tayininde elektroforez, iyon-değiştirici kromatografi ve çeşitli immünolojik yöntemler olmak üzere genellikle üç yöntem, ayırım ve miktar ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır (12).

2.5.1. Elektroforez

Elektroforetik yöntemler; agaroz jel ve selüloz asetatır. İzoenzim bandları ters reaksiyona göre düzenlenmiş CK reaktifi karışımı ile inkübe edildikten sonra görünür hale getirilir. Bu reaksiyonda oluşan NADPH uzun ultraviyole dalga boyunda (360 nm) ile eksitasyon sonrasında gözlenen mavi-beyaz floresan ile floresan dansitometrede tespit edilir. CK izoenzimlerinin pH: 8,6 civarında elektroforetik hareketliliği katottan (-), anoda (+) doğru CK-1 (BB), CK-2 (MB), CK-3 (MM) şeklindedir. CK-3 (MM) izoenzimi aplikasyonun uygulandığı katot bölgesinde bulunur.

Elektroforezin dezavantajları; uygulumanın nispeten uzun sürmesi, yoğun emek gerekliliği, klinik kimya analizörlerine uyarlanabilir olmaması ve sonuçların yorumlanması için tecrübe gerekliliğidir (13). CK izoformlarının tamamını gösteren tek metod elektroforez olmasına rağmen, immünojenik yöntemlere göre daha az duyarlıdır (61). Şekil-5' te kreatin kinazın tipik ve atipik izoenzimleri ile izoformlarının elektroforetik göçü gösterilmiştir.



Şekil 5: Kreatin kinazın tipik ve atipik izoenzimleri ile izoformlarının elektroforetik göçü

2.5.2. İyon-değiştirici Kromatografi

İyon-değiştirme tekniği ile CK izoenzimlerinin ayırımında adsorpsiyon veya kolon (veya minikolon) kromatografisi kullanılır (12).

2.5.3. İmmünolojik Yöntemler

CK izoenzimlerinin immünolojik yöntemlerle ölçümü için, CK enziminin M ve B alt birimlerine özğün anti serumlar gerekir. Bu anti seralar spesifik izoenzimlerin çöktürülmesi (immünopresipitasyon) veya spesifik izoenzime yarışmalı olarak bağlanması için kullanılır. Keçi anti serumları, alt birim aktivitesini (immünoinhibisyon) daha etkili şekilde inhibe etmesine karşın, keçi anti serumları ile önceden inhibe edilen CK moleküllerinin çöktürülmesinde eşek anti keçi IgG' si ile birlikte kullanılabilir. İmmünopresipitasyona dayalı yöntemde, serumda bulunan tüm CK-1 (BB) ve CK-2 (MB) izoenzimlerin çöktürülmesinde (santrifüj sonrasında) anti CK-B serumları kullanılmış ve sadece çok az CK-3 (MM) aktivitesi saptanmıştır. Benzer şekilde, CK-M serumları ile tüm CK-3 ve CK-2 çöktürüldükten sonra CK-1 (eğer varsa) ölçülebilir. Daha sonra serum CK içeriği, toplanan CK-1 ve CK-3 aktivitelerinin toplam CK aktivitesinden çıkarılması ile CK-2 aktivitesi hesaplanır (62, 63).

İmmünopresipitasyondan daha basit ve daha hızlı olan immünoinhibisyon tekniği yaygın olarak kullanılır. Anti CK-M serumları inhibisyonu ile CK-3 yapısındaki M alt birimlerinin ikisi ve CK-2 yapısındaki tek M alt birimi inhibe olduğu için CK-2 B alt birimi, CK-1 B alt birimleri ile herhangi makro veya mitokondriyal CK moleküllerine ilişkin ve AK enzim aktiviteleri belirlenir. CK-2 aktivitesinin etkin biçimde belirlenebilmesi için, bu yöntemde analizi yapılan serumda CK-1 aktivitesinin bulunmadığı varsayılır. Bu durum her zaman gerçekleşmez. CK-1 bulunan örneğin aktivitesi, immünoinhibisyon tekniğinin saptama limitinden düşük olan 5 U/L değerinden daha azdır. Bu nedenle, CK-1 girişimi genellikle, göz ardı edilmektedir (12).

İmmünoinhibisyon tekniği ile ölçüm, yerini büyük oranda CK-MB kütle ölçümüne bırakmıştır. CK-MB izoenziminin katalitik aktivitesine dayalı immünoinhibisyon tekniğine karşılık, “immünoassay” ler CK-MB' nin kütle

konsantrasyonlarını ölçerler. Spesifik CK-MB ölçümlerinde “sandviç” tekniği kullanılır. Bu yöntemlerde CK-MB dimerinin farklı kısımlarına afinite gösteren 2 antikor kullanılır. Bu antikorlardan biri B alt birimine, diğeri M alt birimine yöneliktir. Bazı yöntemlerde de sadece MB dimerine yönelik antikorlar kullanılır. İlk antikor genellikle monoklonal olup bir matriks üzerinde sabit hale getirilir. İkinci antikor ise enzim ya da “marker” molekül ile etiketlenir. “Sandviç” yöntemlerde sadece CK-MB tespit edilir. Çünkü ne CK-MM ne de CK-BB her iki antikorla reaksiyon verir. Kütle ölçümleri, aktiviteye dayalı ölçümlere göre çok daha duyarlıdır ve CK-MB yüksekliklerini daha erken tespit ederler. Değişik işaretleyicilerin kullanıldığı birçok kütle ölçüm yöntemi bugün ticari olarak mevcut olup acil ve rutin CK-MB ölçümünde kullanılmaktadır. Kütle ölçüm yöntemlerinin diğer avantajları; stabil olması, hemoliz, antikoagülan ajanlar ve katalitik aktiviteyi etkileyen diğer inhibitörlere bağlı interferanstan etkilenmemesi, ayrıca tam otomatize sistemler ile sonuçların erken zamanda alınması olarak gösterilebilir. Bu sistemlerin tespit sınırı 1 µg/L den azdır. Erkekler için referans üst sınırı 5.0 µg/L’ dir. Kadınlarda bu sınır daha düşük olmasına rağmen birçok laboratuvar tek bir referans değer olarak, erkeklere ait olan referans değeri kullanmaktadır (13, 64).

2.6. Laboratuvarda Kullanılan Ölçüm Yöntemlerinin Seçimi Ve Analitik Performanslarının Değerlendirilmesi

Son yıllarda laboratuvarlarda kullanılan teknolojiler baş döndürücü bir hızla değişmektedir. Bu sayede laboratuvar daha güvenilir ve daha standardize bir hale gelmektedir. Günümüzde klinik laboratuvar sorumluları yöntemleri bizzat geliştirmek yerine, yeni ticari kitleri denemek ve seçmek için daha çok zaman ayırmaktadır. Laboratuvarın veya hastanenin toplam kalitesinin artırılması felsefesi içinde analiz edilecek örneğin türü, hacmi, analiz süresi, testin geri dönüş zamanı gibi çok sayıda etken yöntem seçimi konusunda laboratuvar sorumlularını sürekli arayışa itmektedir. Bir klinik laboratuvar için rutinde kullanılmak üzere yöntem seçimi ve bu yöntemin performansının değerlendirilmesi kalite planlama işinin bir parçası olarak çok önemlidir. Tıbbi yarar sağlamak, teşhiste hassasiyet, doğruluk ve spesifikliğı arttırmak, maliyeti azaltmak gibi çeşitli sebeplerden dolayı eski bir

yöntemin yerine geçmek üzere yeni bir yöntem arayışına girilebilir. En iyi yöntem kendisinden beklenen ihtiyaçların tümünü karşılayandır (65).

2.6.1. Metod Validasyonu (Yöntem Geçerliliği) Nedir? Neden Gereklidir?

Laboratuvar sonuçlarını etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Ana faktörlerden biri analizlerde kullanılan yöntemlerdir. Klinik biyokimya laboratuvarlarında, çoğunlukla vücut sıvılarındaki analitlerin miktarları ölçülmektedir. Kütle, konsantrasyon, aktivite, hacim gibi çeşitli ölçüm sonuçları elde edildiği için, bu analiz yöntemleri ölçüm yöntemleri olarak adlandırılabilir. Hazır kitler (reaktifler) satın alınacağı zaman, ön araştırmalara göre karar verilebilir düşüncesi yaygındır. Çünkü üretici firmalar gerekli ön kontrolleri yaparak ölçülebilir karakteristiklerin değerlerini hesaplamaktadırlar. Fakat önemli olan, ölçüm yönteminin laboratuvar koşullarında istenilen verimle çalıştırılabilmesidir (66). İyi bir tıbbi yaklaşım için, laboratuvar çalışmalarının olabildiğince doğru ve duyarlı bir şekilde yapılması gerekir. Diğer taraftan her laboratuvar, kendi analiz sonuçlarının tutarlı olmasına özen göstermelidir. Bunun için her laboratuvar yöneticisi, kendi laboratuvarına en uygun yöntemi seçmek için kullanılan yöntemlerin özelliklerini bilmek durumundadır (67). Örneğin; görüntüleme cihazı veya kiti belirlerken, yöntem değerlendirilmesinde kullanılan özellikler hakkında bilgi sahibi olmalıdır (68).

Özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD) olmak üzere, birçok ülkede yapılan araştırmalar, güvenilir verilerin elde edilebilmesi için ölçüm yöntemlerinin laboratuvar koşullarında denenerek, performans kriterlerine göre değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Hatta bu deneyler yasalarla zorunlu hale getirilmektedir (66). ABD’ de “Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Final Rule” a göre “***Her laboratuvar, basit serbest testler (waived test) dışında kalan herhangi bir yeni yöntem için validasyon (doğrulama) çalışması yapmalıdır***” şeklinde belirtilmiştir. 2003 yılından beri bu yasaya göre tüm orta ve yüksek karmaşıklıkta test yöntemlerinin (basit testler dışındaki tüm testler) performansı laboratuvarlarda valide edilmelidir. Aynı şekilde Avrupa ülkelerinde de benzer bir durum söz konusudur. Tıbbi laboratuvarlar için geliştirilen ISO (International Organization for Standardization) 15189 standardında şu ifade yer almaktadır: “***Laboratuvar,***

inceleme prosedürlerinin amaçlanan kullanıma uygunluğunun doğrulanmasında sadece geçerliliği kanıtlanmış prosedürleri kullanacaktır. Geçerliliğin kanıtlanması, uygulamanın veya uygulama alanının gerektirdiği boyutlarda olacaktır. Laboratuvar, geçerlilik kanıtlanması için kullanılan prosedürü ve prosedür sonuçlarını kaydedecektir”. Sonuç olarak metod validasyonu tek bir ülkede değil, tüm dünyada standart bir laboratuvar uygulamasıdır (69).

Validasyon; Bir metod veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilip belgelendirilmesidir.

Laboratuvarda kullanılacak bir yöntem ne zaman valide edilmelidir?

- Yeni geliştirildiği zaman
- Laboratuvarda ilk defa uygulanacağı zaman
- Kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapıldığı zaman
- İki yöntem karşılaştırıldığı zaman
- Uzun süre kullanılmayan bir yöntem yeniden kullanılacağı zaman

Validasyon 3 şekilde yapılabilir:

a- Tam validasyon **b-** Kısmi validasyon **c-** Konfirmasyon

a- Tam validasyon: Yöntemin analitik performansını değerlendiren tüm parametreleri kapsar.

Bunlar; - Doğruluk

- Tekrarlanabilirlik
- Analitik Özgüllük
- Analitik Duyarlılık
- İnterfere edici maddeler
- Doğrusallık (Linearite)
- Ölçüm aralığı
- Gözlenebilirlik sınırı (Limit of Detection- LOD)
- Belirlenebilirlik sınırı (Limit of Quantitation- LOQ)

b- Kısmi Validasyon: Performans parametrelerinin bir kısmının incelendiği validasyondur.

c- Konfirmasyon: Doğruluğu kanıtlanmış metotlar için kullanılır. Tekrar validasyona gerek yoktur. Laboratuvar ortamında sadece doğruluk ve tekrarlanabilirlik test edilir (70).

Laboratuvarda kullanıma girecek yeni bir yöntem belirlendikten sonra bu yöntemin ölçülebilir özellikleri deneylerle belirlenir.

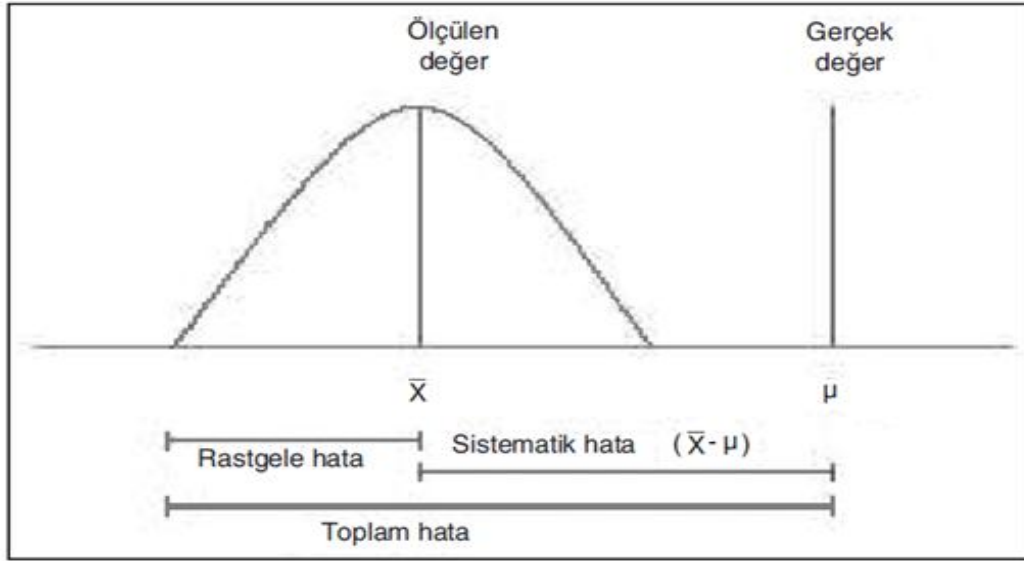
- Yöntem karar kriterlerine (kalite standartlarına, kalite kriterlerine, performans standartlarına-çoğunlukla tıbben müsaade edilen toplam hata değeridir) göre değerlendirilir.
- Referans yöntemle (altın standart) veya güvenilirliği kanıtlanmış bir yöntemle karşılaştırılır.

Yeni yöntemin uygulanıp uygulanmayacağına karar verilir (68).

2.6.2. Analitik Performans Parametreleri

- **Doğruluk:** Ölçülen sonuç ile referans kabul edilen değer arasındaki uyumun birbirine olan yakınlığıdır. Ölçüm aygıtının doğruluğu ise; ölçüm aygıtı ile elde edilen sonuçların, gerçek değere yakın ölçebilme kabiliyetidir (71). Ölçümlerin doğruluğu; geniş bir ölçüm serisinden elde edilen ortalamanın, gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır (72). Ortalama değer ile gerçek değer arasındaki fark “*Bias*” olarak isimlendirilir ve rakamsal olarak ifade edilir. Gerçek değer ile ortalama değer arasındaki fark, yani bias arttıkça, doğruluktan uzaklaşılır (73).

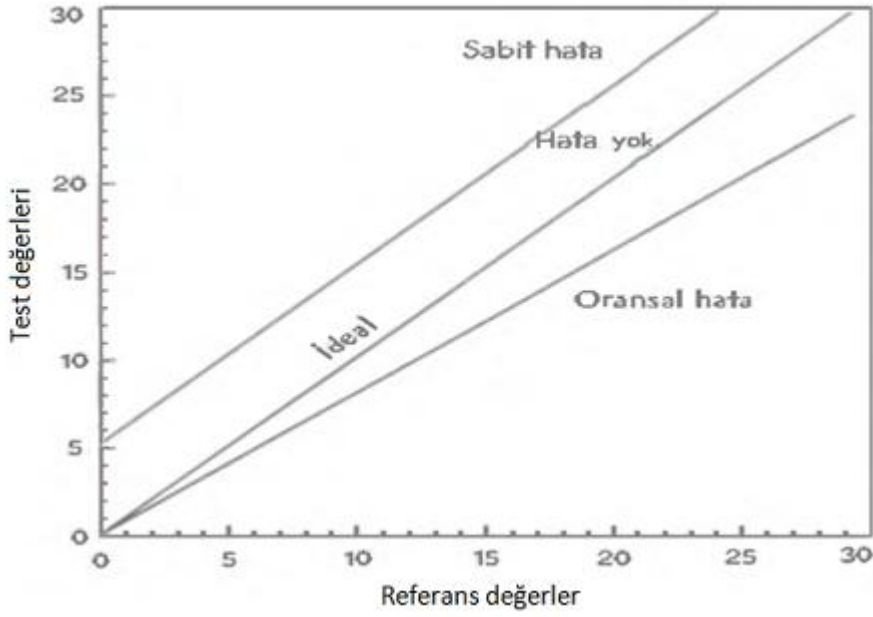
Doğruluk; hem biastan, hem de kesinlikten etkilenir ve toplam hatayı yansıtır. Toplam hata; sistematik hata ve rastgele hatanın toplamıdır. Toplam hata, sistematik hata ve rastgele hata Şekil-6 ‘da grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 6: Toplam hata, rastgele hata ve sistemik hatayı gösteren grafik

Sistemik hata; ölçülen değer ile gerçek değer arasındaki uyumun göstergesidir. Klinik örneklerin hem aday yöntem, hem de daha önce kullanılmış ve doğruluğu kanıtlanmış yöntemle analiz edilen yöntem, yöntem karşılaştırma deneyleri ile hesaplanabilmektedir (74).

Sistemik hatalar iki tiptedir: Sabit hata ve oransal hata. Sabit sistemik hata; analit konsantrasyonunun değişmesinden etkilenmez. Hep aynı miktardadır. Buna zıt olarak, oransal sistemik hata analit konsantrasyonu değiştikçe değişir ve analit konsantrasyonunun yüzdesi olarak değişim gösterir. Sabit ve oransal hatalar, yöntem karşılaştırma deney sonuçlarının y ekseninde aday yöntem verileri, x ekseninde referans yöntem ve/veya gerçek değerleri belirtilmek üzere çizilen grafiklerden kolaylıkla saptanabilir. Şekil 7' de sabit hata en uygun çizgiyi belirli miktarda kaydırmıştır, bu kaydırma derecesi y - kesişim ile belirlenir. Oransal hata en uygun çizgiyi 45-derecelik ideal çizgiden oransal olarak gözlenen eğim değişikliği ile uzaklaştırmaktadır. Anlaşılabileceği gibi, bu grafiklerin görsel olarak incelenmesi analitik hatanın bileşenleri hakkında yararlı bilgi sağlamaktadır.



Şekil 7: Sabit ve oransal sistematik hatanın grafiksel gösterimi

Toplam Hata: Bir yönteme karar verirken tüm hataları içinde toplayan toplam hatanın bilinmesi gerekmektedir. Toplam hata analitik kalitenin kabul edilebilirliğini belirleyen ve sonuç olarak yöntemin hedeflenen klinik kullanıma uygunluğu kararını aldırان bir değerdir (75). Toplam Hata değerlendirilmesi, klinik kimyada yeni bir kavram değildir. Toplam analitik hata, sistematik analitik hata ve rastgele analitik hatanın toplamı olarak tanımlanmıştır. Belirli konsantrasyonlarda uygulanan regresyon yöntemleri ile toplam analitik hata belirlenebilmektedir (76).

- Kesinlik (Tekrarlanabilirlik): Bir analitik yöntemin, aynı örneğin ard arda analiz sonuçlarını aynı olarak elde edilme özelliği yöntemin kesinliği veya *rastgele analitik hata* olarak adlandırılır.

Rastgele hata: Kesinliğin hesaplanması için aynı örnek ard arda en az 20 kez analiz edilir ve standart sapma (SD) hesaplanır. Çalışma grubu-içi kesinlik değeri hesaplamak için aynı örnek tek bir çalışma grubu içinde tekrar tekrar analiz edilir veya klinik örneklerle birlikte aynı materyal çift çalışılır. Çift çalışma sonuçlarından SD hesaplanır. Çalışma grubu-içi kesinlik çoğunlukla toplam kesinlikten küçüktür. Çünkü ard arda çalışma veya çift çalışmalarda değişiklik olma şansı çok azdır. Gün-içi veya çalışma grupları-arası kesinlik değeri için aynı örnek gün boyunca farklı çalışma gruplarında analiz edilir. Bu değişkenlik çalışma grubu-içi değişkenlikten

daha büyüktür. Günlere göre veya günler arası kesinlik de aynı örneğin farklı günlerdeki ölçümlerinden hesaplanır. Bu son hesaplama gerçek hayata en fazla uyan değerdir. Çünkü farklı operatörlere göre yöntem performansının değişiminden, cihazdaki günden güne değişikliklerden, farklı pipetlerden, sıcaklıktaki farklılıklardan veya diğer laboratuvar değişimlerinden en fazla etkilenen kesinlik değeridir (75). Doğruluk ve kesinlik kavramları arasındaki ilişki Şekil-8' de gösterilmiştir.



Şekil 8: Doğruluk ve Kesinliğin grafiksel olarak gösterimi

Standart sapma; Bir çalışma grubundaki her bir verinin ortalamaya göre ne kadar uzaklıkta olduğunu, bir diğer deyişle dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür. Başka bir şekilde tanımlanacak olursa, belirli bir popülasyonda incelenen özelliğin (veya özellikle ilgili değerlerin ya da ölçümlerin) ne genişlikteki bir aralıkta (dar veya geniş) dağıldığının göstergesi varyans ve onun bir türevi olan standart sapmadır. Varyansın karekökü standart sapmayı verir, standart sapma büyüdükçe dağılım yaygınlaşır (77).

Varyasyon (değişkenlik) katsayısı (Coefficient of Variation); Standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçlık değişim gösterdiğini belirtir ve değişkenliği standardize ettiği için tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesinde kullanılır. % CV

olarak terimlendirilir. Varyasyon katsayısı ile ortalama değerlerden bağımsız olarak, farklı test sonuçlarının tekrarlanabilirliği karşılaştırılabilir.

% CV = % Relative Standard Deviation = [(Standart Sapma/Ortalama)*100] formülü ile hesaplanan % CV rastgele hatayı değerlendirir (78).

$$\text{Varyasyon katsayısı} = \frac{\text{Standart Sapma(SD)}}{\text{Aritmetik ortalama}(\bar{x})} * 100$$

- **Analitik Özgüllük:** Yöntemin doğruluğuyla doğrudan ilişkili olup, analitik yöntem tarafından tespit edilen analitin, diğer maddeler ile reaksiyona girmediğinin göstergesidir (79).

- **Analitik Duyarlılık:** Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC) tarafından kalibrasyon eğrisinin eğimi ve bir analitik prosedürün analitteki belirli miktardaki değişim sinyallerine karşı gösterdiği değişim yanıtı kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Temel olarak bu tanım bir analitin miktarı, konsantrasyonu veya özelliğinin değişmesiyle göreceli olarak sinyaldeki değişim miktarını açıklamaktadır. Analitik duyarlılık ve saptama sınırı yaygın olarak karıştırılmakta ve yanlış kullanılmaktadır. Terimler birbirleriyle ilişkili olduklarından karıştırılmaktadır ve her ikisi de “duyarlı” yöntem kararını etkilemektedir. Pratikte ideal yöntemin analitik duyarlılığı yüksek, saptama sınırının düşük olması gerekir (75).

- **Girişim (İnterferans):** Örnekte bulunan bir maddenin, bir analit için genellikle konsantrasyon veya aktivite olarak ifade edilen sonucunun gerçek değerini değiştiren etkidir (80).

- **Geri Kazanım (Recovery):** Geri kazanım bir analitik yöntemin konsantrasyonu/içeriği bilinen örneklere bilinen miktarlarda eklenen analiti doğru olarak ölçme kapasitesidir. Geri kazanım ölçümleri bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgiyi sağlar. Çünkü içeriği bilinen örneğin matriksinde/doğasında bulunan tüm diğer bileşiklerin varlığında, analiti ne derece ölçtüğü bilgisi elde edilir (75).

- **Ölçüm aralığı:** Analitik aralık; ölçülmesi istenilen analit için numune üzerinde hiçbir uygulama yapmadan ölçüm yönteminin, analiti ölçebildiği konsantrasyon aralığıdır. Linearite deneyi ile test edilir (79).

- **Doğrusallık (Linearite):** Bir analitik yöntemin doğrusallığı test sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel derişimleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir (81).

- **Gözlenebilirlik sınırı (Limit of Detection-LOD):** Analitle ilişkili sinyalin geri plan karıştırıcı etkenlerden (back ground noise) ayrılabilirdiği en düşük analit miktardır (70).

X_{bl} = 'blank' ölçümlerinin ortalaması

S_{bl} = 'blank' ölçümlerinin standart sapması

$LOD = X_{bl} + 3 S_{bl}$

- **Belirlenebilirlik sınırı (Limit of Quantitation-LOQ):** Analitin güvenilir, doğru ölçümünün yapılabilirdiği en düşük miktardır (70).

X_{bl} = 'blank' ölçümlerinin ortalaması

S_{bl} = 'blank' ölçümlerinin standart sapması

$LOQ = X_{bl} + 10 S_{bl}$

2.6.3. Analitik Hedefler

Aday yöntemin objektif/yansız seçimi ve değerlendirilmesi için analitik deneyler başlamadan önce performans standartlarının belirlenmesi koşuldur. Yöntemin geçerliliği, uygunluğu ancak performans standartlarına göre yapılır. Başlangıçta performans standartlarını belirlenmeden değerlendirme deneylerinin yapılması, hataların saptanması ve yöntemin kabul edilebilirliği kararının verilmesi, çalışmanın geçerliliğini ve kabul edilebilirliğini zedeler. Titiz ve zeki laboratuvar çalışanları bu sonuçların geçerliliğinin nasıl kanıtlandığını sormalıdırlar. Böyle şüphelerle karşılaşılması için deneyler yapılmadan ve değerlendirme verileri toplanmadan önce performans hedefleri belirlenmelidir. Elde edilen gerçek performans bilgileri, hedeflerle karşılaştırılarak kabul edilebilirlik kararı verilmelidir. Performans hedefleri, analitin belirli konsantrasyonda/konsantrasyonlardaki veya

aktivitedeki izin verilebilir total analitik hata (TEA) düzeylerini tanımlamalıdır. İzin verilebilir total hata sınırlarının belirlenmesi için, bilgiler çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bu kaynaklar laboratuvar test sonuçlarının tıbbi kullanımından elde edilen profesyonel kararlar, klinisyenlere uygulanan anketler, analitin birey içi biyolojik değişkenlik/varyasyon düzeyleri, en ideal performansta çalıştıklarını kanıtlayanların bilgileri ve analitin referans aralık değerlerinin fraksiyonları temel alınarak hazırlanan yayınlardır (75).

Tıbbi laboratuvarlarda kalite özellikleri için çok sayıda gereksinim daha önceden ayrıntılı olarak ele alınmıştır (82). Bireysel kan parametresi değerleri ile fiziksel olarak aktif popülasyondan elde edilen referans aralıklarının karşılaştırılmasında bazı sınırlamalar vardır. Bunlardan birisi, laboratuvar test sonuçlarının, belirli bir analit için doğal dalgalanmalardan etkilenebilmesidir. Bu fenomene “*Biyolojik Varyasyon*” denir (83). Bu varyasyon, aynı deneklerin uzun süreli seri kan analizi ile yapılan çalışmalarda değerlendirilmelidir. Örneğin, bir kişideki belirli bir analit konsantrasyonu zamanla değişebilmektedir. Bu durum kararlı durum koşulları sırasında analitin hemostazında rastgele zamansal değişimin olabileceğini yansıtmaktadır (84). Biyolojik hemostaz noktası (aritmetik ortalama “ μ ” olarak değerlendirilir) her birey için farklıdır ve belli bir süre (örn; ay, yıl) boyunca sabit olduğu kabul edilir. Biyolojik birey-içi varyasyon, standart sapma (σ) ile tanımlanır ve ortalama değer etrafındaki değerlerden elde edilir. Bireyler ile analitler arasındaki mukayeseyi kolaylaştıran birey-içi varyasyon katsayısı (% CV_I) aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır (85).

$$CV_I = \sigma/\mu * 100$$

Biyolojik varyasyonun diğer bir bileşeni olan bireyler-arası varyasyon katsayısı (% CV_G) ise farklı bireyler arasındaki aritmetik ortalama (μ) ve standart sapma (σ) ile elde edilir. Örneğin, antrenmandan bir ay önce, 10 futbolcudan alınan serum örneklerinden CK (Kreatin kinaz) değeri 390 U/L ile standart sapma 266 U/L görülürse CV_G değeri bu oyuncular için % 68 olarak hesaplanır (86). Hem CV_I hem de CV_G; yaş, cinsiyet, kilo, diyet, sirkadiyen ritim, patolojik durumlar ve fiziksel aktivitelerden etkilenir. Birçok analitin biyolojik varyasyonlarını, literatürde mevcut olan veri bankaları ile sağlıklı ve sağlıklı olmayan kişilerde tahmin etmek

mümkündür (84). Ayrıca, biyolojik varyasyona ek olarak preanalitik ve analitik varyasyonlar laboratuvar test sonuçlarını etkileyebilmektedir. Preanalitik varyasyon, numune toplama, taşıma ve nakil öncesi hastalar için standart talimatların uygulanması ile minimize edilebilir (87). Tüm analitik ölçüm teknikleri (manuel veya otomatik) değişkenliğin bazı içsel kaynaklarına sahiptir. Bu değişkenlik tamamen ortadan kaldırılamaz. Ancak kaliteli laboratuvar uygulamaları, uygun reaktif ve metodolojilerin seçimi ile minimize edilebilir. Genellikle iki tip analitik varyasyon tespit edebiliriz. Bunlardan birisi; rastgele (kesinlik) ve diğeri sistematik (bias)' tır. Bir metod veya ekipmanın kesinliği, aynı numunenin tekrarlı analizleri ile ölçülür. Kesinlik analitik koşullardan etkilenir. Eğer aynı ekipman, aynı teknisyen, aynı reaktif ve kalibratör kullanarak uzun süre boyunca tekrarlayan sonuçlar alınırsa daha küçük varyasyonlar elde edebilir. Kesinlik, gauss dağılımına sahiptir. Analitik varyasyon katsayısı (% CV_A), kontrol örneği tekrarlarının ortalama ve standart sapmasından hesaplanabilir. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), biası “Ölçümün gerçek değeri ile beklenen ölçüm sonuçları arasındaki fark” olarak tanımlamaktadır. Pratikte bias, elde edilen ölçüm sonuçları ile tahmin edilen gerçek değer arasındaki farktır (88). Analitik varyasyon, iç kalite kontrol programı ile belirlenebilir. İç kalite kontrolü için kullanılan kontrol örnekleri, gerçek insan serum örneklerine benzer matrisine sahip olmalıdır. Her analitin kalite kontrolünde, Levey-Jennings kontrol grafikleri kullanılarak, Westgard kontrol kuralları doğru bir şekilde uygulanmalıdır (89). Ayrıca performans seviyesi belirlenmelidir. En yaygın kullanılan terim kalite özellikleridir (quality specifications). Kullanılan diğer terimler ise; kalite hedefleri, kalite standartları, arzu edilen standartlar, analitik hedefler ve analitik performans hedefleridir (88). Tüm analitlerin biyolojik varyasyonlardan etkilendiği göz önünde bulundurulursa, biyolojik olarak tek bir kalite özelliğinin kullanılması yararlı olacaktır. Bu modele göre tekrarlanabilirlik, kalite özellikleri bakımından 3 farklı seviyede sorgulanmaktadır (90).

Arzu edilen kesinlik; CV_A < 0.5 x CV_I

Optimum kesinlik; CV_A < 0.25 x CV_I

Minimum kesinlik; CV_A < 0.75 x CV_I

Aynı şekilde bias, yani doğruluk için kalite özellikleri bakımından 3 farklı seviyede sorgulama yapılmalıdır (91).

$$\text{Arzu edilen doğruluk: Bias \%} < 0.25 \sqrt{CV_I^2 + CV_W^2}$$

$$\text{Optimum doğruluk: Bias \%} < 0.125 \sqrt{CV_I^2 + CV_W^2}$$

$$\text{Minimum doğruluk: Bias \%} < 0.375 \sqrt{CV_I^2 + CV_W^2}$$

İstatistiksel Kalite Kontrolünün (İKK) hedefi; total analitik hatanın (TE), izin verilebilir total analitik hatadan (TEA) düşük olduğunu tespit etmektir. İzin verilebilir total analitik hata, analit veya analitik metodun bazı özelliklerine (örn: tekrarlanabilirlik, bias, biyolojik varyasyon) bağlıdır. Bu özelliklere göre bazı analitler daha fazla veya daha az olmak kaydıyla titiz İKK kurallarına ihtiyaç duymaktadır. Laboratuvarcılar, analit ve analitik metodun bu özelliklerine göre İKK yöntemlerini (istatistik hesaplamalar, grafikler ve kurallar) seçmektedirler.

Bunun için iki ortak uygulama vardır:

- TEA, analit veya analitik metodun bazı özelliklerine (örn: tekrarlanabilirlik, % bias) bağlıdır. Bu uygulama yaygın olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmaktadır. ABD' de laboratuvarlar, CLIA (Klinik Laboratuvar Değişiklik Yasası) kısıtlamalarını takip etmek zorundadırlar. CLIA kriterlerine uymakla yükümlü laboratuvarlarda, her analit için total hatanın (TE), CLIA tarafından önerilen TEA' dan daha düşük olması gerekmektedir.
- TEA, analitin biyolojik varyasyonuna (Birey-içi varyasyon ve Bireyler-arası varyasyon) bağlıdır. Avrupa' daki laboratuvarlarda çoğunlukla kullanılan bu uygulamaya göre, her laboratuvar gönüllülük esasına göre kendi istatistiksel kalite kontrol metodunu seçer ve TE' nin, TEA' dan daha düşük olması gerekmektedir. TEA biyolojik varyasyonlardan oluştuğu zaman, TE%_b olarak sembolize edilir (92).

Avrupa' daki birçok laboratuvar, analitik yöntemlerin performansı için bazı kriterleri kabul etmiştir. Bu kriterler, “Kabul Edilebilir Performans Kriterleri” olarak adlandırılır ve insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiştirler (93). 2012

yılında Dr. Carmen Ricos ve meslektaşları tarafından güncellenen, biyolojik varyasyonlara ait kapsamlı bir veri tabanının 7. baskısı yayımlanmıştır. Güncellenmiş bu veri tabanına Westgard'ın internet sitesinden ulaşmak mümkündür (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>). Birey-içi ve bireyler-arası varyasyonlardan oluşan bu veri tabanı sayesinde; arzu edilen doğruluk, arzu edilen kesinlik ve izin verilebilen total hata hesaplanabilir (94).

İki çeşit biyolojik varyasyon vardır:

- Birey-içi Biyolojik Varyasyon (CV_I).
- Bireyler-arası Biyolojik Varyasyon (CV_w)

Ayrıca, analitik varyasyon ise iki çeşit alt gruba ayrılmaktadır:

- Gün-içi Analitik Varyasyon (CV_{w-day})
- Günler-arası Analitik Varyasyon (CV_{b-day})

Total analitik hata ($CV_{an-total}$) aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

$$CV_{an-total}^2 = CV_{w-day}^2 + CV_{b-day}^2$$

Birinci kabul edilebilir performans kriteri: Cotlove ve arkadaşları izin verilebilir maksimum imprecizyon (Belirsizlik) için; total analitik hatanın, birey-içi varyasyonun yarısından daha küçük veya eşit olması gerektiğini önermişlerdir (95). Böylelikle her analit için izin verilen maksimum kesinlik sınırı birey-içi varyasyonlardan hesaplanabilir.

$$CV_{an-total} \leq 0.5 CV_I$$

İkinci kabul edilebilir performans kriteri: Gün-içi analitik varyasyon, izin verilebilir total analitik hatanın $\frac{1}{4}$ ünden daha küçük veya eşit olmalıdır.

$$CV_{w-day} \leq 0.25 TE\%_b$$

Üçüncü kabul edilebilir performans kriteri: Total analitik hata, izin verilebilir total analitik hatanın $\frac{1}{3}$ ünden daha küçük veya eşit olmalıdır.

$$CV_{an-total} \leq 0.33 TE\%_b$$

Dördüncü kabul edilebilir performans kriteri: İmpresizyona ek olarak, bias için belirlenmesi gereken hedefler de dikkate alınmalıdır. Gowans ve arkadaşları; analitik olarak % Bias için, birey-içi varyasyon ve bireyler arası varyasyonun kareleri toplamının karekökü alınarak elde edilen değerin ¼ ünden daha küçük olması gerektiğini önermişleridir (96).

$$Bias \% < 0.25 \sqrt{CV_I^2 + CV_W^2}$$

Beşinci kabul edilebilir performans kriteri: Analitik metod için, İzin verilebilir total analitik hata aşağıdaki denklemdeki gibi olmalıdır:

$$TE\%_b \leq k 0.5 CV_W + 0.25 \sqrt{CV_I^2 + CV_W^2}$$

$$TE\% \leq 1.65 \Delta RE + \Delta SE$$

(k=1.65 gauss eğrisi için tek taraflı olarak, popülasyonun %95' ini temsil etmektedir)

2.7. Laboratuvarda Kullanılan Ölçüm Yöntemlerinin Analitik

Performanslarının Değerlendirilmesinde Uygulanan Protokoller

Laboratuvarda kullanılacak ölçüm yöntemi veya yöntemleri belirlendikten sonra bu yöntemlerin ölçülebilir karakteristikleri deneylerle belirlenir. Karar kriterlerine (performans standartlarına) göre değerlendirilir. Ayrıca referans yöntemle veya güvenilirliği kanıtlanmış bir yöntemle karşılaştırılır. Bütün bu işlemler, yöntem değerlendirme deneylerini oluşturur. Analitik hataların değerlendirilmesi için yapılması gereken deneyler ve bu deneyleri temsil eden analitik hata tipleri Tablo-2' de gösterilmiştir (66).

Tablo 2: Yöntem Değerlendirme Deneyleri

ANALİTİK HATA TIPLERİ	DEĞERLENDİRME DENEYLERİ	
	Ön Değerlendirme Deneyleri	Son Değerlendirme Deneyleri
<u>RASTGELE HATA (Random Error)</u>	Çoklu-analizler Grup içi Tekrarlanabilirlik <ul style="list-style-type: none">• Saf materyaller ile• Gerçek örnekler ile	Çoklu-analizler Gruplar arası Tekrarlanabilirlik <ul style="list-style-type: none">• Gerçek örnekler ile
<u>SİSTEMATİK HATA (Systematic Error)</u> <i>Sabit Hata (Constant Error)</i> <i>Oransal Hata (Proportional Error)</i> <i>Diğer Sistemik Hata</i>	İnterferans Çalışması Geri elde (Recovery) Çalışması Doğrusallık (Linearite) Çalışması	Yöntem Karşılaştırma Çalışması (Güvenilirliği bilinen bir yöntem ile)

2.7.1. Tekrarlanabilirlik Çalışması [EP (Evaluation Protocol)-5A Protokolü]

Ölçüm yöntemlerinin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından “Klinik Biyokimya Cihazlarının Tekrarlanabilirlik Performansının Değerlendirilmesi (Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. CLSI Document EP5-A)” adı altında protokol oluşturulmuştur. Bu rehber; in vitro diagnostik cihazların tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesinin yanında, üretici firmalar için kendi ürettikleri metodların performanslarının değerlendirilmesinde tavsiyelerde bulunmaktadır.

Tekrarlanabilirlik çalışması; *Presizyon bileşenleri*

Reaktif ve kalibrasyon materyalleri

Test materyalleri

Çalışma gün ve sayıları

Verilerin toplanması

Kalite kontrol prosedürleri

Dışlananların tespiti

*Tekrarlanabilirliğin istatistiksel olarak hesaplanması
şeklindedir.*

Presizyon bileşenleri: Tekrarlanabilirlik çalışmasının amacı, laboratuvar cihazlarının total olarak kesinliğini belirlemektir. Total kesinlik; laboratuvarda uzun süre kullanılan cihaz üzerindeki değişkenliğin ifadesidir. Presizyonun zaman ilişkili bileşenleri:

- ✓ *Within-run (Çalışma-içi) presizyon*
- ✓ *Between-run (Çalışmalar-arası) presizyon*
- ✓ *Within-day (Gün-içi) presizyon*
- ✓ *Between-day (Günler-arası) presizyon*
- ✓ *Within-Laboratory (Laboratuvar içi, Total) presizyon* şeklindedir.

Bunlar arasında en fazla ilgi çekenleri Within-run presizyon ve Total presizyondur. EP-5A protokolü bu iki terim üzerine yönelik hazırlanmıştır.

Reaktif Ve Kontrol Materyalleri: Protokolün uygulanma aşamasında aynı lot numaralı kalibratör ve reaktifler kullanılabilir. Fakat farklı lot numaralı kalibratör ve reaktiflerin kullanımı çalışmadaki değişkenliği etkileyerek, cihazın gerçek presizyon performansının daha iyi değerlendirilmesine katkı sağlayabilir.

Test Materyalleri: Stabil, donmuş örnek havuzları veya ticari, protein bazlı materyaller kullanılabilir. İki veya daha fazla, farklı konsantrasyona sahip test havuzları önerilmektedir. Konsantrasyonlar cihazın analitik rapor aralığının içinde olmalıdır. İki'den fazla konsantrasyon kullanılacak ise "tıbbi karar konsantrasyonuna" yakın değerler seçilebilir. Elde edilecek presizyon sonuçları;

yayımlanmış performans çalışmalarıyla karşılaştırılıp değerlendirileceğinden dolayı, test materyallerinin konsantrasyonları, yayımlanmış performans çalışmalardaki konsantrasyon düzeyleri ile uyumlu olmalıdır.

Çalışma Ve Gün Sayıları: Tekrarlanabilirlik çalışmasında, cihazın gerçek kesinliğini belirlemek için yeterli miktarda veriye ihtiyaç vardır. En az 20 günlük yapılan çalışma kesinliğin değerlendirmek için yeterlidir. Çalışmanın ilk 5 günü, kullanıcının protokole alışma süresidir. Bir gün içinde iki kez çalışma yapılabilir. Her çalışma en az iki kez tekrarlanmalıdır ve gün içinde yapılacak olan iki çalışmanın arasında en az 2 saat kadar süre farkı olmalıdır.

Kalite Kontrol Prosedürleri: Presizyon değerlendirme çalışmaları süresince normal kalite kontrol prosedürleri uygulanmalıdır. Her çalışmada en az bir düzeyde uygun kalite kontrol örneği çalışılmalıdır. Eğer iki veya daha fazla konsantrasyonda kalite kontrol materyali kullanılıyorsa, bu çalışma süresince kullanılmalıdır. Kalite kontrol sonuçları değerlendirilirken; kontrol değerlerinin dışında kalan sonuçlar değerlendirilmeli, nedenleri araştırılmalı ve kalite kontrolü yeniden çalışılmalıdır. Kalite kontrol sonuçları ± 3 SD (standart sapma) arasında değerlendirilir. Bu değerler dışında kalan değerler reddedilir.

Dışlananların Tespiti: Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için dışlama kriterleri belirlenmelidir. Çift çalışmalar arasındaki değer, ön presizyon çalışmasından elde edilen SD değerinin 5.5 katından fazla ise, çift değerler dışlanır. Bu gibi durumlarda sorunun nereden kaynaklandığı tespit edilmeli ve çalışma tekrarlanmalıdır. Eğer çalışmanın %5' inden fazlası dışlanırsa ve herhangi bir neden bulunamaz ise araştırmacı cihazın yeterince stabil olmadığını düşünmelidir (97).

2.7.2. Linearite Çalışması [EP6-A Protokolü]

EP6-A protokolü; kantitatif bir ölçüm metodunun, lineer ölçüm aralığını göstermek ve doğrulamak için oluşturulmuştur. Bu protokol ile Doğrusallık (Linearite), Doğruluk (accuracy), Rapor aralığı ve kalibrasyon doğrulaması değerlendirilebilir. Bu çalışma, doğrusallıktan sapmanın nedenini tespit etmez. Örnek sayısının artırılması ile doğrusallık net bir şekilde tespit edilir. Bu nedenle yapılan

bir çalışmanın başarısız olması halinde yeniden tekrarlanması gerekmektedir. Bu daha fazla tekrar ile veya daha dar bir ölçüm aralığını kapsayacak şekilde yapılabilir.

Örnek gereklilikleri: Bu çalışmanın yapılması için yeterli sayıda örnek olması gerekmektedir. Lineer aralığın doğrulması için 5-7, yeni bir testin lineer aralığını belirlemek için 7-11 adet örnek kullanılmalıdır. Tahmin edilen ölçüm aralığının %20-30' undan daha geniş olacak şekilde örnek seti oluşturulmalıdır. Her örnek 2-4 kez olacak şekilde tekrarlanmalıdır. Bu çalışmada, serum havuzları veya ticari ürünler kullanılabilir.

Kullanılabilecek Örnekler: Hasta örnek havuzları, ticari kontrol ve kalibratörler kullanılabilir.

Örneklerin hazırlanması ve değerlerin belirlenmesi: Uygun matriksli düşük konsantrasyonlu ve yüksek konsantrasyonlu iki adet havuz yeterli miktarda hazırlanır.

- ✓ En düşük konsantrasyona sahip havuz; Havuz 1 olarak işaretlenir.
- ✓ En yüksek konsantrasyona sahip havuz; Havuz 5 olarak işaretlenir.
- ✓ Ara konsantrasyon değerleri, bu iki havuzun belirli oranlarda karıştırılması ile elde edilir.
- ✓ Her bir havuzdaki konsantrasyon değeri; $(C1.V1+C2.V2/V1+V2)$ formülü ile hesaplanır.

Klinik olarak önemli konsantrasyonların değerlendirilmesi: Lineer aralık belirlenirken, yapılan çalışmada kullanılacak olan materyaller; minimum analitik konsantrasyonu (lineer aralığın en alt sınırı), tıbbi karar konsantrasyonunu ve maksimum analitik konsantrasyonu (lineer aralığın en üst sınırı) kapsamalıdır.

Verilerin değerlendirilmesi: Lineer aralığın geçerliliğinin kanıtlanması için 5-7 örnek ve her düzeyde en az 2 tekrar çalışılması önerilmektedir. Her düzeydeki tekrarların standart sapması (SD) ve varyasyon katsayısı (%CV) ile tüm düzeylerin SD ve %CV' si hesaplanır. Verilerin regresyon çizgisi çizilir. Regresyonun x değerleri, her bir düzey için beklenen değerlerdir. Regresyonun y değerleri ise her bir düzey için ölçülen değerlerdir. Elde edilen değerler polinomial çizgi üzerinde belirlenir. En iyi

polinomiyal çizgi gerçekte lineer (doğrusal) bir çizgi veya bir eğri olabilir. Polinomiyal çizgi ile çizgi üzerindeki değerlere bakarak, doğrusallıktan sapma (deviation from linearity) hesaplanır. Eğer herhangi bir değer için doğrusallıktan sapma, izin verilebilir hatayı aşar ise o düzeyden itibaren doğrusallık aşılmıştır denilebilir (98).

2.7.3. İnterferans Çalışması [EP7-A Protokolü]

Ölçülen analit konsantrasyonunda, başka bir bileşiğin etkisi veya örneğin özelliği nedeniyle klinik olarak anlamlı bir biasın meydana gelmesi “*İnterferans*” olarak nitelendirilir. İnterferan maddeler laboratuvar ölçümlerinde önemli bir hata kaynağı oluşturabilmekte ve bu hata kolay bir şekilde saptanamamaktadır.

Potansiyel interfere edici maddeler;

- ✓ *Örnek anormallikleri (Hemoliz, İkter, Lipemi)*
- ✓ *Yaygın kullanılan ilaçlar*
- ✓ *Belirli hastalıklarda beklenen anormal biyokimyasal metabolitler*
- ✓ *Benzer reaksiyon göstererek ölçüme girebilen interfere edici maddeler*
- ✓ *Örnek katkı maddeleri, koruyucular, antikoagülanlar*
- ✓ *Örnek toplama ve hazırlama esnasında temas eden maddeler*
- ✓ *Diyette kullanılan maddeler şeklinde sınıflandırılabilir.*

Karar Kriterleri: İnterferans oluşturan bir analitik etkinin derecesine göre klinik açıdan oluşan anlamlılık belirlenmelidir. İnterferansın neden olduğu bu müsaade edilen hatanın büyüklüğü, test sonucunun klinik kullanımına bağlıdır. Doğruluğun tespiti; bazı analitler için izin verilebilir total analitik hata (TEA) olarak değerlendirilirken, bazı analitler için ise TEA’ nın komponentleri olan bias, imprecision (kesinlik) üzerinden değerlendirilir.

Analit Konsantrasyonu: İnterferans çalışması, analitin iki farklı tıbbi karar seviyesinde değerlendirilmelidir. Kontrol ve test yapılacak örnek havuzlarının içerdikleri analit miktarları bu seviyelere uygun olmalıdır.

İnterferan Maddenin Konsantrasyonu: Kapsamlı olarak yapılan bir interferans çalışmasında interferans oluşturan madde, bir laboratuvarın hasta örneklerinde karşılaşılabilecek en yüksek konsantrasyonda olmalıdır.

İnterferans Etkisinin Değerlendirilmesi: İnterferans etkisi, interferan konsantrasyonuna bağlı olarak bir doz-cevap eğrisi ile grafiklendirilerek gösterilebilir (99).

2.7.4. Hasta Örneklerini Kullanarak Yöntem Karşılaştırma Ve Bias Hesaplama [EP9-A Protokolü]

Güncel literatürde, kullanıcı ve üreticilerin ürün değerlendirmesi ile ilgili, aynı analiti ölçen iki yöntemin kıyaslanması için kullanılan birçok farklı deneysel ve istatistiksel prosedür örneği bulunmaktadır. Bu çeşitlilik, bazı karışıklıklara yol açmıştır. Ayrıca, diagnostik cihaz üreten firmaların kullandığı değerlendirme prosedürlerinin, laboratuvar kullanıcıları için her zaman uygun olmadığına farkına varılmıştır. Üretici firmalar bias için geçerli ve ulaşılabilir performans iddiaları kurulmasında, genellikle kabul görmüş veya referans metod ile karşılaştırma yaparlar. Ancak laboratuvar kullanıcıları, aday yöntem ile farklı bir yöntemi karşılaştırmak istediğinde, üreticilerin belirlediği bias prosedürlerini kullanmaktadır. Bu iki amaç için yapılan çalışma prosedürleri, sıklıkla birbirinden farklı olabilmektedir.

Bu nedenle; bu protokolün hazırlanmasında üretici firma temsilcileri, istatistikçiler, tıbbi personel ve laboratuvar çalışanlarının deneyimi ortaya koyulmuştur. Birçok farklı in vitro tanı yöntemi ve kit olduğundan tek bir deneysel tasarımın, kullanıcı ve üreticilerin kullandığı metod karşılaştırma tiplerine uygun olmadığı anlaşılmıştır. Bu yüzden, bu kılavuzun öncelikli hedefi, iki yöntemi karşılaştırmak için yapılacak olan deney taslağının nasıl olacağını anlatmaktır. EP9-A protokolünde, hasta örnekleri ve veri analizi kullanılarak iki klinik yöntem

arasındaki bias ve yöntem karşılaştırma deney taslağının belirlenmesi için gerekli prosedürler belirtilmektedir.

Örnek gerekliliği: Örnek kabul kriterlerine ve üreticilerin önerilerine göre örnek seçimi yapılmalıdır.

Örnek saklama: Depolama, ölçülecek analitin depolama şartlarına göre yapılır.

Dışlanan örnekler: Örnek dışlanacak ise örneğin dışlanma nedenleri de açıklanarak kaydedilmelidir.

Karşılaştırılan yöntem: Aday yöntemin (yeni yöntem) karşılaştırılacağı yöntem; laboratuvardaki mevcut yöntem, üreticinin önerdiği yöntem veya referans yöntem olabilir. Aday yöntem ile karşılaştırılacak yöntem, referans yöntem ise ölçülen iki yöntem arasındaki fark, yeni yöntemin doğruluğudur ve bias olarak nitelendirilir. Eğer karşılaştırma amaçlı kullanılacak yöntem, referans yöntem değil ise yeni yöntemin doğruluğu tespit edilemez. Bu durumda ölçülen farklılık bias değil, basit bir şekilde iki yöntem arasındaki farktır. Yöntem karşılaştırmada tercih edilen, karşılaştırma amaçlı referans yöntemin kullanılması olduğu için bu protokolda bias terimi kullanılmıştır. Bu protokol, belirlenen konsantrasyonlarda her iki yöntem arasındaki bias' ı ve bias' ın güven aralığını verir. İki yöntem arasındaki fark, yeni yöntemdeki hata olarak ifade edilebilir.

Karşılaştırma metodu aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır;

- ✓ *Karşılaştırılan yöntem, yeni yöntemden daha iyi tekrarlanabilirliğe sahip olmalıdır.*
- ✓ *Karşılaştırılan yöntem mümkün ise bilinen interferanslardan etkilenmemelidir.*
- ✓ *Yeni yöntemle karşılaştırılan yöntemin birimleri aynı olmalıdır.*
- ✓ *Mümkünse karşılaştırma yöntemi referans yöntemle izlenebilir bir yöntem olmalıdır.*

Ölçüm aralığı: Yöntemler, klinik öneme sahip referans değerlerinde değerlendirilmelidir. Bu aralık genellikle her bir laboratuvar testi için normal referans aralığının alt sınırından daha küçük değerlerden başlayarak, normal referans aralığının üst sınırından daha yüksek değerlere kadar uzanır. Analit konsantrasyonları mümkün olduğunca analitik ölçüm aralığı boyunca dağıtılmalıdır.

Analitik ölçüm aralığı: Çalışmanın aralığı, her iki yöntemin analitik ölçüm aralığıyla sınırlandırılmalıdır. Analitik ölçüm aralığındaki bias' ın saptanabilmesi için yeni yöntemin analitik ölçüm aralığı en az karşılaştırılan yöntem kadar geniş bir aralığa sahip olmalıdır.

Örnek sayısı: En az 40 adet örnek ikişer kez çalışılmalıdır. Daha fazla örnek seçimi, güvenilirliği ve istenmeyen hataların ortadan kaldırılma şansını artırır.

Örnek havuzu: Eğer tek bir hastadan alınan örnek miktarı yeterli olmaz ise, aynı hastalığa sahip iki hastanın (ikiden fazla olmamak şartıyla) örnek havuzları eşit miktarda alınarak mini örnek havuzları oluşturulabilir. Bu mini örnek havuzları çift çalışmalarda kullanılır.

Zaman ve süre: Analitlerin stabilitesi açısından, yeni yöntem ve karşılaştırma yönteminin çalışılması belirli bir zaman aralığında gerçekleştirilir. Tüm analitler için bu zaman aralığı, her bir yöntemle çalışmada iki saati geçmemelidir. Mümkünse örnekler alındığı gün çalışılmalıdır. Eğer depolanan örnekler kullanılacak ise ölçülecek analit için depolama koşullarının uygunluğundan ve prosedürlerin düzgün uygulandığından emin olunmalıdır. Saklama koşullarının oluşturacağı varyasyondan sakınmak için, tüm örneklerle aynı prosedür uygulanmalıdır.

Yöntem karşılaştırma çalışması, tekrarlanabilirlik çalışmasından (CLSI dokümanı EP5-A) daha sonra yapılacak ise, bir günde 8' den fazla örnek çalışılabilir. Ancak presizyon çalışması ve yöntem karşılaştırma çalışması eş zamanlı olarak yapılacak ise bir günde sadece 4 örnek çalışılarak 10-15 günde çalışma gerçekleştirilir.

Elde edilen verilerin izlenmesi: Çalışma sırasında meydana gelen analitik hatalar ve kullanıcı hataları belgelenmelidir.

Kalite Kontrol Prosedürleri: Çalışması süresince, laboratuvarın ve/veya üretici firmanın önerdiği rutin kalite kontrol prosedürleri uygulanmalıdır (100).

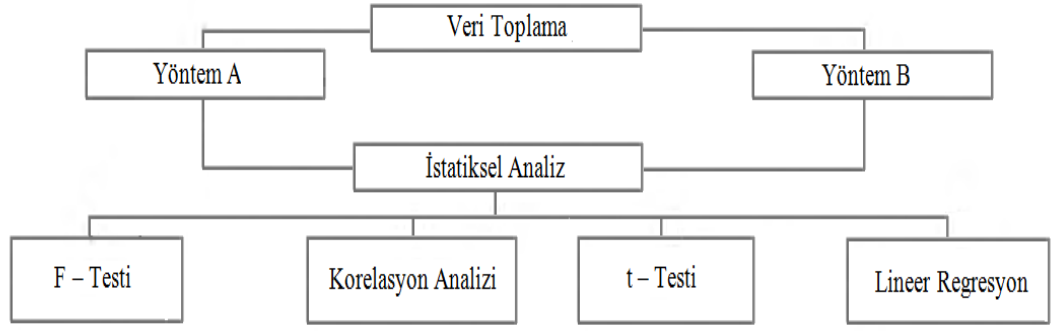
2.8. Yöntem Karşılaştırma Çalışmalarında Kullanılan İstatiksel Tekniklerin Tanımlanması

İki yöntemle elde edilen ölçümlerin karşılaştırılması, laboratuvarında sıklıkla uygulanan bir işlemdir. Tercihen hasta örnekleriyle bir dizi paralel ölçümler yapılmalıdır. Matriks etkisine bağlı farklılıkların önüne geçmek için hasta örneklerinin taze olması önerilmektedir. Analitik ölçüm aralığı boyunca değerlerin hemen hemen eşit dağılması tercih edilen bir şeydir. Sıradan bir laboratuvarında, iki rutin yöntemin karşılaştırılması en sık ortaya çıkan bir durum olacaktır. Daha az sıklıkla rutin bir yöntem, referans yöntem ile karşılaştırılmaktadır. İki rutin yöntem karşılaştırıldığında, odak noktası gözlemlenen farklılıklar üzerinedir. Böyle bir durumda hangi ölçüm serisinin doğru olduğunu saptamak mümkün olmayacak ve böylece ne kadar ölçüm değerinin, doğru olduğu varsayılan konsantrasyondan saptığı bilinemeyecektir. Aksine burada sorulması gereken soru; sonuç değerlerinde sistematik bir değişiklik olmadan, mevcut olan yöntemin yerini yeni yöntemin alıp alamayacağıdır. Bu soruyu ele almak için, eşleştirilmiş ölçümler arasında gözlenen farklılıklar arasındaki dağılım bazı istatiksel yöntemlerle değerlendirilebilir. Verilerin objektif olarak değerlendirilmesi için grafiksel görünüm içerere istatiksel bir prosedür uygulanmalıdır.

Uygulanan bazı yaklaşımlar şunlardır (101);

- ✓ Merkezi eğilim ve dağılım ölçüleri ile farklılıklar dağılımının frekans grafiği veya histogram şeklinde gösterilmesi (DoD Plot; Farkların Dağılım Grafiği)
- ✓ Farklılık (Bias) grafisi (Bland-Altman Grafiği); ölçümlerin ortalama konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak farklılıkları gösterir
- ✓ Regresyon analizleri

Yöntemler karşılaştırılırken kullanılan istatiksel ölçütler Şekil-9' da gösterilmiştir (66).



Şekil 9: Yöntem karşılaştırma deneylerinde kullanılan istatistiksel ölçütler

2.8.1. F-Testi

İki analitik yöntemin kesinlik derecelerinin karşılaştırılması için yöntemlerin standart sapmaları F-test ile karşılaştırılır. F- değeri aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$F = \frac{(SD1)^2}{(SD2)^2}$$

F-testin yorumlanmasında, hesaplanan F-değeri, kritik F-değeri ile karşılaştırılır. Hesaplanan F-değeri kritik F-değerinden büyük bulunursa, iki yöntem arasında istatistik olarak anlamlı farklılıktan bahsedilir ve yöntemin standart sapmasının diğerinden çok yüksek değerde olduğu anlamındadır. Hesaplanan değer kritik değerden küçük bulunursa, istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığından bahsedilir. Bundan dolayı çalışma verilerinden iki yöntemin standart sapmaları arasında gerçekten fark vardır kararına varılamaz. Kritik F-değerleri birçok istatistik kitaplarında bulunmaktadır. Bu tablolarda hesaplanan F-değerinin kritik değerini aşmasına sadece %5 şans ($p = 0.05$) tanınır.

2.8.2. Korelasyon Katsayısı

Gerekli bir hesaplama olmasa da, korelasyon katsayısı (r) yöntem karşılaştırma çalışmalarında hesaplanmaktadır. Aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

x : Her bir örneğin x değeri

y : Her bir örneğin y değeri

n : x , y veri çiftlerinin sayısı

İdeal r değeri 1.00' dir. 1.00' den düşük değerler yöntem içinde veya yöntemler arasında rastgele hata bulunduğunu gösterir. Sistemik hatanın r değeri üzerine bir etkisi yoktur. Yöntem doğru değilse de r değeri 1.00 olarak bulunabilir. Bundan dolayı yöntemin doğruluğuna r değerine göre karar verilemez. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında r değerinin başlıca yararı lineer regresyon ölçülerinde eğim ve y -kesişim hesaplamalarının geçerliliğinin test edilmesinde kullanılmasıdır. $r > 0.95$ olduğu zaman eğim ve y -kesişim, karşılaştırma yönteminin değişkenliğinden çok az etkilenmektedir.

2.8.3. Eşleşmiş t-Testi

Yöntem karşılaştırma çalışmalarında aday ve referans yöntemlerden elde edilen çift ölçümler arasındaki farkların ortalaması "eşleşmiş t-testi" ile analiz edilir. t-Test, ortalamalara veya farkların ortalamasına uygulanır ve yöntemin doğruluğu veya sistemik hatası hakkında bilgi sağlar.

Ortalama fark veya bias aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\text{Bias} = \bar{y} - \bar{x}$$

\bar{y} : Test yöntemi sonuçlarının ortalamasıdır. \bar{x} = Referans yöntemi sonuçlarının ortalamasıdır.

Sonra, aşağıdaki denklem ile farkların standart sapması (SDd) hesaplanır.

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

y_i ve x_i : Her hasta örneğinin sırasıyla aday ve referans yöntem ile ölçülen değerleridir.

Bias: Bir önceki denklemden elde edilen değerdir. n : Test edilen hasta örneği sayısıdır.

T değerleri aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$t = \frac{[bias]\sqrt{n}}{SDd}$$

t-testin yorumlanmasında hesaplanan t-değeri istatistik kitabından veya istatistik tablolarından elde edilen “kritik” t-değeri ile karşılaştırılır. Kritik t-değerleri farklı olasılıklar (F) ve serbestlik derecelerinde bulunurlar. Çoğunlukla 0.05 olasılık seçilir. Bu şekilde, hesaplanmış t-değerinin kritik t değerini geçme sınırı için %5’ lik bir şans tanınır. Hesaplanmış t-değeri kritik t-değerinden büyük ise, farkın (biasın) istatistiksel olarak anlamlılığında bahsedilir. Bunun anlamı iki yöntem arasında gerçekten bir fark bulunduğudur. Hesaplanan t-değeri kritik t-değerinden küçük ise, farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığından bahsedilir; veri iki yöntem arasında fark olduğu hipotezini desteklemez.

Yöntemin doğruluğu ve sistematik hatasının kabul edilme kararında t-test’ in yorumlanması çok zordur. Örneğin; t-değeri bias arttıkça, aynı zamanda örnek sayısı arttıkça ve SDd azaldıkça artış göstermektedir. Bundan dolayı, örnek sayısı çok (büyük n) olan bir karşılaştırmada, iki yöntemin kesinlik ölçüleri çok iyi (küçük SDd) olmasına ve bias çok küçük değerde bulunmasına karşın, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunabilir. Diğer taraftan çok az sayıda ölçüm içeren karşılaştırmada, kesinlik ölçüleri iyi olmayan iki yöntemin, büyük değerde bulunan biası istatistiksel olarak anlamlı çıkmayabilir (75).

2.8.4. Regresyon Analizleri

Regresyon analizi, karşılaştırılan iki metod için tüm analitik ölçüm aralığında hedef değerler arasındaki ilişkiyi incelemesinden dolayı avantajlıdır. Eğer hedef değerler arasındaki farklılık (örneğin; iki metod arasındaki bias veya sistematik hata) analit konsantrasyonu ile bağlantılıysa, farklılık grafikleri kullanıldığında bu tip bir ilişki açıkça gösterilemeyebilir. Non-lineer (doğrusal olmayan) regresyon analizleri kullanılabileceği gibi, asıl hedef lineer regresyon analizinin kullanılmasıdır. Lineer

regresyon analizinde hedef değerler arasındaki sistematik farklılık; sabit sistematik fark (kesim noktasının 0' dan sapması) ile oransal sistematik farkın (eğimin 1' den sapması) kombinasyonu olarak modellenmektedir ve genellikle metodların kalibrasyonunu hesaba katarak ortaya konan çelişki ile ilişkilidir (101).

- Lineer Regresyon Analizi (En Küçük Kareler Regresyon Analizi)

EKK (En Küçük Kareler) regresyon tekniği bilinen en klasik regresyon tekniğidir ve sadece bağımlı değişkendeki (y) hataları dikkate aldığından, literatürde tip I regresyon tekniği olarak bilinmektedir (102). Metot karşılaştırma verilerinin analizinde, lineer regresyon analizi oldukça sık kullanılmaktadır. Test edilecek metod ile referans metodu arasında doğrusal bir ilişki tespit edilirse, elde edilecek doğrunun eğimi ve sabit terimi, metotlar arasındaki oransal ve sabit hataların açıklanmasını sağlayabilir (103, 104). Lineer regresyon; bağımlı değişkenin (y), her bağımsız değişken (x) ile doğrusal ilişkisinin incelendiği regresyon modelidir. Basit regresyon analizinde sadece tek bağımsız değişken bulunur. Düz çizginin denklemi aşağıda gözlenmektedir:

$$y = a + bx$$

“a” (intercept, kesim): Doğrunun y-ekseninin kestiği noktadır. “b” (slope, oran): Regresyon eğrisinin eğimidir. Bu ölçüler test yöntemi sonuçlarının (y), referans yöntemi sonuçlarıyla (x) ilişkisini gösterirler.

Eğim (b) aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Kesim (a) aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$a = \bar{y} - b \bar{x}$$

\bar{y} : Örneklerin test yöntemi ile analiz sonuçlarının ortalamasıdır.

\bar{x} : Örneklerin referans yöntemi ile analiz sonuçlarının ortalamasıdır.

n : x ve y veri çiftlerinin sayısıdır.

Regresyon çizgisinin etrafındaki standart sapma ($SD_{y/x}$) aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

$$SD_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - Y_i)^2}{n - 2}}$$

y_i : Bir örneğin test yöntemi ile analizi sonucudur.

Y_i : Regresyon denkleminde x_i referans değeri için hesaplanan değerdir.

Payda, serbestlik derecesidir. Serbestlik derecesi; eğim ve y -kesişim hesaplanmış olduğu için $(n-2)$ olarak hesaplanır. Bunun anlamı iki hesaplanmış değer olduğundan iki kısıt var diyerek açıklanır ($n-2$ kadar sayıda birbirinden bağımsız değer vardır).

Denkleme ait ideal değerler; eğim için a (*slope*)= 1, kesişim için b (*intercept*)= 0 ve standart sapma için $SD_{y/x}= 0$ ' dır. Çeşitli analitik hatalar sonucunda bu değerlerden kaymalar görülebilir. Oransal hatalar eğimde (a) değişmeye, sabit hatalar y -kesişimde (b) ve rastgele hatalar standart sapmada ($SD_{y/x}$) değişmelere sebep olmaktadır (75).

Regresyon teknikleri; sadece bağımlı değişkenin ölçümünde meydana gelebilecek hatanın dikkate alınması ya da ele alınan tüm değişkenlerin ölçümünde meydana gelebilecek hataların dikkate alınması bakımından incelendiğinde, Tip I ve Tip II regresyon teknikleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Tip I regresyon tekniklerinde; bağımsız olan x değişkenindeki ölçümlerin hatasız olduğu varsayılır. Bu tür regresyon tekniklerinde, meydana gelen hatanın bağımlı olan y değişkenine ait ölçümlerden kaynaklandığı varsayılır. Tip II regresyon tekniklerinde ise, hem x hem de y değişkenlerine ait gözlem değerlerinin hatalı olarak ölçüldüğü varsayılmaktadır (102).

- Deming Regresyon Analizi

Klinik çalışmalarda son yıllarda oldukça önerilen bir teknik olan Deming regresyon, tip II parametrik regresyon tekniği olarak da bilinmekte ve standartlaştırılmış temel bileşenler analizine benzemektedir. Deming, 1943 yılındaki

çalışmasında her iki değişkenin de hatalı ölçümlere sahip olması durumunda gözlem değerlerine en iyi uyacak doğru denklemini verecek fonksiyonun minimize edilmesini önermiştir (102). Deming regresyon tekniği ile hem (y) değişkenindeki, hem de (x) değişkenindeki hatalar göz önünde bulundurularak en uygun regresyon denklemi oluşturulur (104). Deming tekniği ile regresyon doğrusunu kestirmek için “λ” değerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu değer aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

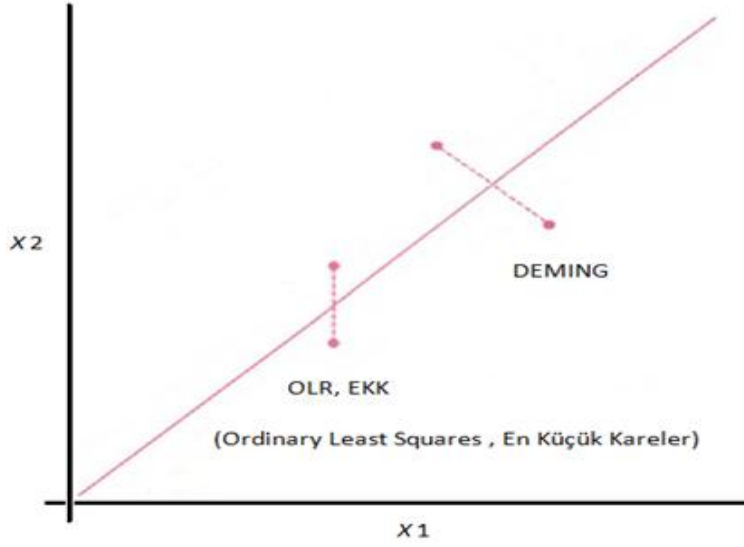
$$\lambda = \frac{S_{ex}^2}{S_{ey}^2}$$

S_{ex}^2 : x gözlem değerlerine ilişkin hataların varyansdır.

S_{ey}^2 : y gözlem değerlerine ilişkin hataların varyansdır.

Denklemden gibi hesaplanan λ değeri, karşılaştırılmak istenen iki metoda ait varyansların birbirine olan oranıdır ve kareli sapma toplamlarını doğru üzerinde minimize ederek, gözlem değerlerinin regresyon doğrusuna λ açısıyla olan uzaklığının karesi minimize edilmeye çalışılır (105).

Şekil-10’ da simetrik olan (x1) ve (x2) verilerinin standart sapmalarının eşit ve regresyon eğrisi eğiminin “1” olduğu grafik gösterilmiştir. Deming regresyonunda her bir değer regresyon eğrisine olan mesafesi ortogonal olarak (regresyon çizgisine dik açı ile) hesaplanarak, mesafelerin karelerinin toplamı minimize edilir. EKK regresyon tekniğinde ise değerlerin regresyon doğrusuna olan mesafeleri vertikal düzlemde (x2-eksenine paralel olarak) hesaplanarak, uzaklıkların karelerinin toplamı minimize edilmektedir (101).



Şekil 10: Grafiksel olarak Deming ve En Küçük Kareler Regresyon Tekniği

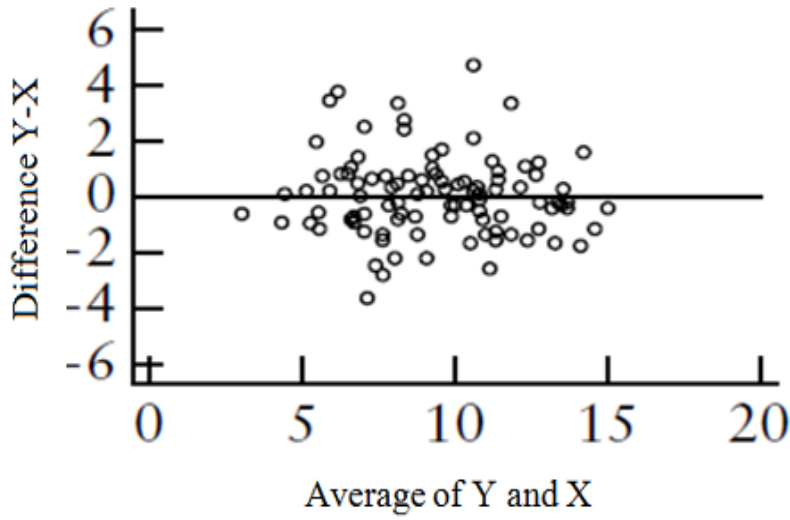
- Passing-Bablok Regresyon Analizi

P-B (Passing-Bablok) Regresyon Analizi; Passing ve Bablok tarafından önerilen, veri dağılımına ilişkin hiçbir özel varsayım içermeyen lineer regresyon modelidir (106). Passing-Bablok tekniğinde sabit terim ve eğim katsayıları parametrik olmayan temele göre tahmin edilir. Bu teknikte hata dağılımının Gaussian (normal dağılım) olması şartı yoktur. Bu teknik de diğer Tip II Regresyon tekniklerinde olduğu gibi hem x hem de y ' deki ölçüm hatalarını dikkate alır. Bu teknik hem sabit hem de oransal sistematik hataların olduğu durumlarda uygulanabilir. Ancak bu metot diğer parametrik metotlar kadar etkili değildir (107). Bu non-parametrik teknik, gözlemleri sıralama temeline dayanır ancak bu durumda hesaplamalar uzun zaman almaktadır. Bu teknikte test metodu (y) ile referans metodu (x) verilerinin bağımsız olduğu varsayılır (108). Ölçülen konsantrasyon ile beraber analitik sapmanın artması söz konusu olduğu durumlarda, Passing-Bablok tekniğinin daha uygun olduğu öne sürülmektedir (109). Regresyon denklemi oluşturulduktan sonra regresyon doğrusuna ait doğrusallığın değerlendirilmesinde, kümülatif toplam (CUSUM) kullanılır. Biyokimyada da oldukça yaygın olarak bilinen bir teknik olan CUSUM testi; regresyon doğrusunun verilere nasıl uyduğunu ya da verilerin doğru etrafında ne kadar yayıldığını değerlendirir (106).

Klinik çalışmalar için yapılan yöntem karşılaştırmalarının önemi son yıllarda giderek artmaktadır. Geleneksel karşılaştırma tekniklerinin sınırlılıklarından dolayı klinik istatistikçiler iki yaklaşımla karşı karşıyadır. Bunlardan birisi grafiksel yaklaşım, diğeri ise regresyon yaklaşımıdır (108). Her iki yaklaşım da elde edilen sonuç için kullanılan metotlar arasındaki ilişkinin belirlenmesini amaçlar. Bununla birlikte, klinik bir karara varılırken regresyon yaklaşımında, istatistiksel anlamlılığın testi ve iki metodun sunduğu sonuçlar arasındaki ilişkinin modellenmesi gerçekleştirilirken, grafiksel yaklaşımda mevcut ikililer arasındaki farklarla ilgilenilir (110).

2.8.5. Bland & Altman Grafiği (Uyum Sınırları, Limits of Agreement)

Aynı denekler üzerinden iki metot ile elde edilen ölçüm değerleri arasındaki farkların, ortalamalarına karşı gösterildiği saçılım grafiğidir. Bu grafiğe aynı zamanda “Bland – Altman Uyum Sınırları Grafiği” de denir. Bland ve Altman tarafından ortaya konan bu yöntem, metod karşılaştırma çalışmalarında geniş kullanım alanı bulmuştur (111, 112). İki ölçüm yöntemi arasındaki farka ait ortalama (d) ve standart sapma (S) hesaplanarak ölçme yöntemleri arasındaki uyum sınırları incelenebilir. Eğer farklar normal dağılım gösteriyorsa farkların sıfırın etrafında rastgele dağılması ve % 95’ inin $d - 2s$ ile $d + 2s$ arasında yer alması beklenir. Bu sınırlar içerisinde sağlanan farklılıklar klinik olarak önemli olmayabilir ve böyle bir durumda bu iki ölçme yöntemi birbirlerinin yerine kullanılabilir. Bu yöntemde $d \pm 2s$ Bland & Altman’ ın uyum sınırları olarak tanımlanmaktadır. Şekil 11’ de (y) ve (x) gibi iki farklı ölçüm yöntemlerinin ortalamaları x-eksenine, farkları ise y-eksenine yazılarak oluşturulan grafik görülmektedir.



Şekil 11: İki farklı ölçüm yönteminin Bland-Altman (ortalama ve farklar) grafiği

Farklılıklar normal dağılım gösteriyorken tahmin edilen uyum sınırlarının doğruluğunu test etmek için güven aralıklarına başvurulmaktadır. Uyum sınırlarına ait güven aralıkları aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

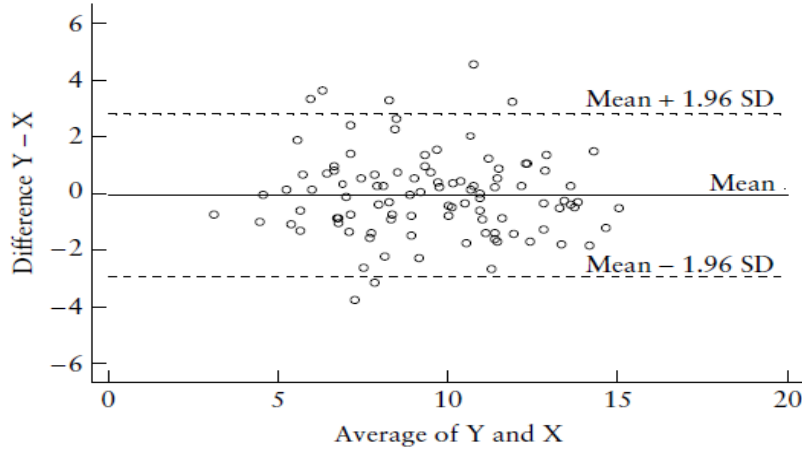
$$(d \pm 2S) \pm t * Sd$$

Yani; uyumun alt sınırı $d - 2s$ için güven aralığı; $(d - 2S) \pm t * Sd$ şeklinde hesaplanırken, üst sınırı $d + 2s$ için güven aralığı $(d + 2S) \pm t * Sd$ şeklinde hesaplanmaktadır.

Burada Sd farklara ait standart hatayı vermektedir ve uyum sınırlarına ait standart hata aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

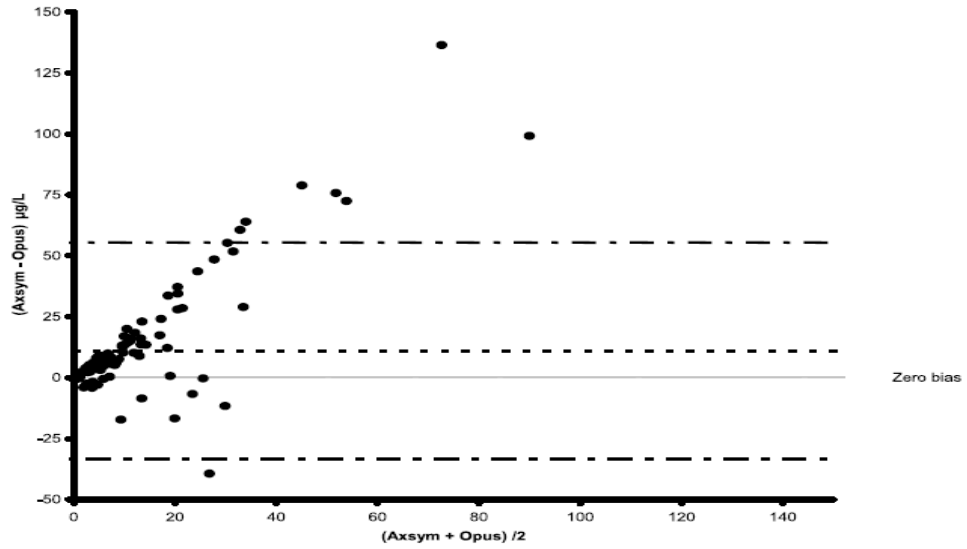
$$Sd = \sqrt{\frac{3S^2}{n}}$$

Güven aralıkları formülünde, küçük örnekler için $(n-1)$ serbestlik dereceli t tablo değeri, büyük örnekler için de tablo değeri olarak 1.96 olarak verilmektedir. Şekil-12' de ise aynı veriler için oluşturulan grafikte % 95 uyum sınırları grafiğe eklenmiştir (113).



Şekil 12: Bland-Altman Grafiği ve % 95 uyum sınırları

Bland & Altman Grafisi ortalamalar ile farklar arasındaki ilişkiyi görselleştirerek, sistematik farklılık tespiti ve dış değerlerin görsel açıdan tanımlanması için kullanışlıdır. Eğer farklılıklar, ortalama $\pm 1,96$ standart sapma arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı ve yöntemlerin birbiri yerine kullanılabileceği söylenebilir. Martin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada troponin-I konsantrasyonunu ölçen iki cihazın (Axsym ve Opus cihazları) değerleri arasında sistematik oransal farklılık olduğu bariz bir şekilde görülmektedir. Ayrıca, her iki cihazın farklarının, gerçek doğru kabul edilen “Sıfır Çizgisi (Zero bias)” üzerinde bulunmadığı için sistematik sabit farklılığın olduğu Şekil-13’ te gösterilmiştir (114).



Şekil 13: Bland-Altman Uyum Grafisi ile sistematik oransal farklılık ve sistematik sabit farklılığın gösterilmesi

2.9. Laboratuvar Yöntemlerinin Tanısal Yeterliliklerinin Değerlendirilmesi

Tanısal Yeterlilik: Tanısal yeterlilik veya doğruluk, bir klinik testin sınıflandırma aracı olarak en temel özelliğidir. Bir testin, değişik sağlık durumlarını ayırt etmede vermiş olduğu bilginin kalitesi ve ayırt etme özelliğinin ölçütüdür. En basit olarak şöyle özetlenebilir; iki değişik sağlık durumunu birbirinden ayırabilme yeteneğidir. Örneğin; Sağlık/Hastalık, Benign hastalık/Malign hastalık, Terapiye yanıt/Terapiye yanıtsızlık durumları arasında ayırt edebilme, hastalığı önceden tahmin edebilme kapasitesidir.

Laboratuvarcı, bir testi daha yeni bir test ile değerlendirmeyi düşünebilir. Laboratuvar menüsüne yeni bir test koyabilir. Bazı testleri elimine edebilir. Çalıştığı testin klinik değerini bilmek isteyebilir. Bu tür gereksinimlerde, klinik performans ölçütlerinden yararlanırız. 1991 yılında Clinical Chemistry Dergisinin ilk 6 sayısında yayınlanan en az 18 makalenin “*Klinik Performans*” açısından testlerin değerlendirilmesine yönelik olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmalardan bazıları yalnızca inceledikleri gruplarda test sonuçları ortalamalarını değerlendirmişlerdir. Diğerleri “*Sensitivite, Spesifisite, Efficiency ve Prediktif Değeri*” hesaplamışlardır. Beş çalışmada ise, test performansı için Relative Operating Characteristic (ROC) grafikleri kullanılmıştır. Bu da, değişik çalışmalarda performansı değerlendirirken kavram ve ölçütlerin oldukça farklı olduğunu göstermekte, standart bir yaklaşımın bulunmadığını ortaya koymaktadır. Araştırmacılar ile okuyucular ve uygulayıcılar arasındaki iletişim zorlaşmaktadır. Sonuçta, bir klinik testin “*Tanısal Yeterliliğini*” ve “*Performansını*” ölçme kriterlerinin ne olacağı ve bu kriterleri nasıl sergileyeceği konusunda “ortak nokta” bulunması gerekliliği ortadadır (115).

Verileri uyumluluk için analiz ederken en sık rastlanan sorun, hangi yöntemin kullanılacağına kesin olarak bilinmemesidir. Sadece uyumluluğu bir şekilde ölçmek yeterli değildir. Uyumluluğu ölçmek için farklı nedenler olabilmektedir. Bu nedenlere bağlı olarak hangi istatistiksel yöntemin kullanılacağını belirlemek önemlidir (116). Bir metodun diğeri ile kıyaslanmasında, laboratuvarcılar sıklıkla her iki yöntem sonuçlarını lineer-regresyon analizi ile değerlendirmektedir. Örnek olarak, CK-MB alınabilir. Hasta örnekleri, hem otomatize enzim immunoassay, hem de elektroforez yöntemi ile çalışılır. Amaç, kullanılan yöntem ile denenen yöntem

arasındaki uyuşma derecesini belirlemektir. Bu yaklaşımda mevcut yöntem, yeni yöntemin denendiği “standart” olarak kullanılmaktadır. Ancak, şöyle bir olasılık da mevcuttur; yeni yöntem, hatalı olarak daha az doğru ve tanısal yeterliliği daha zayıf olarak değerlendirilebilir. Daha geçerli bir yaklaşım ise, “gold standart” olarak bilinen bir referans yöntemine karşı, eski ve yeni yöntemleri denemektir. Uygulanması daha zor olmakla birlikte, daha doğru ve geçerli sonuç verir. Bu çalışma yayınlandığı taktirde, başka laboratuvarcılar tarafından da yararlanılabilir (115).

2.9.1. Tanısal Yeterlilik İçin Kullanılan Ölçütler

Tanısal bir testinin, yeterliliğinin değerlendirilmesinde kullanılan bazı terimler bulunmaktadır. Tanısal test, gold standart yöntemle karşılaştırıldığında oluşabilecek özel durumlar Tablo-3’ te gösterilmiştir. Ve bu terimlerin hesaplanması aşağıda açıklanmıştır (117, 118).

Tablo 3: Tanı testinin değerlendirilmesinde karşılaşılan durumlar

Tanı Testi Sonucu	Gerçek Durum (Gold Standart)		Total
	Hastalık Var (+)	Hastalık Yok (-)	
Pozitif (+)	A Doğru pozitif (DP)	B Yanlış pozitif (YP)	A+B
Negatif (-)	C Yanlış negatif (YN)	D Doğru negatif (DN)	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

A: Gerçekte hasta olup, tanı testi sonucuna göre de hasta olarak belirlenen olgulardır (Doğru pozitif, DP)

B: Gerçekte sağlam oldukları halde testin hatalı olarak hasta dediği olgulardır (Yanlış pozitif, YP)

C: Gerçekte hasta olup, tanı testi sonucuna göre sağlam olarak belirlenen olgulardır (Yanlış negatif, YN)

D: Gerçek tanı sonucuna uygun olarak testinde sağlam dediği gerçek negatif olgulardır (Doğru negatif, DN)

Duyarlılık veya Hassasiyet (Sensitivity): Testin, gerçek hastalar içinden hastaları ayırma yeteneğidir. Hesaplanması aşağıdaki gibidir.

$$\frac{A}{A + C} = \frac{DP}{DP + YN}$$

Özgüllük veya Seçicilik (Specificity): Testin, gerçek sağlamlar içinden sağlamları ayırma yeteneğidir. Hesaplanması aşağıdaki gibidir.

$$\frac{D}{B + D} = \frac{DN}{DN + YP}$$

Duyarlılık ve özgüllük oranlarının tersi olan, testin hatalı yargıları da aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

Yanlış Pozitif Oranı (1-Özgüllük): Gerçek sağlamlar içinden testin hatalı olarak hasta dediği olgulardır. Hesaplanması aşağıdaki gibidir.

$$(1 - \text{Özgüllük}) = \frac{B}{B + D} = \frac{YP}{YP + DN}$$

Yanlış Negatif Oranı (1-Duyarlılık): Gerçek hastalar içinden testin hatalı olarak sağlam dediği olgulardır. Hesaplanması aşağıdaki gibidir.

$$(1 - \text{Duyarlılık}) = \frac{C}{A + C} = \frac{YN}{YN + DP}$$

Önceden Tahmin Değeri (Prediktif değer): Laboratuvar testinin uygulandığı toplulukta, hastalığın yaygınlığına göre, testin doğru tanı koyma olasılığıdır.

Pozitif Tahmin Değeri: Tanı testinin sonucuna göre belirlenen pozitifler içerisindeki doğru pozitiflerin oranıdır. Hesaplanması aşağıdaki gibidir.

$$\frac{A}{A+B} = \frac{DP}{DP+YP}$$

Negatif Tahmin Değeri: Tanı testinin sonucuna göre belirlenen negatifler içerisindeki doğru negatiflerin oranıdır. Hesaplanması aşağıdaki gibidir.

$$\frac{D}{C+D} = \frac{DN}{DN+YN}$$

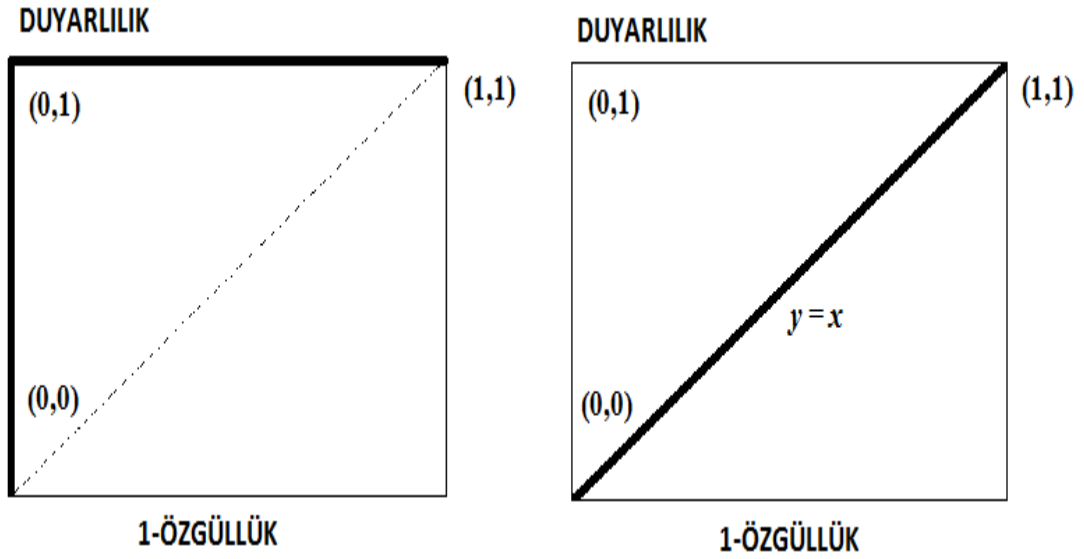
2.9.2. Tanısal Yeterlilik İçin ROC (Alıcı İşlem Karakteristikleri, Receiver Operating Characteristic) Analizinin Kullanılması

Tanı Testi performanslarının değerlendirilmesi ve kıyaslanması için en yaygın kullanıma sahip olan yöntem ROC eğrisidir. Klinik çalışmalarda sürekli sayıların kullanıldığı ölçümlerde olguları ayırma (hasta/sağlam), çözümlmeyi karmaşık hale getirir ve hata olasılığını yükseltir. Sonuçta, klinik şartlara bağlı olarak tanı testinin optimum etki noktası değişmektedir. Bu çerçevede seçilen farklı eşik değerleri için bulunan farklı duyarlılık-özgüllük karakterlerine bağlı olarak ara seçenekler belirlenerek, ROC eğrileri (*Receiver operating characteristic curves*) oluşturulmuştur. ROC eğrisi yöntemi;

- ✓ *Testin ayırt etme gücünün belirlenmesine*
- ✓ *Çeşitli testlerin etkinliklerinin kıyaslanmasına*
- ✓ *Uygun pozitiflik eşiğinin belirlenmesine*
- ✓ *Laboratuvar sonuçlarının kalitesinin izlenmesine*
- ✓ *Uygulayıcının gelişiminin izlenmesine*
- ✓ *Farklı uygulayıcıların etkinliklerinin kıyaslanmasına olanak sağlar.*

ROC eğrisinin oluşturulacağı koordinat sisteminin ordinatında (y-ekseni) tanı testinin gerçek pozitif değeri (duyarlılık), apsisinde (x-ekseni) ise yanlış pozitif

değeri (1-özgüllük) yer alır. Tanı testi ne kadar iyi ise eğri o kadar yukarıya (yüksek duyarlılık bölgesi) ve sola (düşük yanlış pozitif oranı bölgesi) doğru kayar. Yanlış değerlere sahip olmayan ideal bir testte ROC eğrisi (0,0)-(0,1)-(1,1) noktalarını birleştirmektedir. Buna karşın ROC çizimi $y=x$ fonksiyonuna yaklaştıkça başarısız bir test ortaya çıkar (Şekil-14). Çünkü bu testte yanlış değerlerin oranı en yükselmektedir. Bu fonksiyonun altındaki ROC eğrisine sahip test başarısızdır (117, 118).



Şekil 14: İdeal ve kötü performans göstergesi olan ROC eğrileri

ROC Eğrisi Altındaki Alanın Yorumlanması: ROC eğrisinin altında kalan alan (Area Under Curve: AUC), testin hastalar ile hasta olmayan bireyleri ayırmadaki doğruluk oranını belirler. Bu alanın büyüklüğü, üzerinde çalışılan tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistiksel olarak önemini gösterir. Üzerinde çalışılan tanı testinin hiç ayırma yeteneği olmadığı durumda ROC eğrisi altındaki alanın beklenen değeri 0.50' dir. Mükemmel bir test ise sıfır yanlış pozitif ve sıfır yanlış negatif ile alanın değeri 1.00 olacaktır. Test, bu iki değer arasında bir alana sahip olmalıdır (117, 118).

Eğri altındaki alanların yorumlanmasında aşağıda verilen derecelendirmeler kullanılabilir.

- 0.90 - 1.00 = Mükemmel
- 0.80 - 0.90 = İyi

- $0.70 - 0.80 = \text{Orta}$
- $0.60 - 0.70 = \text{Zayıf}$
- $0.50 - 0.60 = \text{Başarısız}$

ROC Eğrilerinin Kıyaslanması: İki yöntemin tanısal yeterliliğini karşılaştırmak için eğri altında kalan alanlar karşılaştırılabilir. İki ROC eğrisine ait alanların benzer olması eğrilerin farklı olmadığı anlamına gelmemektedir. Bu nedenle istatistiksel olarak bu alanları karşılaştırmak gerekir (119-122).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi acil laboratuvarına kabul edilen, CK-MB ölçümü yapılacak örnekler en geç iki saat içinde 10 dakika süreyle 4000 devir/dakikada santrifüj edilerek, serum örnekleri -80°C' de saklandı. Seçilen örneklerin hemolizli, lipemik ve ikterik olmamasına dikkat edildi.

3.1.1. Ön Değerlendirme Deneyleri

- Deney İçi (Within-run) Tekrarlanabilirlik (Presizyon) Deneyi

10.08.2011 ile 24.12.2011 tarihleri arasında serum CK-MB tayini isteğiyle, hastanemiz acil laboratuvarına kabul edilen, yaklaşık 20 hastanın serum örnekleri, her iki cihazın deney içi (within-run) presizyon (tekrarlanabilirlik) değerlendirmesi için, sırasıyla Architect c 8000 biyokimya cihazı ve Architect i 1000 SR hormon cihazı için normal düzey (17.3 IU/L, 1.14 ng/ml) ve patolojik düzey (46.3 IU/L, 12.77 ng/ml) olmak üzere iki farklı CK-MB konsantrasyonlu serum havuzları şeklinde hazırlandı. Her iki cihazın tekrarlanabilirlik performansları değerlendirilirken CLSI EP-5A protokolü uygulandı.

Her iki seviye serum havuzundan 20' şer kez ölçüm yapıldı, standart sapmaları ve % CV (varyasyon katsayısı)' leri hesaplandı. Her çalışmada kalite-kontrolü sağlamak amacıyla, her iki cihaz için günlük iç-kalite kontrolü çalışıldı. Çalışma boyunca aynı kalibratör, kontrol ve reaktif lotu kullanıldı.

Sonuçlar impresizyon (tutarsızlık) ölçütü olan varyasyon katsayısı (CV) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

CK-MB için izin verilen % belirsizlik; insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiş ve Westgard' ın sitesinde güncellenmiş son hali mevcut olan (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>), biyolojik varyasyonlar üzerinden hesaplanan % Belirsizliğe göre, CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle ölçümü için değerlendirildi.

- Geri Kazanım (Recovery) Deneyi

Geri kazanım çalışmasında; CK-MB düzeyi normal (14.8 IU/L) ve CK-MB düzeyi patolojik (110 IU/L) olan serum havuzlarına, Architect c 8000 cihazı için referans numarası: 6K25-10, lot numarası: 10295Y600, değeri: 145 IU/L olan kalibratörden 0.1 ml eklendi. Aynı şekilde Architect İ 1000 SR cihazı için, CK-MB düzeyi normal (0.8 ng/ml) ve CK-MB düzeyi patolojik (67.8 ng/ml) olan serum havuzlarına, referans numarası: 2K42-01, lot numarası: 981250, değeri: 60.0 ng/ml olan kalibratörden 0.1 ml eklendi.

Her iki cihaz için, serum CK-MB düzeyi normal ve patolojik olan serum havuzları, kalibratör eklenmeden önce ve kalibratör eklendikten sonra rastgele hatayı önlemek amaçlı 4' er kez çalışılarak ortalamaları alındı. Elde edilen ortalamalar, kalibratör eklemeyen önceki ölçülen değerin ortalamasından çıkarılarak, geri kazanım miktarı % değişim (% Bias) olarak bulundu. CK-MB için izin verilen % bias; insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiş ve Westgard' ın sitesinde güncellenmiş son hali mevcut olan (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>), biyolojik varyasyonlar üzerinden hesaplanan % Bias' a göre, CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle ölçümü için değerlendirildi.

- İnterferans Deneyi

İnterferans çalışmasında, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları hazırlandı ve hemolizat eklenerek seri dilüsyonla farklı hemoglobin (Hb) konsantrasyonlarında örnekler elde edildi. Hemoliz düzeyi en yüksek olan örneklerdeki Hb konsantrasyonu Abbott Cell Dyn - 3700 SL hemogram cihazı ile ölçüldü. Seri dilüsyonlar ile elde edilen serum örneklerindeki CK-MB konsantrasyonları her iki cihazda da ölçülerek, % değişim miktarları belirlendi. Hemolizat eklendiğinde CK-MB konsantrasyonlarında saptanan farkların yüzdesi

veya % Bias, $[(C_1-C_0)/C_0] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı. C_0 , hemolizat içermeyen örneklerdeki; C_1 ise tüm hemoliz düzeylerindeki analit konsantrasyonunu göstermektedir. Çıkan ölçümlerden % interferans hatası; CK-MB için izin verilen % bias olarak, insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiş ve Westgard'ın sitesinde güncellenmiş son hali mevcut olan (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>), biyolojik varyasyonlar üzerinden hesaplanan % Bias' a göre, CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle ölçümü için değerlendirildi. Ayrıca, hem Architect c 8000 Biyokimya cihazı için hem de Architect i 1000 SR hormon cihazına ait CK-MB kit prospektüsünde belirtilen hemolize bağlı interferans değerleri ile elde ettiğimiz değerler karşılaştırıldı.

Hemolizat hazırlanması:

Hemolizat örneği taze alınmış EDTA'lı tam kan örneklerinden hazırlandı. Hb konsantrasyonu 16 g/dL'nin üzerinde olan tam kan örnekleri seçildi. Örnekler yavaşça karıştırıldıktan sonra 2'şer mL alındı ve 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Plazma uzaklaştırıldı ve kalan kısım 10 mL (0.15 mol/L sodyum klorür) salin eklenerek yavaşça karıştırılıp tekrar 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek salin uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Kalan eritrosit paketi üzerine deiyonize su ilave edilmeden -80 derecede donduruldu. Çalışma zamanında dondurucudan çıkarılan hemolizat oda sıcaklığında çözüldü ve 10 000 x g de 5 dakika tekrar santrifüj edilerek hücresel materyal çöktürüldü, süpernatant alınıp Hb değeri ölçüldü ve stok solüsyonu olarak havuzlara eklenmek üzere ayrı olarak porsiyonlara ayrıldı.

Normal düzey serum havuzunun hazırlanması:

Hastanemize başvuran hastalardan, kardiyak parametreleri normal düzeyde (CK-MB aktivite için < 20 IU/L, CK-MB kütle için < 3.1 ng/mL, troponin için < 0.03 ng/mL) olan hemolizsiz serum örnekleri toplanarak 40 mL'lik serum havuzu oluşturuldu.

Patolojik serum havuzunun hazırlanması:

Hastanemiz acil servisine başvuran ve akut koroner kalp hastalığı tanısı alan hastalar izlenerek kardiyak belirteçleri panik değerlerin üzerinde (CK-MB aktivite

için >100 IU/L, CK-MB kütle için >10 ng/mL, troponin için > 0.2 ng/mL) olanların hemolizsiz serum örnekleri toplandı ve 40 mL' lik serum havuzu hazırlandı.

Havuzlara hemolizat eklenmesi:

Öncelikle 40 mL' lik normal serum havuzundan 6 mL alınıp cam deney tüpüne konuldu ve "Serum Havuzu A" olarak işaretlendi. Kalan 34 mL' lik havuz "Serum Havuzu B" olarak işaretlendi. Önceden hazırlanmış ve Hb değeri 21 g/dL olarak ölçülmüş olan hemolizattan, Serum Havuzu A' nın son Hb konsantrasyonunun 2.1 g/dL olması için ne kadar alınması gerektiği $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü ile hesaplandı. Serum Havuzu A' dan hesaplanan hacim kadar serum pipetlenip atıldı ve yerine aynı miktarda hemolizat eklendi (0.6 mL) ve vorteks karıştırıcıda karıştırıldı.

Hemolizatın Serum Havuzu A' ya yaptığı dilüsyon etkisini eşitlemek için kalan 34 mL lik Serum Havuzu B'den aynı oranda (3.4 mL) serum atılıp yerine eşit miktarda salin eklendi ve vorteks karıştırıcıda karıştırıldı.

Hemoglobin konsantrasyonu 2.1 g/dL olan Serum Havuzu A (1. tüp)' ün yanına 10 adet boş deney tüpü dizilerek numaralandı. İkinci tüpe Serum Havuzu A'dan 3 mL ve Serum Havuzu B'den 3 mL eklenip vorteks karıştırıcıda homojen olacak şekilde karıştırıldı. Aynı işlemler 10. tüpe kadar tekrarlanarak Hb konsantrasyonları $\frac{1}{2}$ oranında azalan örnekler elde edilmiş oldu. Son tüpe sadece Serum Havuzu B'den 3 mL eklendi. 11 tüp, hemoglobin konsantrasyonları en yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde numaralandı. 1.tüpten itibaren Hb konsantrasyonları sırası ile 2.13, 1.12, 0.610, 0.305, 0.153, 0.076, 0.038, 0.019, 0.010 0.005, 0 g/dL olarak hesaplandı.

Patolojik serum havuzuna aynı işlemler uygulanarak yine 11 adet örnek hazırlandı. Patolojik düzeyde Hb konsantrasyonları sırası ile 1.tüpten itibaren 2.01, 1.00, 0.503, 0.251, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007, 0.003, 0 g/dL olarak hesaplandı.

3.1.2. Son Değerlendirme Deneyleri

- Yöntem Karşılaştırılması

02.01.2012–09.01.2012 tarihleri arasında hastanemize tanı ve tedavi amacıyla başvuran 40 hastanın, serum CK-MB düzeyleri öncelikle Abbott firmasının Architect c 8000 cihazı ile tayin edildi. Cihazların karşılaştırılmasında kullanılacak serum örnekleri -80°C’ de muhafaza edildi. CLSI EP-9A protokolüne göre numuneler hem Architect c 8000 cihazı hem de Architect i 1000 SR cihazında çift olarak çalışıldı. Kalite-kontrolü sağlamak amacıyla her iki cihaz için günlük iç-kalite kontrolü çalışıldı. Çalışma boyunca aynı kalibratör, kontrol ve reaktif lotu kullanıldı. Bir gün içinde çalışılması gereken serum örnekleri, protokole uygun olarak 2 saat içinde çalışıldı. Çalışmada kullanılacak serum örneklerinin % 50’ si, protokole belirtildiği gibi rapor aralığı içindeki referans sınırlarının dışındaydı ve çalışma 6 günde (günde 6-7 örnek çalışılarak) tamamlandı.

- Deneyler Arası (Between-run)Tekrarlanabilirlik Deneyi

26.12.2011 ile 28.12.2011 tarihleri arasında serum CK-MB tayini isteğiyle, hastanemiz acil laboratuvarına kabul edilen, yaklaşık 50 hastanın serumundan, her iki cihazın deneyler arası presizyon (tekrarlanabilirlik) değerlendirmesi için normal ve patolojik düzey olmak üzere iki farklı CK-MB konsantrasyonlu serum havuzu hazırlandı. Hazırlanan normal düzey serum havuzu, 20 gün boyunca çalışmaya yetecek miktarda porsiyonlara bölünerek -80°C’ den daha düşük sıcaklıkta muhafaza edildi. Aynı işlemler patolojik düzey serum havuzu için de uygulandı.

Her iki cihazın tekrarlanabilirlik performansları değerlendirilirken CLSI EP-5A protokolü uygulandı. Protokole uygun olarak, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları 20 gün boyunca, her iki cihazda sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez çalışıldı. Aynı günde iki çalışma arasında en az 3 saat olmasına dikkat edildi ve her örnek, her çalışma için çift çalışıldı. Çalışma içi çift ölçümlerin arasındaki fark, presizyon ön değerlendirmesinden elde edilen standart sapmanın 5.5 katından fazla olduğunda o çalışma değerlendirme dışı tutularak rastgele hatalardan kaynaklanabilecek aşırı sapmaların önlenmesi amaçlandı.

Her bir serum havuzu (normal düzey ve patolojik düzey) için 20 gün boyunca yapılan ölçümlerin aritmetik ortalaması, standart sapmaları ve % CV (varyasyon katsayısı) hesaplandı. Sonuçlar impresizyon (tutarsızlık) ölçütü olan varyasyon katsayısı (CV) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

CK-MB için izin verilen % belirsizlik; insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiş ve Westgard'ın sitesinde güncellenmiş son hali mevcut olan (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>), biyolojik varyasyonlar üzerinden hesaplanan % Belirsizliğe göre, CK-MB Aktivite ve kütle CK-MB ölçümü için değerlendirildi.

3.1.3. Receiver Operatör Characteristic (ROC) Analizi Eğrisinin Çizilmesi

02.01.2012–09.01.2012 tarihleri arasında hastanemize tanı ve tedavi amacıyla başvuran 40 hastanın serum örneği çalışma için kullanıldı. Bu serum örneklerinden 20 tanesi klinik olarak AMI tanısı alan hastalara ait olarak belirlendi. Hastalardan kan alınma zamanı, göğüs ağrısının başlangıcından yaklaşık 6 saat sonra olacak şekilde belirlendi. Kontrol ve hasta serum örneklerine ait duyarlılık ve özgüllük değerlerinden yararlanılarak, x eksenine *1-özgüllük*, y eksenine ise *duyarlılık* yer alacak şekilde ROC eğrisi oluşturuldu. Her iki cihaz için oluşturulan grafiklere göre “Eğri altında kalan alan” testlerin tanısal yeterliliğini değerlendirmek için birbirleri ile karşılaştırıldı.

3.1.4. Plazma Örnekleri İle Serum Örneklerinin Karşılaştırılması

10.01.2012 ile 15.01.2012 tarihleri arasında, CK-MB ölçümü üzerine antikoagülanların etkisini incelemek için hastanemiz acil laboratuvarına kabul edilen 10 hastanın her birinden, referans numarası: 455071, lot numarası: A11100XN olan Vacuette jelli biyokimya tüplerine (J) ve referans numarası: 12010, lot numarası: 1291 olan Vacutest Kima Arzergrande lityum heparinli (Li.H) tüplerine kan alındı. Alınan numuneler hemen santrifüj edilerek, süpernatantlar -80°C’de bekletildi.

Aynı şekilde, AKS tanısı almamış ve klinik açıdan herhangi bir semptom ve şikayeti olmayan, kardiyak parametreleri normal düzeyde (CK-MB aktivite için < 20 IU/L, CK-MB kütle için < 3.1 ng/mL, troponin için < 0.03 ng/mL) bulunan 10

kişinin her birinden, referans numarası: 455071, lot numarası: A11100XN olan Vacuette jelli biyokimya tüplerine (J) ve referans numarası: 12010, lot numarası: 1291 olan Vacutest Kima Arzergrande lityum heparinli (Li.H) tüplerine kan alındı. Alınan numuneler hemen santrifüj edilerek, süpernatantlar -80°C’ de bekletildi.

Muhafaza edilen plazma ve serum numuneleri oda sıcaklığında en 30 dakika bekletilmek koşuluyla çözdürüldükten sonra her iki cihazda çalışıldı.

3.2. Yöntem

Serum CK-MB düzeyi tayini için, Abbott firmasına ait Architect c 8000 Biyokimya cihazında ve Abbott firmasına ait Architect i 1000 SR Hormon cihazında kendilerine ait CK-MB ölçüm reaktifleri kullanıldı.

3.2.1. Ölçüm Yapılan Cihazların Ölçüm Prensipleri

- Architect CK-MB Liquid (CK MB aktivite ölçümü)

Kullanılan cihazın ve ticari kitin adı: Bu çalışmada; Abbott 6K2503-3.0/F21 kodlu orijinal ticari kit (Sentinel Diagnostics, Milano, Italy) ile seri numarası: C801211 ve referans numarası: 01G06-01 olan Architect c 8000 Biyokimya cihazı (Abott Laboratories Abott Park, IL 60064, USA) kullanılmıştır.

Architect CK-MB Liquid için kullanılan Reaktifler:

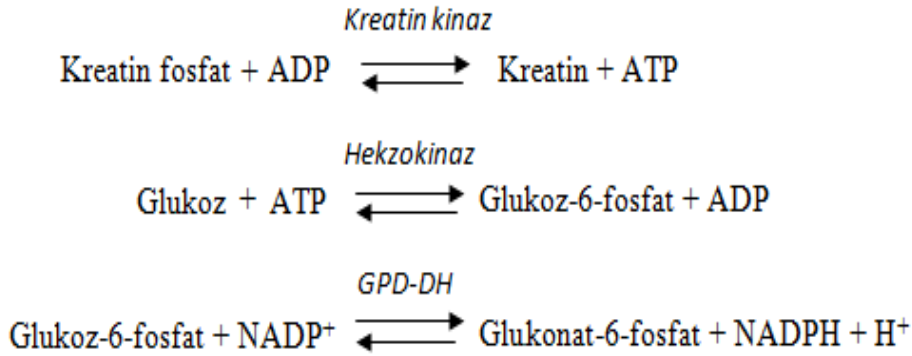
- ✓ Reaktif 1: İmidazol tamponu, glukoz, N-asetil sistein, magnezyum asetat, Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP), Etilen diamin tetra asetikasit (EDTA), heksokinaz (HK), monoklonal fare antikoru (Anti-M)
- ✓ Reaktif 2: İmidazol tamponu, kreatin fosfat, Adenozin difosfat (ADP), Adenozin monofosfat (AMP), diadenozin pentafosfat, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6P-DH)

Ölçüm Yöntemi:

Reaktif 1, serum numunesi içinde CK’ nın M alt birimine bağlanan ve bu sayede M alt biriminin aktivitesini inhibe eden bir antikor içermektedir. Enzimin B alt birimi, Reaktif 2’ deki substrat üzerine serbestçe etki edebilmektedir. CK, kreatin fosfattan

bir fosfat grubunun adenozin difosfata (ADP), kreatin ve adenozin trifosfat (ATP) ürünlerini açığa çıkaracak şekilde aktarılmasını tersinir şekilde katalize eder. Oluşan ATP; glukozdan, glukoz-6-fosfat ve ADP üretmek için kullanılır. Bu reaksiyon, maksimum aktivite için magnezyum iyonlarını gerektiren heksokinaz (HK) tarafından katalize edilir. Glukoz-6-fosfat, nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADP) eş zamanlı olarak indirgenmesi ile birlikte meydana gelen glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6P-DH) enziminin etkisi ile okside olur ve NADPH ile 6-fosfoglukonat açığa çıkar. NADPH oluşumuna bağlı olarak 340 nm’ deki absorbans artış hızı, numunedeki CK-MB aktivitesi ile doğru orantılıdır.

CK-BB serumda düşük miktarda bulunduğundan ve CK-M aktivitesi ile CK-B aktivitesi benzer olduğundan, CK-MB aktivitesi, ölçülen CK-B aktivitesinin 2 ile çarpımı sonucu hesaplanır. Bu reaksiyonların oluşumu Şekil-15’ de gösterilmiştir.



Şekil 15: Kreatin kinaz enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaksiyonların gösterimi

Architect c 8000 Biyokimya cihazında CK-MB için analitik ölçüm aralığı: 3-1000 IU/L olup bu değer üstündeki değerleri belirlemek için, örnekler 1:10 şeklinde dilüe edilebilir.

Architect CK-MB Liquid için kullanılan Kalibratörler:

Kreatin kinaz MB izoenziminin aktivite ölçümü için, referans numarası: 6K25-10, lot numarası: 10295Y600 ve konsantrasyonu: 145 IU/L olan, Architect c 8000 biyokimya cihazı için orijinal CK-MB kalibratörü kullanıldı.

Architect CK-MB Liquid için kullanılan Kontroller:

Kreatin kinaz MB izoenziminin aktivite ölçümü için, referans numarası: 6K25-20, lot numarası: 10296Y600 olan, Architect c 8000 biyokimya cihazı için orijinal CK-MB kontrolü kullanıldı.

- Architect STAT CK-MB (CK-MB kütle ölçümü)

Kullanılan cihazın ve ticari kitin adı: Bu çalışmada; Abbott 2K42-B2K42T kodlu orijinal ticari kit (Fisher Scientific, Valley Pike-Middletown, Virginia, USA) ile seri numarası: İ1SR50124 ve referans numarası: 01L86-01 olan Architect i 1000 SR Hormon cihazı (Abott Labotatories Abott Park, IL 60064, USA) kullanıldı.

Architect STAT CK-MB için kullanılan Reaktifler:

- ✓ Mikropartiküller: Protein (sığır) stabilizatörü ile tris tamponu içerisinde Anti-CK-MB (monoklonal fare antikoru) kaplı partiküllerdir. Koruyucu olarak antimikrobiyal maddeler içermektedir.
- ✓ Konjugat: Protein (sığır) stabilizatörü ile MES [2-(N-Morpholino) etan sülfonik asit] tamponu içerisinde Anti-CK-MB (monoklonal fare antikoru) akridinyum etiketli konjugattır. Koruyucu olarak antimikrobiyal maddeler içermektedir.
- ✓ Diğer reaktifler: Pre-Trigger (%1,32 hidrojen peroksit içerir) solüsyonu, Trigger (0,35 Normal sodyum hidroksit içerir) solüsyonu, Yıkama (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) tamponu ve koruyucu olarak antimikrobiyal maddelerdir.

Ölçüm Yöntemi:

Architect stat CK-MB tetkiki, insan serumu ve plazmasında bulunan kreatin kinaz (CK-MB)' nin MB izoenziminin varlığının belirlenmesi için Kemiluminesans Mikropartikül Enzim İmmünolojik test (CMIA) teknolojisi ile kemifleks olarak tanınan esnek tetkik protokoller kullanan iki adımlı bir immünolojik tetkiktir.

İlk adımda, örnek ve anti-CK-MB kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Örnekteki mevcut CK-MB, anti-CK-MB kaplı mikropartiküllere tutunur. İnkübasyon ve yıkamadan sonraki ikinci adımda, anti-CK-MB akridinium etiketli konjugatı reaksiyon karışımına ilave edilir. Diğer bir inkübasyon ve yıkama dönüşümünden sonra pre-trigger ve trigger solüsyonları reaksiyon karışımına ilave edilir. Elde edilen kemilüminesan reaksiyon, rölatif ışık üniteleri (RLU) olarak ölçülür. Örnekteki CK-MB miktarı ve Architect I sistem optik sistemleri ile tespit edilen RLU' lar arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. CK-MB konsantrasyonu,

konsantrasyonları bilinen CK-MB kalibratörleri ile gerçekleştirilen standart bir eğriye karşı okunur.

Architect STAT CK-MB için kullanılan Kalibratörler:

Kreatin kinaz MB izoenziminin kütle ölçümü için, referans numarası: 2K42-01 olan 6 adet orijinal CK-MB kalibratörü kullanıldı.

- Cal A: Lot numarası: 981247, konsantrasyonu: 0,0 ng/ml
- Cal B: Lot numarası: 981248, konsantrasyonu: 3,8 ng/ml
- Cal C: Lot numarası: 981249, konsantrasyonu: 12 ng/ml
- Cal D: Lot numarası: 981250, konsantrasyonu: 60 ng/ml
- Cal E: Lot numarası: 981251, konsantrasyonu: 135 ng/ml
- Cal F: Lot numarası: 981252, konsantrasyonu: 300 ng/ml

Architect STAT CK-MB için kullanılan Kontroller:

Kreatin kinaz MB izoenziminin kütle ölçümü için, referans numarası: 2K42-10 olan 3 adet orijinal CK-MB kontrolü kullanıldı.

- CONTROL L: Lot numarası: CKM13091
- CONTROL M: Lot numarası: CKM13092
- CONTROL H: Lot numarası: CKM13093

3.3. İstatistiksel Analiz

Yöntem karşılaştırma, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, interferans deneylerinde, ROC analizinde ve plazma ile serum örneklerinin karşılaştırılmasında MedCalc 12.3.0.0 istatistik paket programı kullanılarak veriler analiz edildi. İnterferans çalışmasında; elde edilen değerlerin, artan hemoglobin konsantrasyonu ile ne kadar etkilendiğini gözlemlemek için korelasyon analizi uygulandı. Ayrıca yöntem karşılaştırma deneyinde, Architect c 8000 ve Architect I 1000 SR cihazlarında ölçülen değerler arasındaki ilişki yine, korelasyon analizi ($p < 0.05$ düzeyinde) uygulanarak değerlendirildi. Cihazlar arasındaki uyumun değerlendirilmesi için Lineer regresyon analizi, Passing-Bablok regresyon analizi ve Bland-Altman Grafiği kullanıldı. Tanısal yeterlilik için ROC analizi uygulandı ve

elde edilen “Eğri Altında Kalan Alanların” istatıksel açıdan anlamlılığı değerlendirildi. Normal düzey CK-MB ve patolojik düzey CK-MB olmak üzere, plazma ile serum örnekleri arasındaki farkların değerlendirilmesi için eğleştirilmiş t-testinin, non-parametrik karşılığı olan Wilcoxon Rank-Sign testi kullanıldı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılık ($p < 0.05$ düzeyinde) değerlendirildi. Ayrıca; normal ve patolojik düzey ayırımı yapılmadan tüm plazma ve serum rneklерinin karşılaştırılması için Wilcoxon Rank-Sign testi kullanıldı. Plazma ile serum örnekleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için korelasyon analizi ($p < 0.05$ düzeyinde) uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Tekrarlanabilirlik Çalışmasına Ait Bulgular

Tekrarlanabilirlik (prezisyon), tekrarlanan ölçümlerle bulunan değerlerin birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Her iki cihazın prezisyon performanslarını değerlendirirken CLSI EP-5A protokolü uygulandı. Prezisyon değerlendirmesi amacıyla iki farklı düzeye sahip (normal-patolojik) serum havuzları kullanıldı.

1- Deney-içi (Within-run) tekrarlanabilirlik çalışmasında, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzlarından 20' şer ölçüm yapıldı. Ortalamaları, standart sapmaları ve % CV (varyasyon katsayısı) hesaplandı. Böylelikle her iki cihazın, normal ve patolojik düzeyler için gün-içi (CV_{w-day}) analitik varyasyonu belirlenmiş oldu.

2- Deneyler arası tekrarlanabilirlik çalışması için önceden porsiyonlara ayrılmış, normal ve patolojik düzey serum havuzları, 20 gün boyunca her iki cihazda sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez çalışıldı. Aynı günde iki çalışma arasında en az 3 saat olmasına dikkat edildi ve her örnek protokole uygun olarak çift çalışıldı. Böylelikle her iki cihazın, normal ve patolojik düzeyler için günler-arası (CV_{b-day}) analitik varyasyonu belirlenmiş oldu.

3- Her çalışmada kalite-kontrolü sağlamak amacıyla, her iki cihaz için günlük iç-kalite kontrolü çalışıldı.

4- Çalışma boyunca aynı kalibratör, kontrol ve reaktif lotu kullanıldı. Sonuçlar impresizyon (tutarsızlık) ölçütü olan varyasyon katsayısı (% CV) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

5- Sonuçlar değerlendirilirken; CK-MB için izin verilen % belirsizlik, insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiş ve Westgard' ın sitesinde güncellenmiş son hali mevcut olan (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>), biyolojik varyasyonlar üzerinden hesaplanan % Belirsizliğe göre, CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle lm için değerlendirildi.

6- Gün-içi tekrarlanabilirlik çalışması ile elde edilen gün-içi (CV_{w-day}) analitik varyasyon ve günler-arası tekrarlanabilirlik çalışması ile elde edilen günler-arası (CV_{b-day}) analitik varyasyondan, total analitik hata ($CV_{an-total}$) aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$CV_{an-total}^2 = CV_{w-day}^2 + CV_{b-day}^2$$

7- Total analitik hata ($CV_{an-total}$) ve gün-içi (CV_{w-day}) analitik varyasyonun, her iki cihazda, hem normal düzey hem de patolojik düzey için aşağıdaki kriterleri sağlayıp sağlamadığı değerlendirildi.

- $CV_{an-total} \leq 0.5 CV_w$
- $CV_{w-day} \leq 0.25 TE\%_b$
- $CV_{an-total} \leq 0.33 TE\%_b$

İnsanlardaki biyolojik değişkenliğe göre CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle için belirlenen, birey-içi biyolojik varyasyon (CV_w), bireyler-arası biyolojik varyasyon (CV_g), belirsizlik için arzu edilen yüzde (I%), doğruluk için arzu edilen yüzde (%B) ve izin verilebilir total hata için arzu edilen yüzde (TEA%) aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo-4).

Tablo 4: CK-MB Aktivite ve CK-MB Kütle için birey-içi, bireyler-arası biyolojik varyasyon değerleri ile arzu edilen belirsizlik, arzu edilen doğruluk ve izin verilebilir total hata değerleri

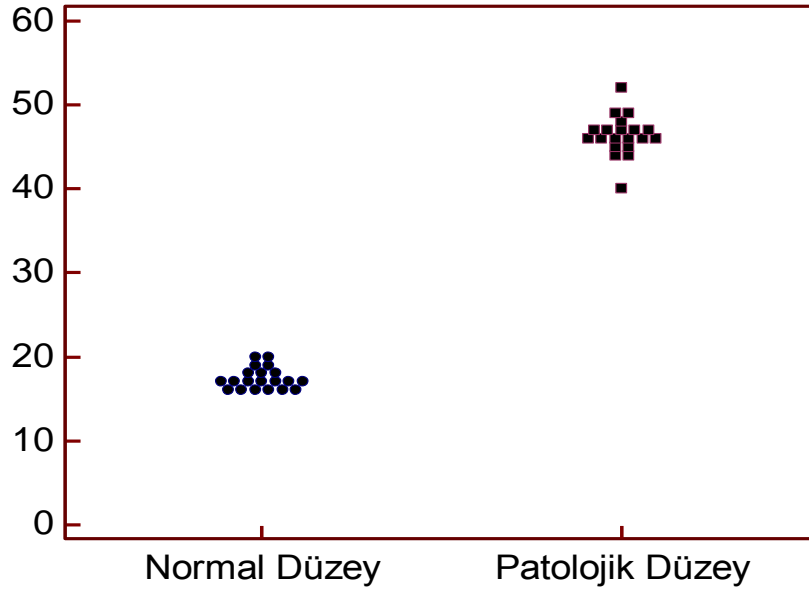
Analit	Biyolojik Varyasyon		Arzu Edilen Özellik		
	CV _w	CV _g	I (%)	B (%)	TE (%)
CK-MB (Aktivite)	19.7	24.3	9.9	7.8	24.1
CK-MB (Kütle)	18.4	61.2	9.2	16.0	31.2

Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait elde edilen bulgular (Tablo-5)' te gösterilmektedir.

Tablo 5: Architect c 8000 Biyokimya cihazında deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait elde edilen bulgular

ARCHITECT c 8000 Biyokimya Cihazı		
	Normal Düzey	Patolojik Düzey
Ortalama (IU/L)	17.3	46.3
Standart Sapma	1.30	2.36
%CV	7.5	5.1

Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı (Şekil-16)' da gösterilmektedir.



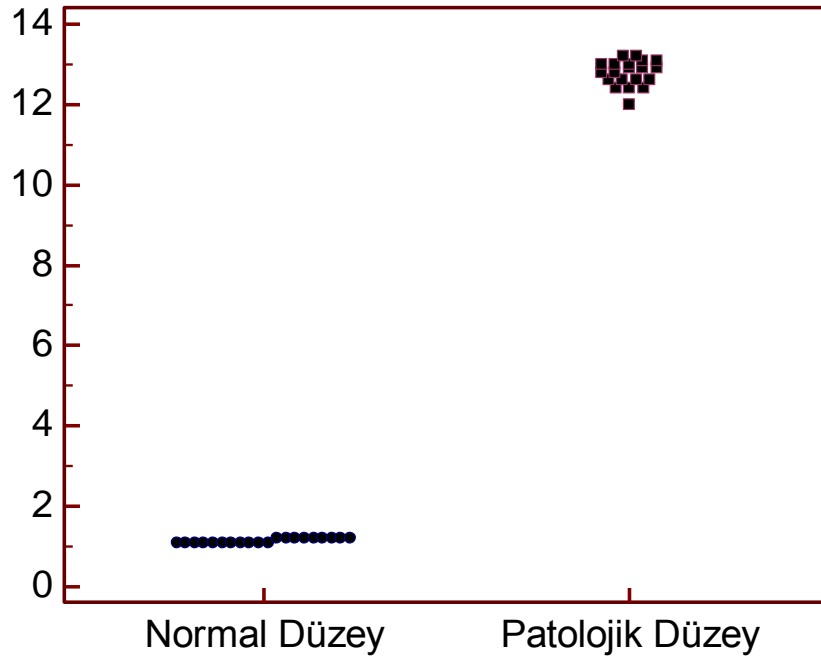
Şekil 16: Architect c8000 Biyokimya cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait değerlerin noktasal dağılımı

Architect i 1000 SR Hormon cihazında deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait elde edilen bulgular (Tablo-6)' da gösterilmektedir.

Tablo 6: Architect i 1000 SR Hormon cihazında deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait elde edilen bulgular

ARCHITECT i 1000 SR Hormon Cihazı		
	Normal Düzey	Patolojik Düzey
Ortalama (ng/ml)	1.1	12.7
Standart Sapma	0.05	0.31
%CV	4.4	2.4

Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait değerlerin noktasal dağılımı (Şekil-17)' de gösterilmektedir.



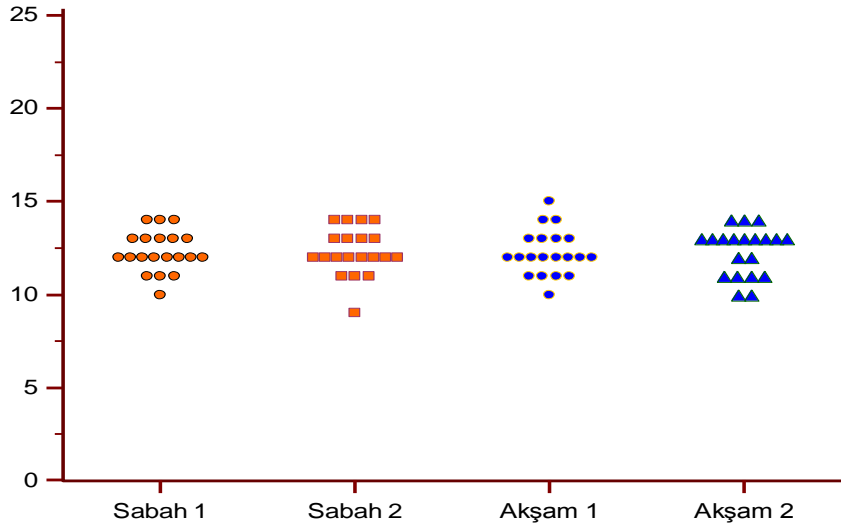
Şekil 17: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deney-içi tekrarlanabilirlik çalışması için, normal ve patolojik düzeylere ait değerlerin noktasal dağılımı

Architect c 8000 Biyokimya cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait elde edilen bulgular (Tablo-7)' de gösterilmektedir.

Tablo 7: Architect c 8000 Biyokimya cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait elde edilen bulgular

Architect c8000 Biyokimya Cihazı					
	Sabah 1	Sabah 2	Akşam 1	Akşam 2	Normal Düzey Tüm Gruplar
Ortalama (IU/L)	12.3	12.3	12.2	12.3	12.3
Standart Sapma	1.08	1.26	1.20	1.26	1.18
Standart Hata	0.24	0.28	0.27	0.28	0.13
% CV	8.7	10.2	9.8	10.2	9.6

Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için normal düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı (Şekil-18)' de gösterilmektedir.



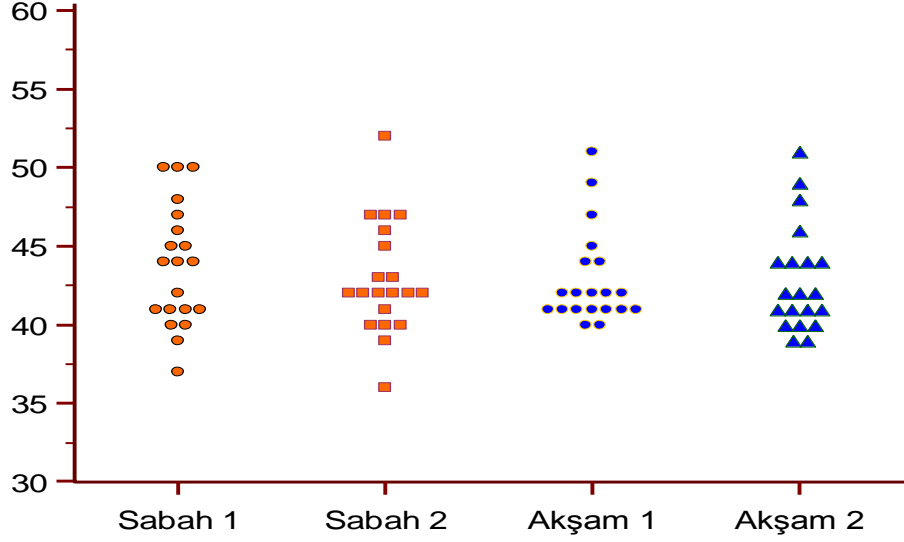
Şekil 18: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı

Architect c 8000 Biyokimya cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait elde edilen bulgular (Tablo-8)' de gösterilmektedir.

Tablo 8: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait değerler

Architect c 8000 Biyokimya Cihazı					
	Sabah 1	Sabah 2	Akşam 1	Akşam 2	Patolojik Düzey Tüm Gruplar
Ortalama (IU/L)	43.7	42.9	42.8	42.9	43.1
Standart Sapma	3.86	3.58	3.01	3.37	3.42
Standart Hata	0.86	0.80	0.67	0.75	0.38
% CV	8.8	8.3	7.0	7.8	7.9

Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için patolojik düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı (Şekil-19)' da gösterilmektedir.



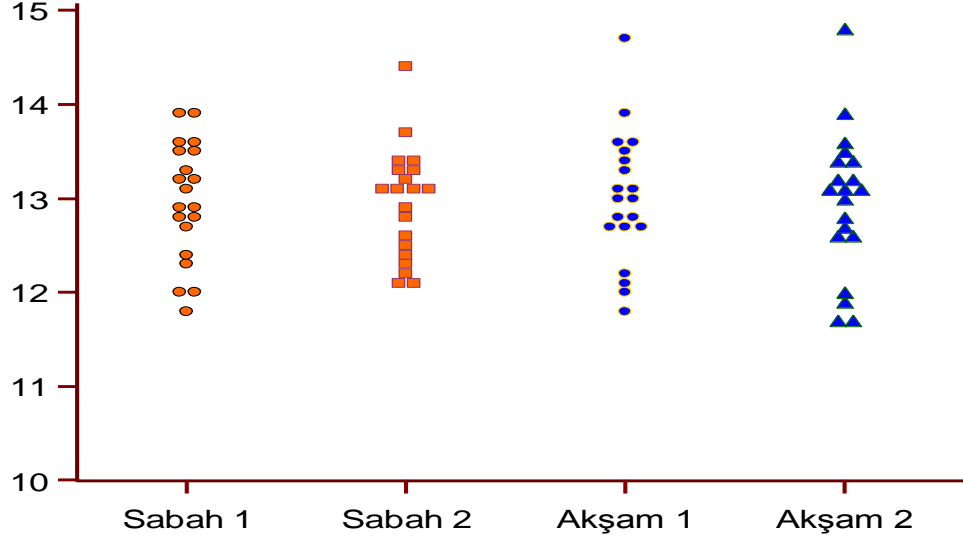
Şekil 19: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı

Architect i 1000 SR Hormon cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait elde edilen bulgular (Tablo-9)' da gösterilmektedir.

Tablo 9: Architect i 1000 SR Hormon cihazında deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait elde edilen bulgular

Architect i 1000 SR Hormon Cihazı					
	Sabah 1	Sabah 2	Akşam 1	Akşam 2	Normal Düzey Tüm Gruplar
Ortalama (ng/ml)	1.10	1.11	1.14	1.13	1.12
Standart Sapma	0.08	0.05	0.06	0.08	0.07
Standart Hata	0.01	0.01	0.01	0.01	0.008
% CV	7.4	5.2	5.9	7.7	6.7

Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, patolojik düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı (Şekil-21)' de gösterilmektedir.



Şekil 21: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için, normal düzeye ait değerlerin noktasal dağılımı

Her iki cihazda yapılan, deney-içi ve deneyler-arası yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucu, normal düzey ve patolojik düzeyler için elde edilen ortalama ve standart sapmalara göre, gün-içi analitik varyasyon (CVw-day) ile günler-arası analitik varyasyonlar (CVb-day) elde edildi. Elde edilen gün-içi ve günler-arası analitik varyasyonlardan, normal ve patolojik düzeyler için total analitik varyasyon (CVan-total) hesaplandı (Tablo-11).

Tablo 11: Architect c 8000 cihazı ve Architect i 1000 SR cihazı için hesaplanan (CV_{w-day}), (CV_{b-day}) ve ($CV_{an-total}$) değerleri

	Architect c 8000 Biyokimya Cihazı <i>(CK-MB Aktivite Ölçümü)</i>		Architect i 1000 SR Hormon Cihazı <i>(CK-MB Kütle Ölçümü)</i>	
	Normal Düzey	Patolojik Düzey	Normal Düzey	Patolojik Düzey
Gün-içi Analitik Varyasyon <i>(CV_{w-day})</i>	7.5	5.1	4.4	2.4
Günler-arası Analitik Varyasyon <i>(CV_{b-day})</i>	9.6	7.9	6.7	5.0
Total Analitik Hata <i>($CV_{an-total}$)</i>	12.1	9.4	8.0	5.5

4.2. Geri Kazanım (Recovery) Çalışmasına Ait Bulgular

Laboratuvarlarda kullanılan yöntemlerin analitik açıdan doğruluğunu etkileyen hatalar, sistematik hatalardır. Sistematik hata; analit konsantrasyonundan bağımlı olup olmamasına göre ikiye ayrılır. Analit konsantrasyonundan bağımsız olan hata *sabit hatadır*. Analit konsantrasyonuna bağımlı olan sistematik hata ise *oransal hatadır*. Geri kazanım çalışması oransal sistematik hatanın saptanmasında yararlıdır. Her iki cihazda, oransal açıdan analitik doğruluğun değerlendirilmesi için, geri kazanım (recovery) çalışması yapıldı.

Geri kazanım bir analitik yöntemin konsantrasyonu/içeriği bilinen örneklerle bilinen miktarlarda eklenen analiti doğru olarak ölçme kapasitesidir. Geri kazanım ölçümleri bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgiyi sağlar (75). Her iki

cihaz için, serum CK-MB düzeyi normal ve patolojik olan serum havuzları, kalibratör eklenmeden önce ve kalibratör eklendikten sonra rastgele hatayı önlemek amaçlı 4' er kez çalışılarak ortalamaları alındı. Elde edilen ortalamalar, kalibratör eklenmeden önceki ölçülen değerin ortalamasından çıkarılarak, geri kazanım miktarı % değişim (% Bias) olarak bulundu. CK-MB için izin verilen % bias; insanlardaki biyolojik değişkenliğe göre düzenlenmiş ve Westgard' ın sitesinde güncellenmiş son hali mevcut olan (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>), biyolojik varyasyonlar üzerinden hesaplanan % Bias' a göre, CK-MB aktivite ve kütle ölçümü için değerlendirildi.

Eklenen Miktar: Eklenenin Konsantrasyonu * Eklenen Hacmi / Total Hacim

Geri Kazanım Konsantrasyonu: Ölçülen Konsantrasyon-Bazal Konsantrasyon

% R: Geri Kazanım/ Eklenen * 100

% BIAS: 100-%R

Architect c 8000 Biyokimya cihazı için örneklerin hazırlanması:

1. *Tüp:* 1.0 ml normal (14.86 IU/L) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml distile su
2. *Tüp:* 1.0 ml normal (14.86 IU/L) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml değeri 145 IU/L olan Architect CK-MB Kalibratörü
3. *Tüp:* 1.0 ml yüksek (110.15 IU/L) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml distile su
4. *Tüp:* 1.0 ml yüksek (110.15 IU/L) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml değeri 145 IU/L olan Architect CK-MB Kalibratörü

EKLENEN MİKTAR: $145 * 0.1 / 1.1 = 13.18$ IU/L

Architect c 8000 Biyokimya cihazı için normal ve patolojik serum düzeylerinde yapılan geri kazanım çalışmasına ait bulgular aşağıda gösterilmektedir (Tablo-12).

Tablo 12: Architect c 8000 Biyokimya cihazı için normal ve patolojik serum düzeylerinde yapılan geri kazanım çalışması

Architect c 8000 Biyokimya Cihazı				
	Ölçülen Konsantrasyon (IU/L)	Eklenen Konsantrasyon (IU/L)	Geri Elde Edilen Konsantrasyon (IU/L)	Geri Kazanım (%)
1.Tüp (Normal Düzey)	11.5	-	-	-
2.Tüp (Normal Düzey)	23.7	13.1	12.2	92.9
3.Tüp (Patolojik Düzey)	100.7	-	-	-
4.Tüp (Patolojik Düzey)	113	13.1	12.2	92.9

Architect c 8000 Biyokimya cihazında normal düzey için; %R (%Geri kazanım) %92.9 ve %Bias ise $100 - \%R = 100 - 92.9 = \%7.1$ bulundu. Aynı şekilde patolojik düzey için; % R (% Geri kazanım) % 92.9 ve %Bias ise $100 - \%R = 100 - 92.9 = \%7.1$ bulundu. Architect c 8000 Biyokimya cihazı için ortalama % Geri kazanım %92.9 olarak hesaplandı.

Architect i 1000 SR Hormon cihazı için örneklerin hazırlanması:

1. Tüp: 1.0 ml normal (0.81 ng/ml) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml distile su
2. Tüp: 1.0 ml normal (0.81 ng/ml) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml değeri 60.0 ng/ml olan Architect Stat CK-MB Kalibratörü
3. Tüp: 1.0 ml yüksek (67.79 ng/ml) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml distile su
4. Tüp: 1.0 ml yüksek (67.79 ng/ml) konsantrasyonlu serum + 0.1 ml değeri 60.0 ng/ml olan Architect Stat CK-MB Kalibratörü

EKLENEN MİKTAR: $60 * 0.1 / 1.1 = 5.45$ ng/ml

Architect i 1000 SR Hormon cihazı için normal ve patolojik serum düzeylerinde yapılan geri kazanım çalışmasına ait bulgular aşağıda gösterilmektedir (Tablo-13).

Tablo 13: Architect i 1000 SR Hormon cihazı için normal ve patolojik serum düzeylerinde yapılan geri kazanım çalışması

Architect i 1000 SR Hormon Cihazı				
	Ölçülen Konsantrasyon (ng/ml)	Eklenen Konsantrasyon (ng/ml)	Geri Elde Edilen Konsantrasyon (ng/ml)	Geri Kazanım (%)
1.Tüp (Normal Düzey)	0.72	-	-	-
2.Tüp (Normal Düzey)	5.67	5.45	4.95	90.8
3.Tüp (Patolojik Düzey)	57.42	-	-	-
4.Tüp (Patolojik Düzey)	62.55	5.45	5.13	94.1

Architect i 1000 SR Hormon cihazında normal düzey için; %R (%Geri kazanım) %90.8 ve %Bias ise $100 - \%R = 100 - 90.8 = \%9.2$ bulundu. Aynı şekilde patolojik düzey için; % R (% Geri kazanım) % 94.1 ve %Bias ise $100 - \%R = 100 - 94.1 = \%5.9$ bulundu. Architect i 1000 SR Hormon cihazı için ortalama % Geri kazanım %92.5 olarak hesaplandı.

4.3. İnterferans Çalışmasına Ait Bulgular

İnterferans; analit konsantrasyonundan bağımsız olarak, sistematik sabit hata oluşumuna neden olur. İnterferans çalışmasında, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları hazırlandı ve hemolizat eklenerek seri dilüsyonla farklı hemoglobinin (Hb) konsantrasyonlarında örnekler elde edildi. Hemoliz düzeyi en yüksek olan örneklerdeki Hb konsantrasyonu Abbott Cell Dyn - 3700 SL hemogram cihazı ile

ölçüldü. Seri dilüsyonlar ile elde edilen serum örneklerindeki CK-MB konsantrasyonları her iki cihazda da ölçülerek, % Bias miktarları belirlendi.

Normal ve patolojik havuzlara eklenecek hemolizatin konsantrasyonu 21 g/dL olarak ölçüldü. Hazırlanan hemolizattan, Serum Havuzu A' ya 0.6 ml hemolizat eklendi. Hemoglobinin konsantrasyonu 2.1 g/dL olan Serum Havuzu A' nın yanına 10 adet boş deney tüpü dizilerek numaralandı. Serum Havuzu A (1. tüp)' den itibaren, 10. tüpe kadar, Hb konsantrasyonları ½ oranında azalan örnekler elde edildi. Son tüpe sadece Serum Havuzu B'den 3 mL eklendi. 11 tüp, hemoglobinin konsantrasyonları en yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde numaralandı. 1.tüpten itibaren Hb konsantrasyonları sırası ile 2.13, 1.12, 0.610, 0.305, 0.153, 0.076, 0.038, 0.019, 0.010, 0.005, 0 g/dL olarak hesaplandı. Patolojik serum havuzuna aynı işlemler uygulanarak yine 11 adet örnek hazırlandı. Patolojik düzeyde Hb konsantrasyonları sırası ile 1.tüpten itibaren 2.01, 1.00, 0.503, 0.251, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007, 0.003, 0 g/dL olarak hesaplandı. Hemolizat eklendiğinde CK-MB konsantrasyonlarında saptanan farkların yüzdesi veya bias, $[(C_1-C_0)/C_0]*100$ formülü kullanılarak hesaplandı. C_0 , hemolizat içermeyen örneklerdeki analit konsantrasyonunu; C_1 ise tüm hemoliz düzeylerindeki analit konsantrasyonunu göstermektedir.

Normal ve patolojik serum havuzlarına hemolizat eklenerek, seri dilüsyonlar ile elde edilen tüplerdeki CK-MB konsantrasyonları, her iki cihazda da rastgele hatayı önlemek açısından 2' şer kez çalışıldı ve ortalamaları alındı. Normal CK-MB düzeyinde, her iki cihaz için ölçülen Hemoglobin, CK-MB Aktive ve CK-MB Kütle değerleri ortalamaları (Tablo-14)' te gösterilmektedir. Ayrıca her iki cihazda, normal düzey için hesaplanan % Bias değerleri tabloda yer almaktadır.

Tablo 14: Normal düzey serum havuzunda Hb, CK-MB Aktivite, CK-MB Kütle ve % Bias değerleri

Tüp No	Hesaplanan Hemoglobin Değerleri (mg/dl)	CK-MB Aktivite Ölçüm Değerleri Ortalamaları (IU/L)	CK-MB Aktivite % Bias	CK-MB Kütle Ölçüm Değerleri Ortalamaları (ng/ml)	CK-MB Kütle % Bias
1*	-	14.0	0.0	0.85	0.0
2	5	14.0	0.0	0.80	-5.8
3	10	14.5	3.5	0.80	-5.8
4	19	17.5	25	0.85	0.0
5	38	20.5	46	0.80	-5.8
6	77	28.0	100	0.85	0.0
7	153	43.0	207	0.80	-5.8
8	305	76.0	442	0.80	-5.8
9	610	147.0	950	0.80	-5.8
10	1120	299.0	2042	0.80	-5.8
11**	2130	Ölçülemedi	-	0.80	-5.8

* Serum havuzu B

** Serum havuzu A

Koyu renkli veriler; CK-MB Aktivite için izin verilen %Bias (%7,8) değerini aşan değerlerdir.

Patolojik CK-MB düzeyinde, her iki cihaz için ölçülen Hemoglobin, CK-MB Aktive ve CK-MB Kütle değerleri (Tablo-15)' te gösterilmektedir. Ayrıca her iki cihazda, patolojik düzey için hesaplanan % Bias değerleri tabloda yer almaktadır.

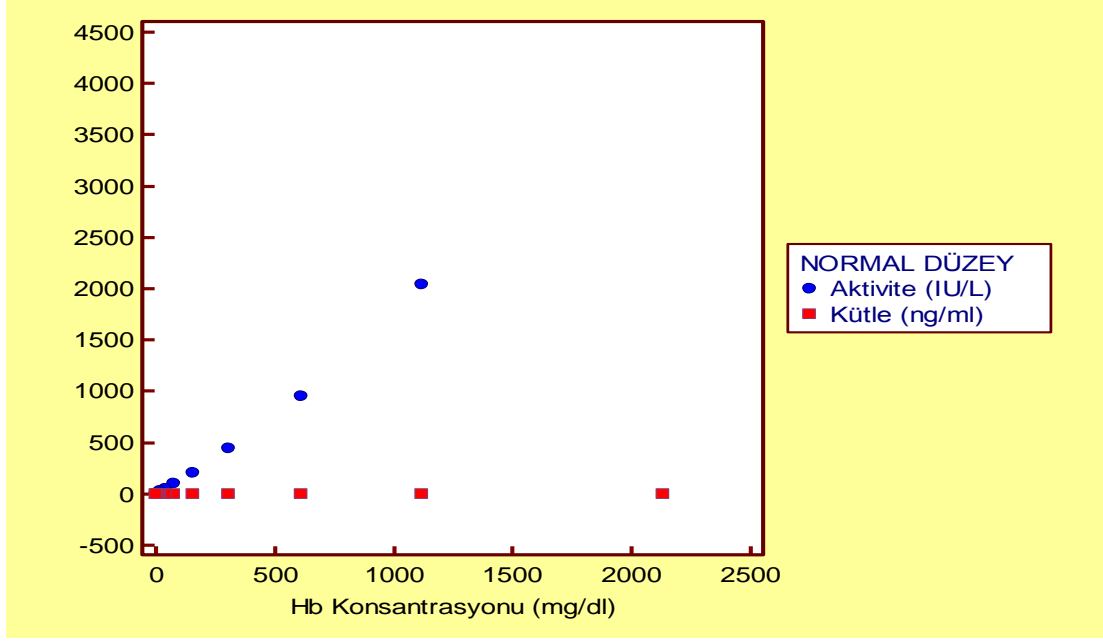
Tablo 15: Patolojik düzey serum havuzunda Hb, CK-MB Aktivite, CK-MB Kütle ve % Bias değerleri

Tüp No	Hesaplanan Hemoglobin Değerleri (mg/dl)	CK-MB Aktivite Ölçüm Değerleri Ortalamaları (IU/L)	CK-MB Aktivite % Bias	CK-MB Kütle Ölçüm Değerleri Ortalamaları (ng/ml)	CK-MB Kütle % Bias
1*	-	99.5	0	61.85	0.0
2	4	100.5	0.5	61.80	-4.4
3	8	101	1	62.95	-0.9
4	16	103	3	64.90	-2.2
5	32	105.5	5.5	64.55	-0.9
6	63	113	13	65.50	-0.3
7	126	129.5	29.5	65.05	-1.7
8	252	164.5	65	64.25	-1.2
9	504	229.5	130	65.10	-4.2
10	1000	379.5	280	62.80	-5.9
11**	2015	Ölçülemedi	-	65.70	-5.9

* Serum havuzu B ** Serum havuzu A

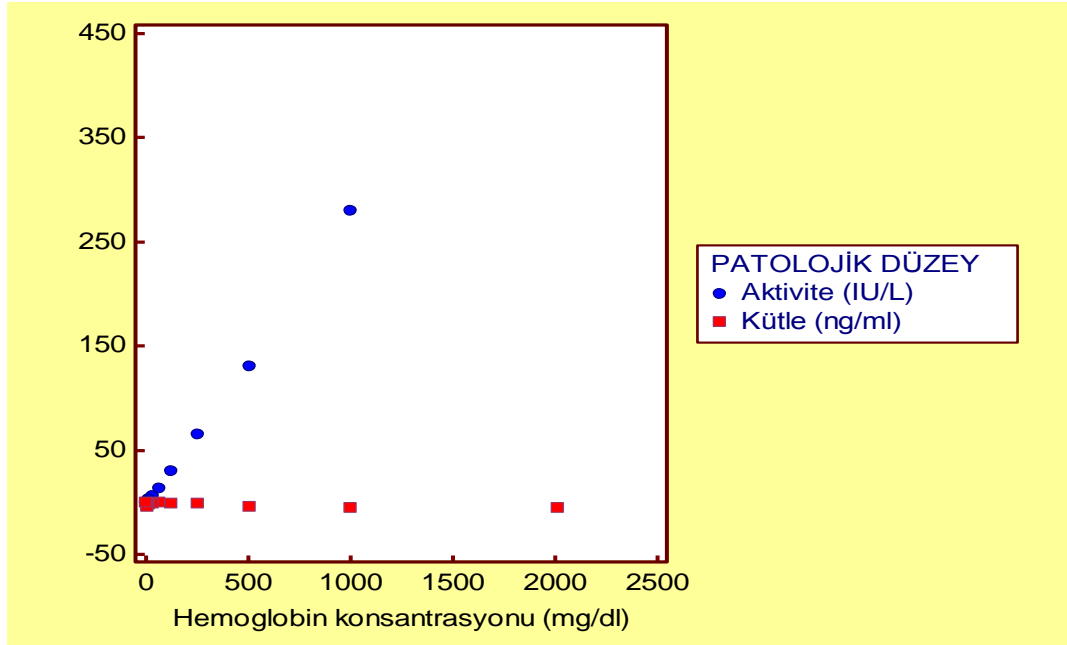
Koyu renkli veriler; CK-MB Aktivite için izin verilen %Bias (%7,8) değerini aşan değerlerdir.

Her iki cihaz için, normal düzey serum havuzundan hazırlanan hemolizat örneklerinde, artan Hb konsantrasyonuna bağlı görülen % Bias, (şekil-22)' de gösterilmektedir.



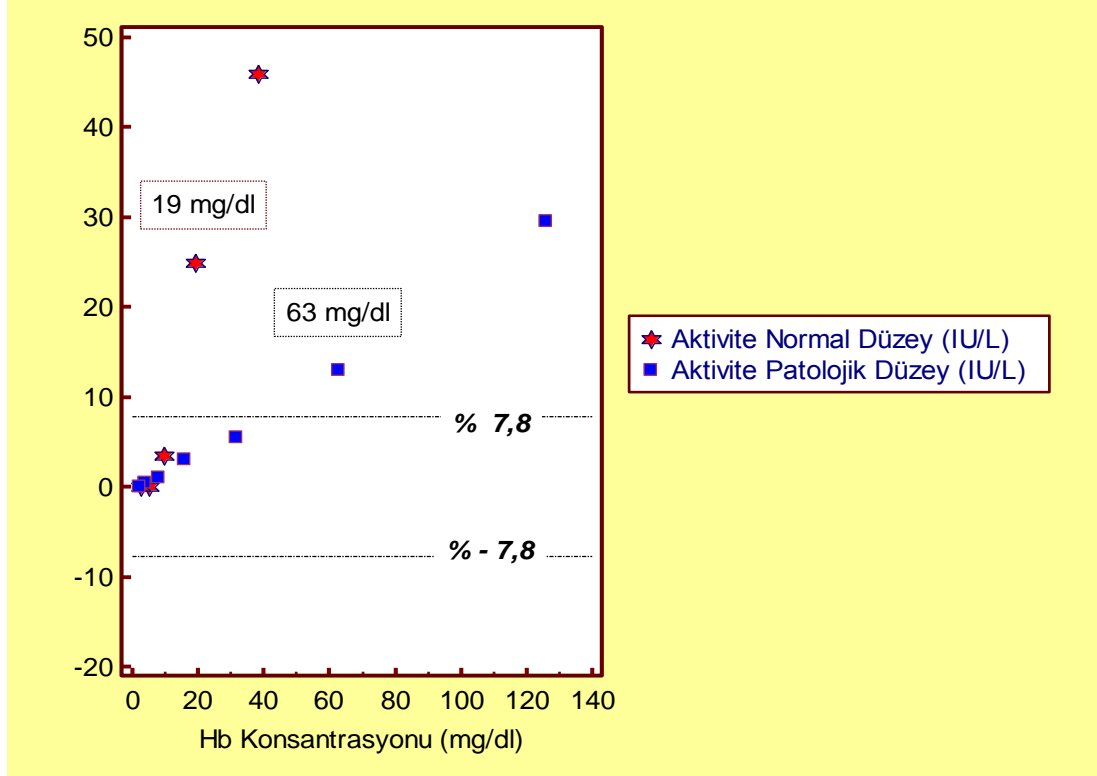
Şekil 22: Normal düzey için, artan Hb konsantrasyonuna bağlı olarak, aktivite ve kütle ölçümlerinde görülen % Bias

Her iki cihaz için, patolojik düzey serum havuzundan hazırlanan hemolizat örneklerinde, artan Hb konsantrasyonuna bağlı görülen % Bias, (şekil-23)' te gösterilmektedir.



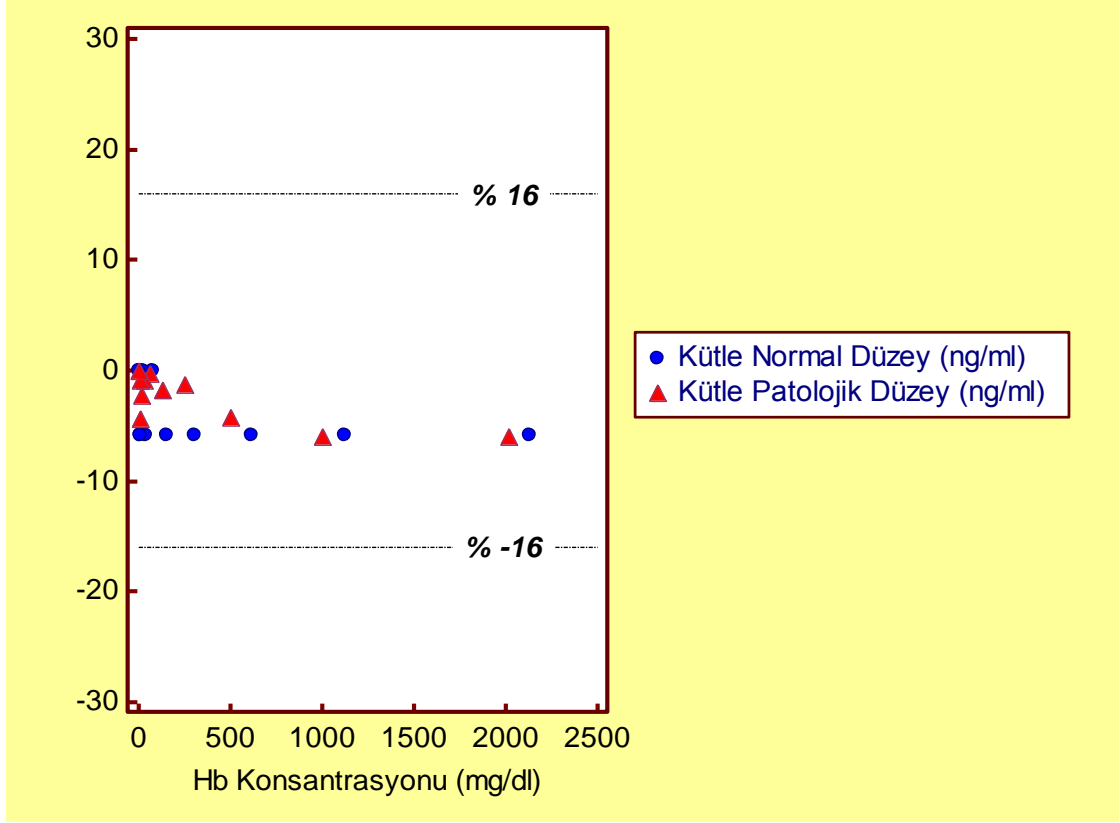
Şekil 23: Patolojik düzey için, artan Hb konsantrasyonuna bağlı olarak, aktivite ve kütle ölçümlerinde görülen % Bias

Architect c 8000 Biyokimya cihazında, normal ve patolojik serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, CK-MB aktivite ölçümünden elde edilen % Bias değerlerinin, izin verilen % Bias' a (%7.8) göre karşılaştırılması (şekil-24)' te gösterilmektedir.



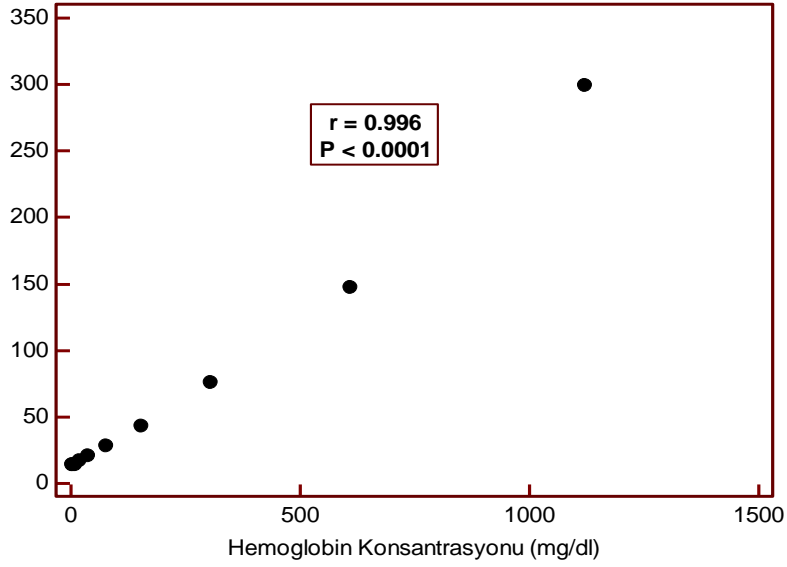
Şekil 24: CK-MB aktivite ölçümünden elde edilen % Bias değerlerinin, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları için, izin verilen % Bias' a göre karşılaştırılması

Architect i 1000 SR Hormon cihazında, normal ve patolojik serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, CK-MB Kütle ölçümünden elde edilen % Bias değerlerinin, izin verilen % Bias' a (%16) göre karşılaştırılması (şekil-25)' te gösterilmektedir.



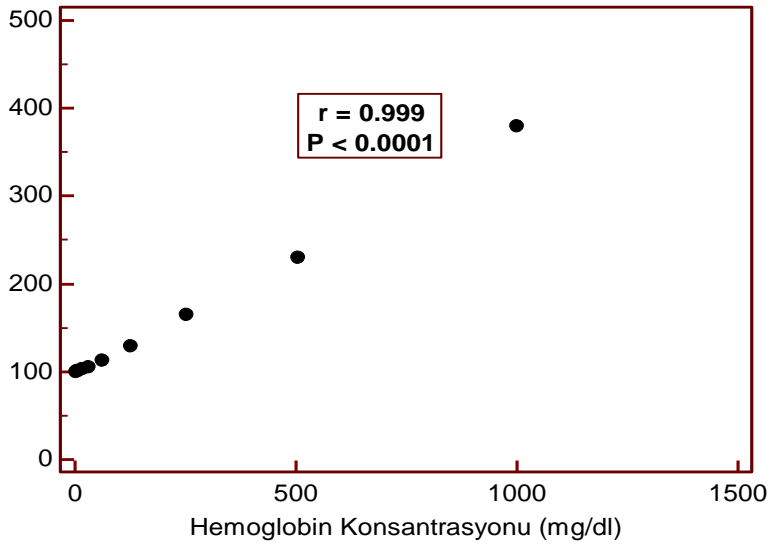
Şekil 25: CK-MB kütle ölçümünden elde edilen % Bias değerlerinin, normal düzey ve patolojik düzey serum havuzları için, izin verilen % Bias' a göre karşılaştırılması

Artan Hb konsantrasyonlarında ölçülen CK-MB değerleri ile hemolizin interferans etkisini değerlendirmek için her iki cihazda, normal ve patolojik serum havuzlarından hazırlanan örneklerde korelasyon analizi yapıldı. CK-MB Aktivite ölçümü yapan Architect c 8000 Biyokimya cihazında; normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçülen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısı ($r=0.996$) ve anlamlılık düzeyi ($p<0.0001$) olarak bulundu (şekil-26).



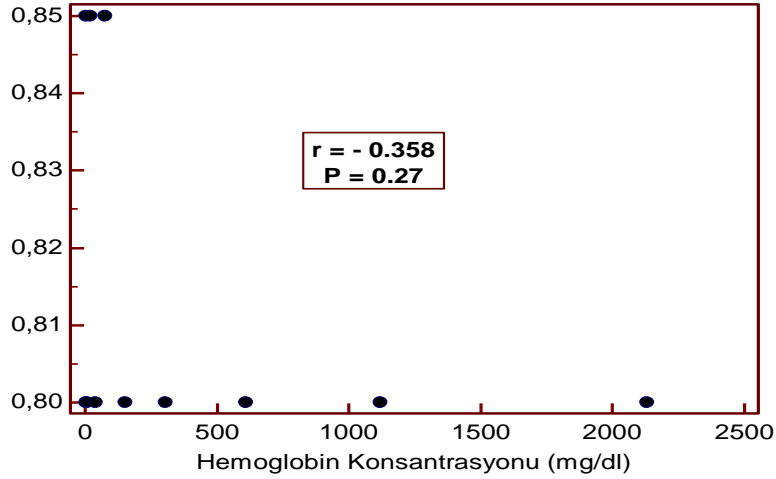
Şekil 26: CK-MB aktivite ölçümünde, normal düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki

Architect c 8000 Biyokimya cihazında; patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçülen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısı ($r=0.999$) ve anlamlılık düzeyi ($p<0.0001$) olarak bulundu (şekil-27).



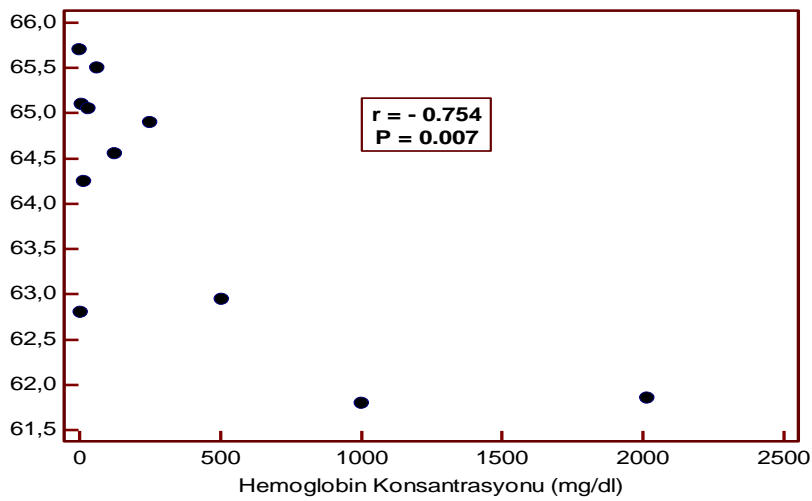
Şekil 27: CK-MB aktivite ölçümünde, patolojik düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki

CK-MB Kütle ölçümü yapan Architect i 1000 SR Hormon cihazında; normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçülen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısı ($r=-0.358$) ve anlamlılık düzeyi ($p=0.27$) olarak bulundu (şekil-28).



Şekil 28: CK-MB kütle ölçümünde, normal düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki

Architect i 1000 SR Hormon cihazında; patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçülen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısı ($r=-0.754$) ve anlamlılık düzeyi ($p=0.007$) olarak bulundu (şekil-29).

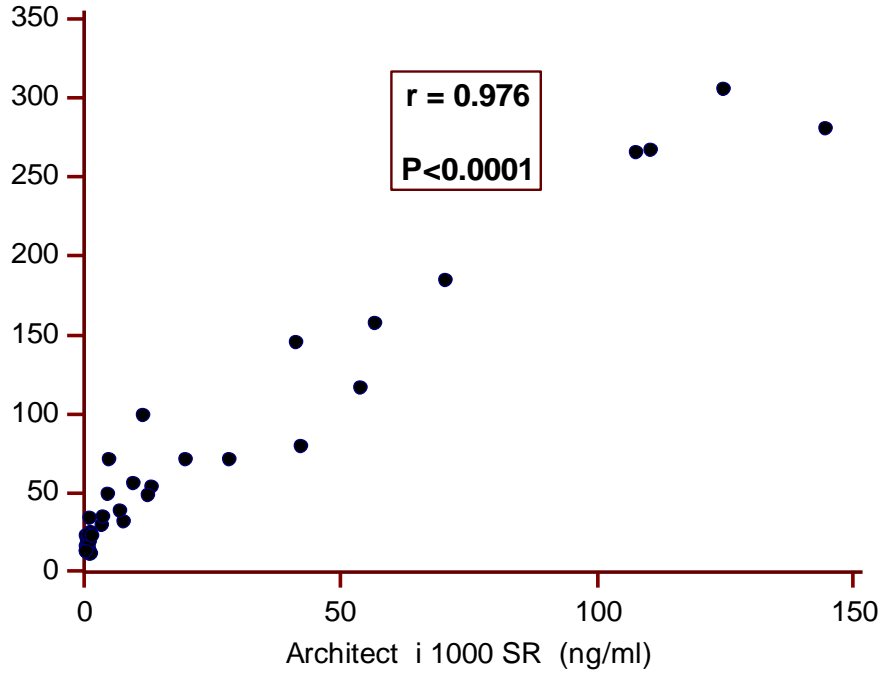


Şekil 29: CK-MB kütle ölçümünde, patolojik düzey için CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonu arasındaki ilişki

4.4. Yöntem Karşılaştırma Çalışmasına Ait Bulgular

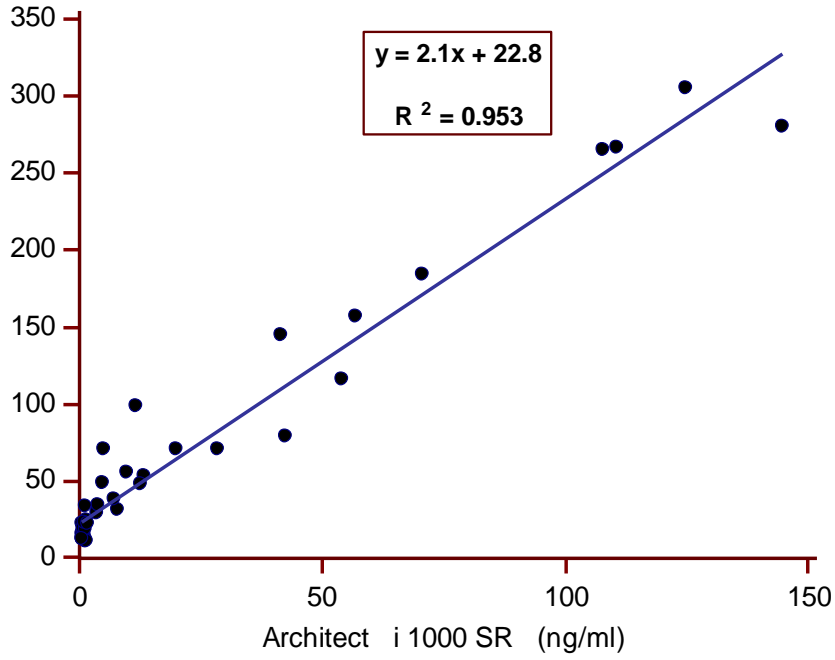
Architect c 8000 Biyokimya cihazında kullanılan CK-MB aktivite ölçüm yöntemi ile Architect i 1000 SR Hormon cihazında kullanılan CK-MB kütle ölçüm yönteminin karşılaştırılması için 40 kişiye ait serum örnekleri, günde 6-7 örnek çalışılarak, 7 günde tamamlandı. Her örnek, iki cihazda da 2' şer kez çalışılarak rastgele hata önlenmeye çalışıldı.

Elde edilen değerlerin, cihazlar arasındaki ilişkisini değerlendirmek amaçlı korelasyon analizi yapıldı (şekil-30). Korelasyon katsayısı ($r=0.976$) ve anlamlılık düzeyi ($p<0.0001$) olarak bulundu.



Şekil 30: CK-MB kütle ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite ölçüm yönteminin korelasyon analizi

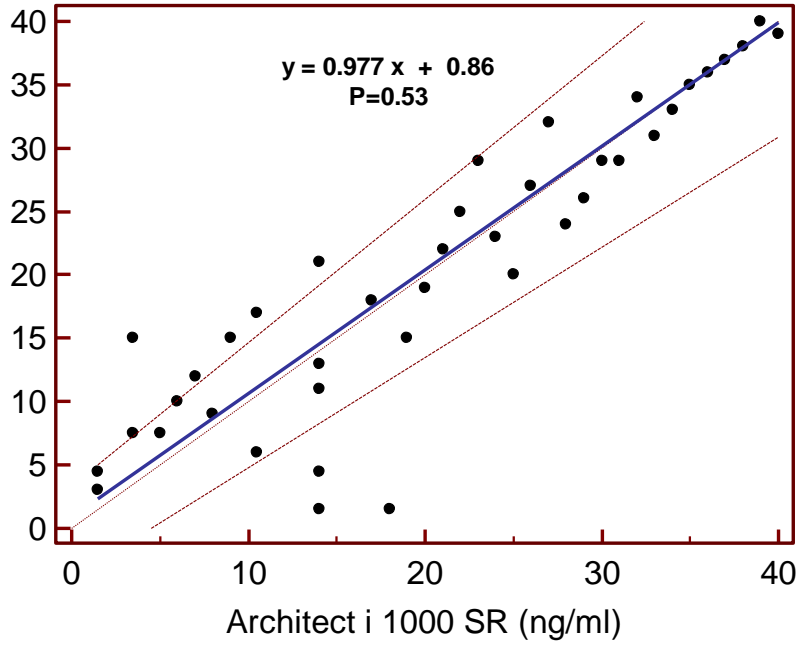
Referans yöntem olan CK-MB kütle ölçüm yöntemine ait veriler ile CK-MB aktivite ölçüm yöntemine ait verileri değerlendirmek amaçlı lineer regresyon analizi yapıldı (Şekil-31).



Şekil 31: CK-MB kütle ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite ölçüm yönteminin lineer regresyon analizi

Lineer regresyon analizine göre elde edilen denklem; $y = 2.1x + 22.8$ olarak bulundu. Regresyon denklemine ait belirtme katsayısı ise $R^2 = 0.953$ olarak tespit edildi.

CK-MB kütle (*ng/ml*) ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite (*IU/L*) ölçüm yöntemlerine ait birimler farklı olduğu için yöntemler arasındaki uyum, lineer regresyon denklemine göre değerlendirilemedi. Her iki cihazdaki ölçüm sonuçlarına göre elde edilen değerler, Passing-Bablok (P-B) regresyon analizi uygulanarak değerlendirildi. Parametrik olmayan bu yöntem ile ilgili hesaplamalar, ölçüm değerlerinin sıra (rank) numaralarına bağlı olarak yapılır ve test metodu ile referans metot (X ve Y metotları) ile elde edilen verilerin bağımsız olduğu varsayılır (108). P-B regresyon analizi sonucu elde edilen denklem; $y = 0.977x + 0.86$ olarak tespit edildi. Regresyon denklemine ait; eğim (b; slope), % 95 güven aralığında (0.87 – 1.13) olarak ve kesişim (a; intercept) % 95 güven aralığında (-3.93 – 3.29) olarak tespit edildi. Regresyon doğrusuna ait doğrusallığın değerlendirilmesi amaçlı uygulanan CUSUM testinde, doğrusallıktan sapma değerlendirildi ($p=0.53$). P-B regresyon analizi (Şekil-32)' de görülmektedir.

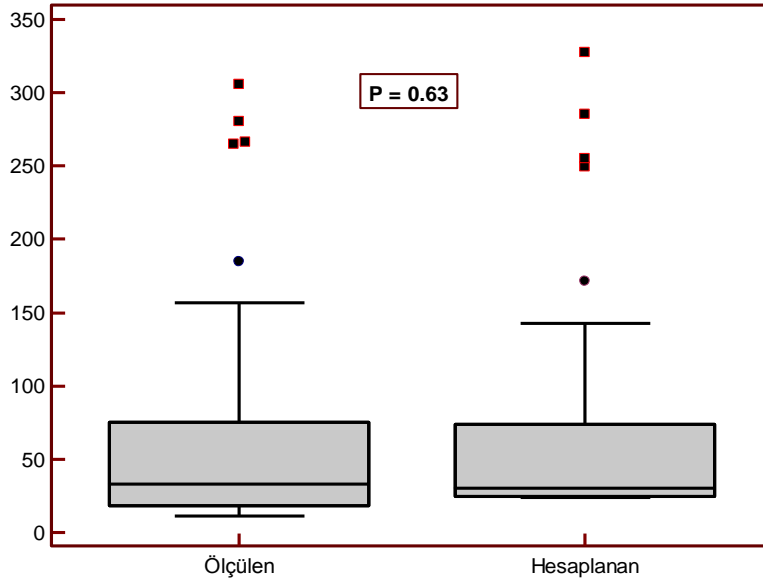


Şekil 32: CK-MB kütle ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite ölçüm yönteminin Passing-Bablok regresyon analizi

CK-MB kütle (*ng/ml*) ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite (*IU/L*) ölçüm yöntemlerine ait birimler farklı olduğu için verilerin standardize edilmesi amaçlı; lineer regresyon denkleminde ($y = 2.1x + 22.8$) faydalanarak, her bir x (referans yöntem; CK-MB kütle) değeri için olması gereken y' (test yöntemi; CK-MB aktivite) değeri hesaplandı.

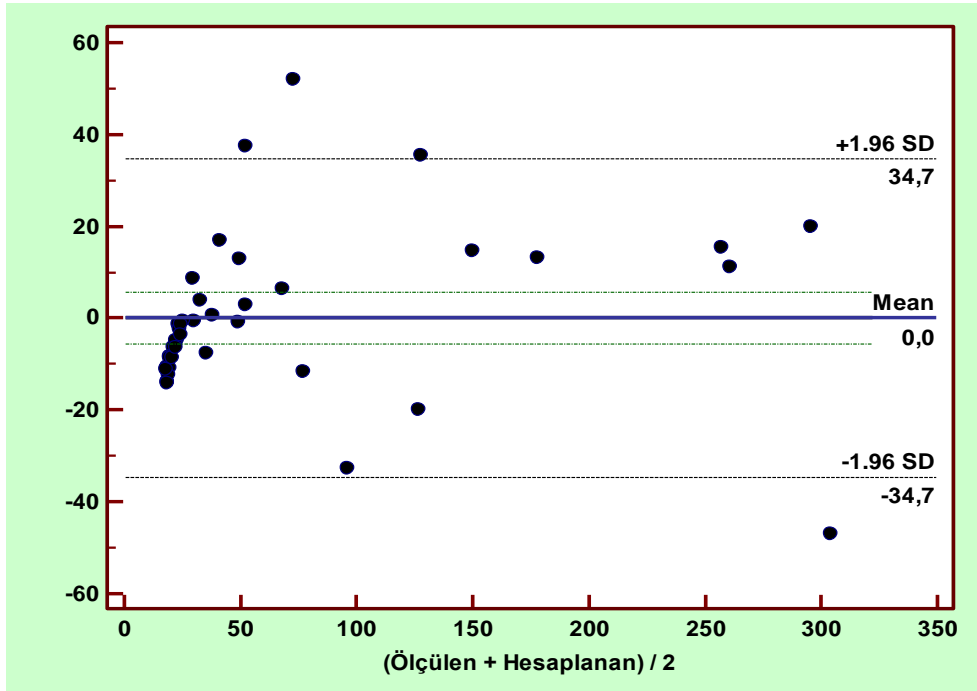
Hesaplama sonucu, elde edilen sonuçlar (y') ile CK-MB aktivite yöntemini kullanan Architect c 8000 biyokimya cihazının ölçtüğü gerçek değerler (y) arasındaki farklılık, varyasyonların farklılığı açısından F-testi uygulanarak değerlendirildi. F-testi sonucuna göre; varyansların oranı: 1.04 olarak bulundu ($p=0.88$).

Hesaplanan değerler ile ölçülen değerler; normal dağılıma uymadığı için grupların ortancaları, eşleştirilmiş t-testinin non-parametrik karşılığı olan Wilcoxon-rank-sign testi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılık ($p=0.63$) olarak bulundu. CK-MB aktivite yöntemiyle ölçülen değerler (y) ile lineer regresyon denkleminde hesaplanan (y') değerler (Şekil-33)' te gösterilmektedir.



Şekil 33: CK-MB aktivite yöntemiyle ölçülen değerler (y) ile lineer regresyon denkleminde hesaplanan (y') değerleri

Yöntemler arasındaki uyumun değerlendirilmesi için, Bland-Altman Grafiği kullanıldı. Bland-Altman Grafiğine göre; hesaplanan değerler ile ölçülen değerlere ait farkların ortalaması 0.008 (-5.65 ile 5.67 arasında) ve standart sapması 17.7 olarak bulundu (Şekil-34).



Şekil 34: Hesaplanan değerler ile ölçülen değerlere ait Bland-Altman Grafiği

4.5. ROC Analizine Ait Bulgular

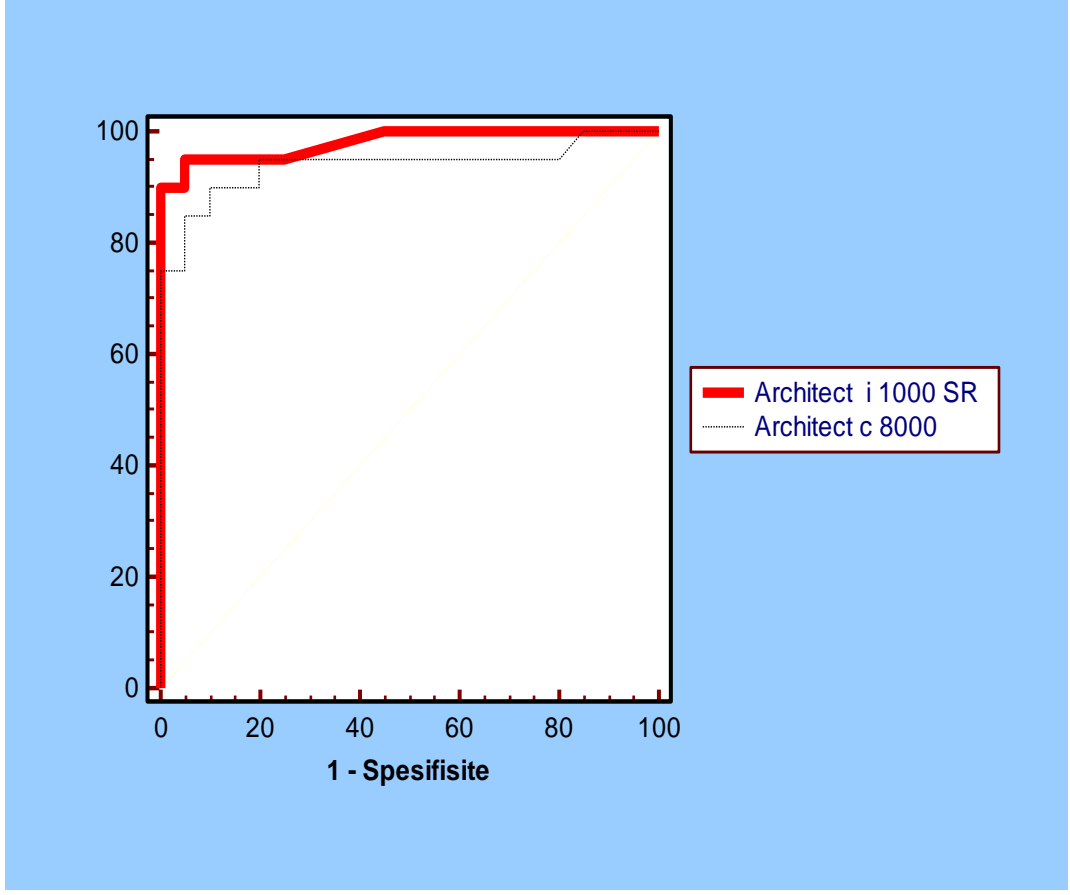
Göğüs ağrısı şikayeti ile hastanemiz acil servisine başvuran 40 hastanın, 20 tanesi klinik olarak AMI tanısı alan hastalara ait olarak belirlendi. Göğüs ağrısının başlangıcından yaklaşık 6 saat sonra hastaların kanları alındı, preanalitik prosedürler rutin olarak gerçekleştirildikten sonra her iki cihazda hasta örnekleri çalışıldı. Yöntemlerin tanısal açıdan değerlendirilmesi için, her iki cihazdan elde edilen ölçüm sonuçlarının duyarlılıkları (*sensitivite*) ve özgüllükleri (*spesifisite*) tespit edildi. Bu değerlerden faydalanılarak, her iki cihaza ait ROC eğrileri çizildi. Elde edilen ROC eğrileri sonucu, eğri altında kalan alanlar belirlendi.

Yapılan ROC analizi sonucu; Architect c 8000 Biyokimya cihazına ait Sensitivite değeri %90 ve spesifisite değeri %90 olarak bulundu. Eğri altında kalan alan (AUC) ise 0.939 olarak tespit edildi. Architect i 1000 SR Hormon cihazına ait Sensitivite değeri %95 ve spesifisite değeri %95 olarak bulundu. Eğri altında kalan alan (AUC) ise 0.980 olarak tespit edildi. Her iki cihaza ait elde edilen bulgular (Tablo-16)' da yer almaktadır.

Tablo 16: Her iki cihazdaki CK-MB ölçümlerine ait duyarlılık ve özgüllük değerleri

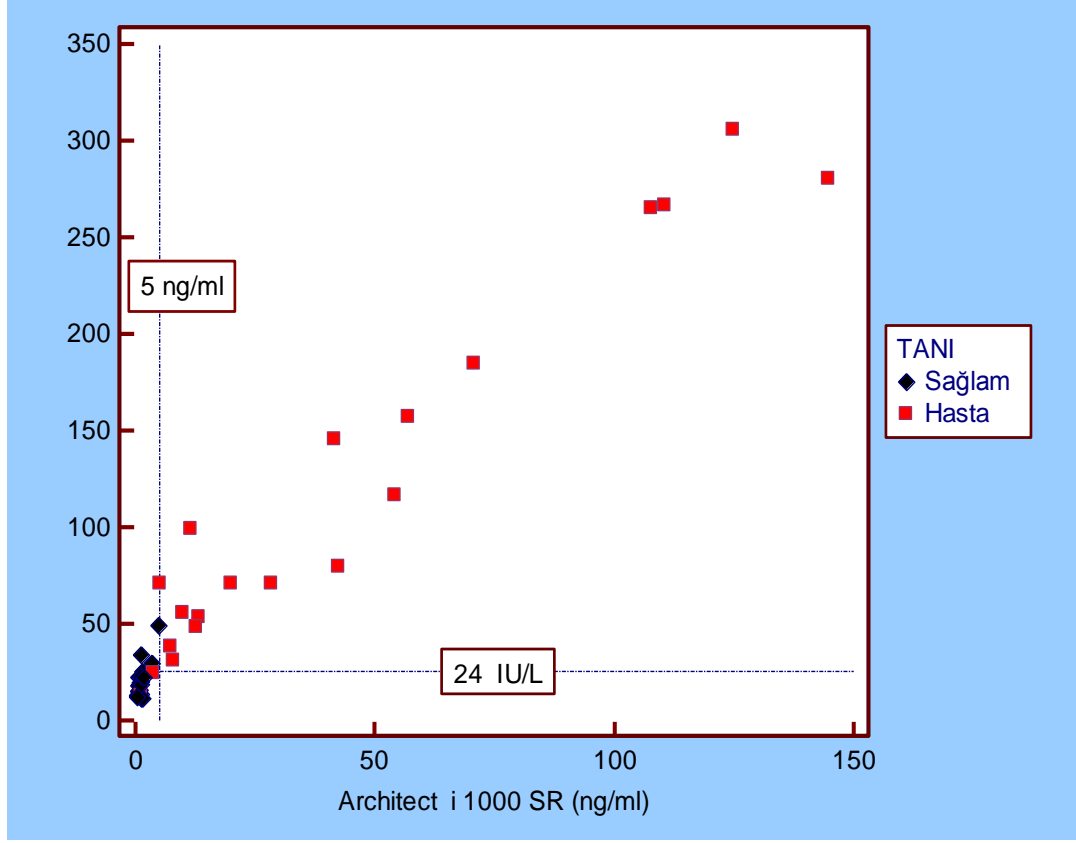
	Architect c 8000 Biyokimya Cihazı	Architect i 1000 SR Hormon Cihazı
Sensitivite (%)	90	95
Spesifisite (%)	90	95
Eğri altında kalan alan (Area Under Curve, AUC)	0.939	0.980

Her iki cihaza ait, eğri altında kalan alanların (AUC) karşılaştırılmasında, anlamlılık değeri ($p=0.118$) olarak bulundu (Şekil-35).



Şekil 35: Her iki cihaza ait ROC eğrilerinin karşılaştırılması

Architect c 8000 Biyokimya cihazında kullanılan; Architect CK-MB Liquid kitine ait prospektüste, CK-MB aktivite ölçümü için sınır değer 24 (IU/L) olduğu belirtilmiştir. Architect i 1000 SR Hormon cihazında kullanılan; Architect STAT CK-MB kitine ait prospektüste, CK-MB kütle ölçümü için sınır değeri 5 (ng/ml) olduğu belirtilmiştir. CK-MB aktivite ve CK-MB kütle ölçümünde belirtilen üst referans değerlere göre sağlam ve hasta kişilerin dağılımı (Şekil-36)' da gösterilmektedir.



Şekil 36: Hasta ve sağlam kişilerin, üst referans değerlerine göre dağılım grafiği

4.6. Plazma İle Serum Örneklerinin Karşılaştırılmasına Ait Bulgular

CK-MB ölçümü üzerine antikoagülanların etkisini incelemek için hastanemiz acil laboratuvarına kabul edilen 10 hastanın her birinden, jelli biyokimya tüplerine (J) ve lityum heparinli (Li.H) tüplere kan alındı. Aynı şekilde, AKS tanısı almamış ve klinik açıdan herhangi bir semptom ve şikayeti olmayan, kardiyak parametreleri normal düzeyde (CK-MB aktivite için < 20 U/L, CK-MB kütle için < 3.1 ng/mL, troponin için < 0.03 ng/mL) bulunan 10 kişinin her birinden, jelli biyokimya tüplerine (J) ve lityum heparinli (Li.H) tüplere kan alındı. Alınan numuneler hemen santrifüj edilerek -80 °C' de bekletildi. Muhafaza edilen plazma ve serum numuneleri oda sıcaklığında en 30 dakika bekletilmek koşuluyla çözdürüldükten sonra her iki cihazda da çalışıldı.

Architect c 8000 Biyokimya cihazı için, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB aktivite değerleri, Wilcoxon-rank-sign testi kullanılarak karşılaştırıldı ve istatistiksel

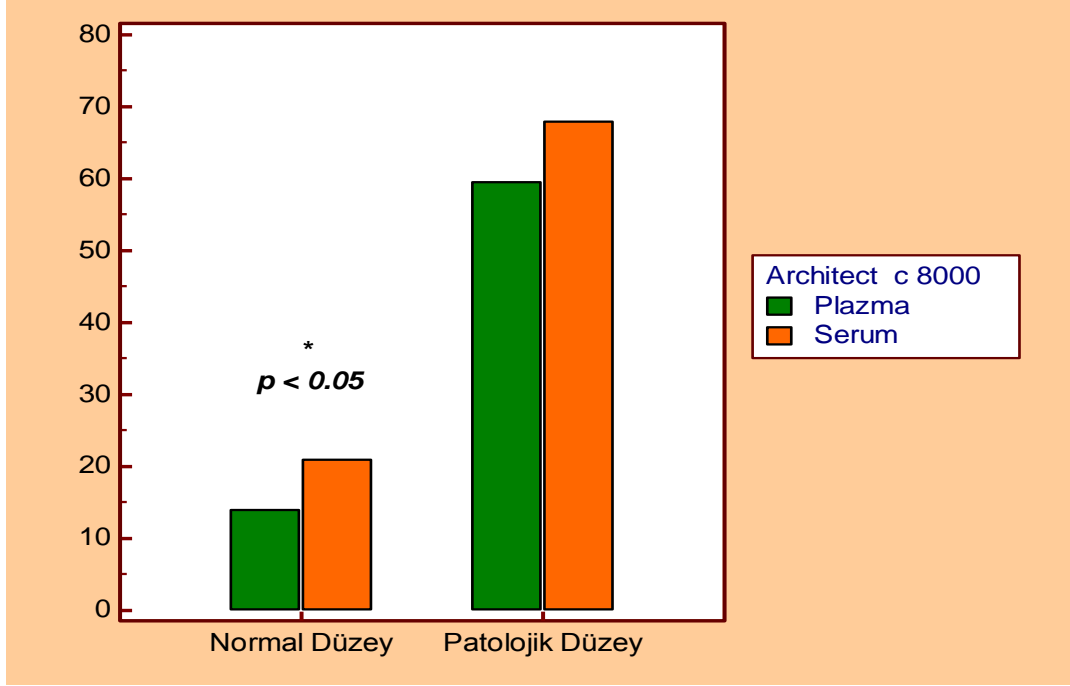
açından anlamlı farklılık, % 95 güven aralığında P-değeri ile ifade edildi. ($p<0.05$). Normal düzey için ortanca değerleri, plazma ve serum için sırasıyla 14 (IU/L) ve 21 (IU/L) olarak bulundu. Patolojik düzey için ortanca değerleri, plazma ve serum için sırasıyla 59.5 (IU/L) ve 68 (IU/L) olarak bulundu. Plazma ile serum değerleri için istatistiksel açıdan farklılık; normal düzeyde ($p=0.0039$) ve patolojik düzeyde ise ($p=0.0977$) olarak bulundu (Tablo-17).

Tablo 17: Architect c 8000 Biyokimya cihazında, plazma ile serum örneklerinin karşılaştırılması

Architect c 8000 Biyokimya Cihazı				
	Normal Düzey (IU/L)		Patolojik Düzey (IU/L)	
	Plazma	Serum	Plazma	Serum
Numune Sayısı (n)	10	10	10	10
Medyan (Ortanca)	14.0	21.0	59.5	68
Minimum Değer	7.0	12.0	22.0	28.0
Maksimum Değer	20.0	32.0	329.0	380.0
P Değeri	$P = 0.0039^*$		$P = 0.0977$	

* $p<0.05$ düzeyinde anlamlı farklılık

Architect c 8000 cihazında, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB aktivite değerleri arasındaki anlamlı farklılık $p<0.05$ düzeyinde gösterilmektedir (Şekil-37).



Şekil 37: Architect c 8000 biyokimya cihazında, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB aktivite ölçüm değerleri

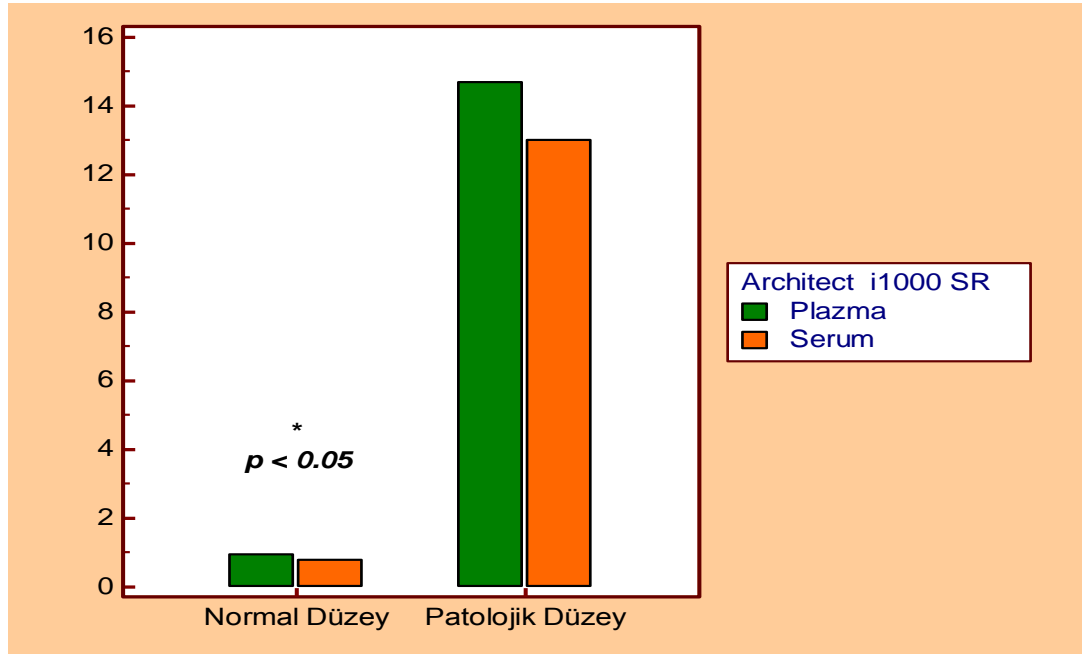
Architect i 1000 SR Hormon cihazı için, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB kütle değerleri, Wilcoxon-rank-sign testi kullanılarak karşılaştırıldı ve istatistiksel açıdan anlamlı farklılık, %95 güven aralığında P-değeri ile ifade edildi ($p < 0.05$). Normal düzey için ortanca değerleri, plazma ve serum için sırasıyla 0.95 (ng/ml) ve 0.80 (ng/ml) olarak bulundu. Patolojik düzey için ortanca değerleri, plazma ve serum için sırasıyla 14.7 (ng/ml) ve 13.0 (ng/ml) olarak bulundu. Plazma ile serum değerleri için istatistiksel açıdan farklılık; normal düzeyde ($p = 0.0078$) ve patolojik düzeyde ise ($p = 0.2324$) olarak bulundu (Tablo-18).

Tablo 18: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, plazma ile serum örneklerinin karşılaştırılması

Architect i 1000 SR Hormon Cihazı				
	Normal Düzey (ng/ml)		Patolojik Düzey (ng/ml)	
	Plazma	Serum	Plazma	Serum
Numune Sayısı (n)	10	10	10	10
Medyan (Ortanca)	0.95	0.80	14.7	13.0
Minimum Değer	0.6	0.6	2.9	2.6
Maksimum Değer	1.8	1.4	244.5	249.0
P Değeri	$P = 0.0078^*$		$P = 0.2324$	

* $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı farklılık

Architect i 1000 SR cihazında, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB kütle değerleri arasındaki anlamlı farklılık $p < 0.05$ düzeyinde gösterilmektedir (Şekil-38).



Şekil 38: Architect i 1000 SR Hormon cihazında, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB kütle ölçüm değerleri

Her iki cihazda ölçülen, plazma ve serum örneklerine (normal düzey ve patolojik düzey total olarak) ait ortalamaları, standart sapmaları, ortancaları, en düşük ve en yüksek değerleri hesaplandı. Plazma ile serum değerleri arasındaki anlamlı farklılık Wilcoxon-rank-sign testi kullanılarak karşılaştırıldı ve $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi (Tablo-19).

Tablo 19: Her iki cihazda ölçülen, plazma ve serum örneklerinin ortalama, standart sapma, ortanca, en düşük ve en yüksek değerleri

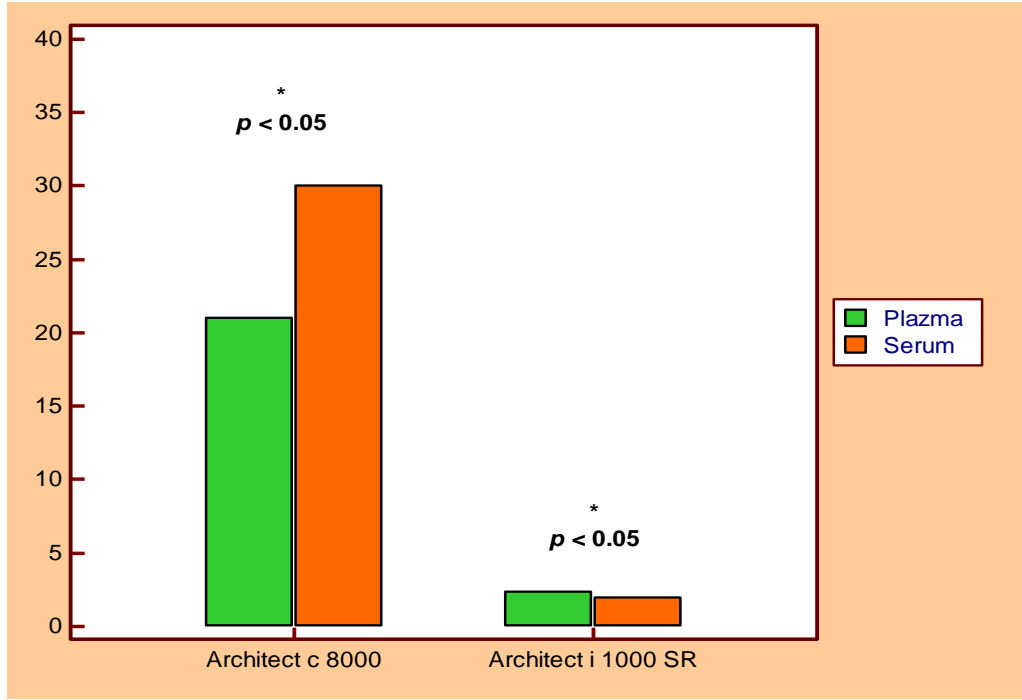
	Architect c 8000 (IU/L)		Architect i 1000 SR (ng/ml)	
	Plazma	Serum	Plazma	Serum
Numune Sayısı (n)	20	20	20	20
Mean (Ortalama)	59.0	68.0	27.9	27.2
Standart Sapma	84.3	92.0	61.4	61.2
Medyan (Ortanca)	21.0	30.0	2.3	2.0
Minimum Değer	7.0	12.0	0.6	0.6
Maksimum Değer	329.0	380.0	244.5	249.0
P Değeri	$P = 0.0006^*$		$P = 0.0385^*$	

* $p<0.05$ düzeyinde anlamlı farklılık

Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma örneklerine ait ortanca 21.0 (IU/L) ve örnekler 7-329 (IU/L) arasında bulundu. Serum örneklerine ait ortanca 30.0 (IU/L) ve örnekler 12-380 (IU/L) arasında bulundu. Elde edilen sonuçlara göre plazma değerleri, serum değerlerinden %30 daha düşük olarak hesaplandı.

Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma örneklerine ait ortanca 2.3 (ng/ml) ve örnekler 0.6-244.5 (ng/ml) arasında bulundu. Serum örneklerine ait ortanca 2 (ng/ml) ve örnekler 0.6-249 ng/ml arasında bulundu. Elde edilen sonuçlara göre plazma değerleri, serum değerlerinden %15 daha yüksek olarak hesaplandı.

Her iki cihazda ölçülen, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB değerleri arasındaki anlamlı farklılık $p < 0.05$ düzeyinde gösterilmektedir (Şekil-39).



Şekil 39: Her iki cihazda ölçülen, plazma ve serum örneklerine ait CK-MB ölçüm değerleri

Her iki cihaz için, Li-Heparinli plazma ile serum örnekleri arasındaki ilişki spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi (Tablo-20). Architect c 8000 Biyokimya cihazı için korelasyon katsayısı, %95 güven aralığında (0.810 ile 0.969 arasında), ($r=0.922$) olarak bulundu ($p < 0.0001$). Architect i 1000 SR Hormon cihazı için korelasyon katsayısı, %95 güven aralığında (0.993 ile 0.999 arasında) ve ($r=0.997$) olarak bulundu ($p < 0.0001$).

Tablo 20: Her iki cihaz için plazma ile serum örnekleri arasındaki ilişki

	Architect c 8000 Biyokimya Cihazı (CK-MB aktivite)	Architect i 1000 SR Hormon Cihazı (CK-MB kütle)
Korelasyon Katsayısı (r)	0.922	0.997
P Değeri	$P < 0.0001^*$	$P < 0.0001^*$

* $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı farklılık

5. TARTIŞMA

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde Koroner Arter Hastalığı ve sonrasında gelişen Akut Myokard İnfarktüsü (AMI) önemli bir sağlık sorunudur. AMI tanısı klinik, laboratuvar ve EKG değişiklikleri tespit edilerek konmaktadır (1). Uzun yıllardan beri; AMI tanısının doğrulanmasında, laboratuvar belirteçlerinden biri olan CK izoenzimleri kullanılmaktadır. Kalp kası hücrelerindeki CK aktivitesinin yaklaşık olarak %20' si, CK-MB izoenzimine aittir. Bu nedenle miyokard hasarı sonucu, kan dolaşımına kalp dokusundan yüksek oranda CK-MB izoenzimi salınır (123). Önceki yıllarda CK-MB izoenzimi, elektroforez veya kromotografik yöntemler kullanılarak izoenzimlerine ayrıldıktan sonra katalitik aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Daha sonra katalitik aktivite, immünolojik teknikler yardımıyla ölçülmüştür. Ancak; makro CK ve mitokondriyal CK gibi atipik izoenzimlerin, CK-MB immünoinhibisyon ölçümlerinde interferansa yol açarak daha düşük özgüllüklere neden olmasından dolayı, bu yöntemlerin kullanımı sınırlıdır. Son yıllardaki güncel yaklaşım, MB dimeri için monoklonal antikolar kullanarak, CK-MB protein (kütle) konsantrasyonunun, immünoassay teknikler ile ölçümüdür (124). Son yıllarda AMI tanısında, kalp dokusu hasarı için daha spesifik olan ve enzimatik yapıda olmayan kardiyak troponinler (cTn) kullanılmaya başlanmıştır (123).

Tanısal amaçlı hizmet veren birçok laboratuvar olmasına karşın, bunlardan çok azı akreditasyonunu tamamlamış laboratuvarlardır. Ulusal Klinik Biyokimya Akademisi (*UKBA, National Academy of Clinical Biochemistry*), Akut Koroner Sendrom (AKS) tanısında kullanılması gereken kardiyak belirteçleri belirtmişlerdir. Ancak birçok laboratuvar, tavsiye edilen bu prosedürü tam olarak uygulamamaktadır. UKBA, miyokard infarktüsünde tanısal amaçlı cTn ile CK-MB ölçümünü

önermektedir. cTn olmadığı durumlarda, alternatif olarak immünoassay CK-MB (CK-MB kütle ölçüm) kullanılabilir. UKBA kılavuzlarına göre, cTn ile CK-MB kütle ölçümünün mevcut olmadığı durumlarda, total CK ve CK-MB aktivite ölçümleri, kalp hasarını değerlendirmek için kullanılabilir (125, 126). Laboratuvarların birçoğu; CK-MB kütle ölçümü yerine, CK-MB aktivitesini kullanmaktadır. Ancak; sonuçlarını teyit etmek için UKBA kılavuzlarında belirtilen, CK-MB/total CK oranını kullanmamaktadırlar (127).

Bu çalışmada; AMI tanısında laboratuvar belirteçlerinden birisi olan CK-MB parametresinin ölçümü için kullanılan, immünoinhibisyon (CK-MB aktivite) yöntemini kullanan Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile kemiluminesans yöntemi (CK-MB kütle) kullanan Architect i 1000 SR Hormon cihazlarında, ön değerlendirme deneyleri olarak within-run (gün-içi) tekrarlanabilirlik, geri kazanım (recovery) deneyi, interferans çalışması ve son değerlendirme deneyleri olarak yöntem karşılaştırma deneyi ve deneyler arası tekrarlanabilirlik (günler-arası) deneyi yapıldı. Böylelikle; iki farklı yöntem olan immünoinhibisyon (CK-MB Enzim aktivite) yöntemi ile immünoassay (CK-MB Kütle ölçüm) yönteminin analitik performansları ve tanısal yeterlilikleri değerlendirildi. Her iki yöntemi tanısal açıdan değerlendirmek için, klinik olarak AMI tanısı almış 20 hasta belirlendi. Göğüs ağrısının başlangıcından yaklaşık 6 saat sonra alınan serum örneklerine ait duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanarak, ROC eğrileri oluşturuldu ve eğri altında kalan alanlar hesaplanarak, birbirleriyle karşılaştırıldı. Ayrıca antikoagülanlı ve antikoagülanlı tüpler kullanılarak, plazma ile serum için, CK-MB sonuçları arasında fark olup olmadığı incelendi.

Architect c 8000 Biyokimya cihazı ve Architect i 1000 SR cihazlarına ait orjinal reaktifler kullanılarak yapılan deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. De Keijzer ve arkadaşlarının, Architect i 1000 SR (Abbott Inc, USA) Hormon cihazının analitik performansını değerlendirmek için yaptığı çalışma; ABD, Avrupa, Kanada ve Japonya olmak üzere 4 farklı ülkede ve 7 farklı laboratuvarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, CK-MB parametresi dışında laboratuvarda kullanılan diğer testlerinde performansları değerlendirilmiştir. Günlük çalışma kapasitesi 250 (test sayısı/gün)' nin altında olan ve düşük-orta hacimli kabul

edilen Architect i 1000 SR Hormon cihazının, CK-MB parametresine ait total prezisyon (%CV) değeri %5' in altında bulunmuş ve laboratuvarlarda elde edilen bu değer, kit prospektüsünde belirtilen değerlerle uyumlu olduğu belirtilmiştir (128). Arı ve arkadaşları, 3 farklı yöntem ile çalışan Vitros 250 (Kuru kimya), Targa 3000 (Optimize UV test), Immulite 120 (kemilüminesan enzim immünometrik ölçüm) cihazların, CK ve CK-MB ölçüm değerleri üzerine analitik performanslarını test ederek, CK ve CK-MB' nin ölçümünde kullanılan farklı yöntemlerin doğruluk ve güvenilirliğini değerlendirmişlerdir. Total CK ve CK-MB ölçümleri için laboratuvara gelen hasta serumları ve firmalara ait kontrol örneklerinden havuzlar oluşturarak, deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışması yapmışlardır. Hasta kanlarından hazırlanan serum havuzunda yapılan deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışmasına göre % CV değerleri sırasıyla; Vitros 250 cihazı için %4.8 (deney-içi) %7.9 (deneyler-arası), Targa 3000 cihazı (CK-MB aktivite) için %7.2 (deney-içi) %11.3 (deneyler-arası) ve Immulite 120 cihazı (CK-MB kütle) için % 6.6 (deney-içi) %7.8 (deneyler-arası) olarak bulunmuştur. Kontrol örneklerinden yapılan deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışmasına göre % CV değerleri, düşük seviye kontrol örneğinde sırasıyla; Vitros 250 cihazı için %4.8 (deney-içi) %7.9 (deneyler-arası), Targa 3000 cihazı (CK-MB aktivite) için %7.2 (deney-içi) %11.3 (deneyler-arası) ve Immulite 120 cihazı (CK-MB kütle) için % 6.6 (deney-içi) %7.8 (deneyler-arası) olarak bulunmuştur. Patolojik seviye kontrol örneğinde sırasıyla; Vitros 250 cihazı için %0.34 (deney-içi) %2.89 (deneyler-arası), Targa 3000 cihazı (CK-MB aktivite) için %6.87 (deney-içi) %6.95 (deneyler-arası) ve Immulite 120 cihazı (CK-MB kütle) için % 1.12 (deney-içi) %2.15 (deneyler-arası) olarak bulmuşlardır (67). Delanghe ve arkadaşları, CK-MB ölçümünde kullanılan immünopresipitasyon (Roche Diagnostic Systems), immünoinhibisyon (Roche Diagnostic Systems) ve immünoassay (Tandem-E CKMB II, Hybritech Inc.) yöntemlerini kullanan cihazların analitik performanslarını karşılaştırarak, aktivite (Roche cihazları) ve kütle (Tandem-E CKMB II cihazı) ölçümleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında; düşük seviye CK-MB değerlerine ait ortalama ve %CV değerlerini sırasıyla; immünopresipitasyon yöntemi için 18 IU/L, %3.3 olarak, immünoinhibisyon yöntemi için 30 IU/L, %3 olarak ve immünoassay yöntemi için 15 ng/ml, %3.7 olarak bulmuşlardır. Yüksek

seviye CK-MB değerlerine ait ortalama ve %CV değerlerini sırasıyla; immünopresipitasyon yöntemi için 51 IU/L, %1.1 olarak, immünoinhibisyon yöntemi için 64 IU/L, %1 olarak ve immünoassay yöntemi için 44 ng/ml, %2.1 olarak bulmuşlardır (129).

CK-MB kütle (Architect i 1000 SR cihazı) ölçümü için izin verilebilir total hata (%TE) %31.2' dir. Gün-içi tekrarlanabilirlik çalışması ile elde edilen analitik varyasyon katsayısı, izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{4}$ ' üne eşit veya daha küçük olmalıdır ($CV_{w-day} \leq 0.25 TE\%$). Buna göre; (%TE)' nin $\frac{1}{4}$ ' ü, CK-MB Kütle için % 7.8' dir (92, 94). Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile yaptığımız deney-içi tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen gün içi analitik varyasyon katsayısını (CV_{w-day}); hem normal düzey, hem de patolojik düzey için %7.8' den daha düşük bulduk (Tablo-6). Gün-içi ve günler-arası analitik varyasyonlardan hesaplanan total analitik hata ($CV_{an-total}$); birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un $\frac{1}{2}$ ' sine eşit veya daha küçük olmalıdır ($CV_{an-total} \leq 0.5 CV_I$). Ayrıca; total analitik hata ($CV_{an-total}$), izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' üne eşit veya daha küçük olmalıdır ($CV_{an-total} \leq 0.33 TE\%$). Birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un $\frac{1}{2}$ ' si; CK-MB Kütle için %9.2' dir. İzin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' ü; CK-MB Kütle için, % 10.3' dür (92, 94). Architect i 1000 SR Hormon cihazında, normal düzey için hesaplanan total analitik hata ($CV_{an-total}$)' yı %8 olarak bulduk (Tablo-11). Bu değer CK-MB Kütle ölçümü için, hem birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un yarısından (% 9.2), hem de izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' ünden (%10.3) daha düşüktür. Patolojik düzey için hesaplanan total analitik hata ($CV_{an-total}$)' yı % 5.5 olarak bulduk (Tablo-11). Bu değer CK-MB Kütle ölçümü için, hem birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un yarısından (% 9.2), hem de izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' ünden (% 10.3) daha düşüktür.

CK-MB Aktivite (Architect c 8000 cihazı) ölçümü için izin verilebilir total hata (%TE) %24.1' dir. Gün-içi tekrarlanabilirlik çalışması ile elde edilen analitik varyasyon katsayısı, izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{4}$ ' üne eşit veya daha küçük olmalıdır ($CV_{w-day} \leq 0.25 TE\%$). Buna göre; (%TE)' nin $\frac{1}{4}$ ' ü, CK-MB Aktivite için % 6' dır (92, 94). Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile yaptığımız deney-içi tekrarlanabilirlik çalışmasında; normal düzeye ait gün içi analitik

varyasyonu (CV_{w-day}) % 7.5 olarak bulduk ve bu değer CK-MB Aktivite için belirlenen % 6 değerinden daha yüksektir (Tablo-5). Patolojik düzeye ait gün içi analitik varyasyonu (CV_{w-day}) ise % 5.1 olarak bulduk ve bu değer CK-MB Aktivite için belirlenen % 6 değerinden daha düşüktür (Tablo-5). Gün-içi ve günler-arası analitik varyasyonlardan hesaplanan total analitik hata ($CV_{an-total}$); birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un $\frac{1}{2}$ ' sine eşit veya daha küçük olmalıdır ($CV_{an-total} \leq 0.5 CV_I$). Ayrıca; total analitik hata ($CV_{an-total}$), izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' üne eşit veya daha küçük olmalıdır ($CV_{an-total} \leq 0.33 TE\%$). Birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un $\frac{1}{2}$ ' si; CK-MB Aktivite için, % 9.9' dir. İzin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' ü; CK-MB Aktivite için, % 8' dir (92, 94). Architect c 8000 Biyokimya cihazında, normal düzey için hesaplanan total analitik hata ($CV_{an-total}$)' yı % 12.1 olarak bulduk (Tablo-11). Bu değer CK-MB Aktivite ölçümü için, hem birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un yarısından (% 9.9), hem de izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' ünden (% 8) daha yüksektir. Architect c 8000 Biyokimya cihazında, patolojik düzey için hesaplanan total analitik hata ($CV_{an-total}$)' yı ise % 9.4 olarak bulduk (Tablo-11). Bu değer CK-MB Aktivite ölçümü için, izin verilebilir total hata (%TE)' nin $\frac{1}{3}$ ' ünden (% 8) daha yüksektir. Ancak; birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I)' un yarısından (% 9.9) daha düşüktür. CK-MB ölçümü için kullanılan Architect CK-MB Liquid (CK MB aktivite ölçümü) kitine ait, üretici firmanın yaptığı tekrarlanabilirlik çalışmasında; deney-içi prezisyon için 3 farklı düzeyde kontrol örnekleri kullanılarak, her bir düzey 20' şer kez çalışılmıştır. Her 3 seviye için ortalama ve %CV değerleri sırasıyla; düşük düzey için 7.3 (IU/L) ve %11.2, normal düzey için 30.3 (IU/L) ve %1.3 ve patolojik düzey için 78.7 (IU/L) ve %0.8 olarak bulunmuştur. Deneyler-arası prezisyon için 3 farklı düzeyde kontrol örnekleri kullanılarak, her bir düzey 20 gün boyunca günde 2' şer kez çalışılmıştır. Her 3 seviye için ortalama ve %CV değerleri sırasıyla; düşük düzey için 7.3 (IU/L) ve %8.7, normal düzey için 30.1 (IU/L) ve %1.9 ve patolojik düzey için 79.3 (IU/L) ve %1.7 olarak bulunmuştur.

Tüm analitlerin biyolojik varyasyonlardan etkilendiği göz önünde bulundurulursa, biyolojik olarak tek bir kalite özelliğinin kullanılması yararlı olacaktır. Fraser ve arkadaşları; tekrarlanabilirlik (kesinlik) ve bias, yani doğruluk için kalite özellikleri bakımından 3 farklı seviyede sorgulama yapılması gerektiğini

belirtmişlerdir. Bu durum, tekrarlanabilirlik için; arzu edilen kesinlik, optimum kesinlik, minimum kesinlik şeklindedir. Bias, yani doğruluk için ise; arzu edilen doğruluk, optimum doğruluk ve minimum doğruluk şeklindedir (90, 91). Analitik performans değerlendirilirken, genellikle arzu edilen kesinlik ve doğruluk kriterleri göz önünde bulundurulur. Yaptığımız tekrarlanabilirlik çalışmasında kemiluminesans yöntemi (CK-MB kütle) kullanan Architect i 1000 SR Hormon cihazının; hem normal hem de patolojik düzey CK-MB serum havuzlarında, arzu edilen kesinlik kriterlerini sağladığını tespit ettik. İmmünoinhibisyon (CK-MB aktivite) yöntemini kullanan Architect c 8000 Biyokimya cihazında ise; patolojik düzey CK-MB serum havuzunda arzu edilen kesinlik kriterlerini sağlarken, bu durumun normal düzey CK-MB serum havuzunda görülmediğini bulduk. Ancak; CK-MB aktivite ölçümü için, minimum kesinlik kriterine göre ($CV_A < 0.75 \times CV_I$) %14.7' den daha düşük olduğunu gördük. Elde edilen bu sonuçlara göre kesinlik açısından cihazların tekrarlanabilirlik performansının yeterli olduğu ve daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğunu düşündük.

Sistemik hatanın bileşenlerinden birisi olan, oransal sistemik hatanın belirlenmesi için geri kazanım (recovery) deneyi yapılmalıdır. Architect i 1000 SR Hormon cihazının kullandığı Architect STAT CK-MB (CK-MB kütle) kiti için üretici firmanın 5 farklı numunede yapmış olduğu recovery çalışmasında; 128 ng/ml için % 93, 169 ng/ml için % 97, 260 ng/ml için %103, 273 ng/ml için %111, 278 ng/ml için %95'lik bir geri kazanım elde edilmiştir. Architect c 8000 Biyokimya cihazında Architect CK-MB Liquid (CK MB aktivite) kiti için, üretici firma tarafından yapılmış geri kazanım çalışması bulunmamaktadır. Oransal sistemik hatayı tespit etmek için yapmış olduğumuz geri kazanım çalışmasında; Architect c 8000 Biyokimya cihazı için elde edilen % Bias için, normal düzeyde (23.7 IU/L) %7.1 ve patolojik düzeyde (113 IU/L) %7.1 olarak bulduk (Tablo-12). CK-MB Aktivite ölçümü için izin verilen %Bias, %7.8' dir (94). Normal düzey ve Patolojik düzey için hesaplanan %Bias (%7.1) değerlerinin, izin verilen %Bias (%7.8) değerinden daha düşük olduğunu tespit ettik. Elde edilen bulgulara göre Architect c 8000 Biyokimya cihazının, CK-MB aktivitesinin, hem normal hem de patolojik düzeylerde doğru olarak ölçüldüğünü düşündük. Architect i 1000 SR Hormon cihazı için elde edilen % Bias için, normal düzeyde (5.67 ng/ml) %9.2 ve patolojik düzeyde

(62.55 ng/ml) %5.9 olarak bulduk (Tablo-13). CK-MB kütle ölçümü için izin verilen %Bias, %16' dır (94). Normal düzey ve Patolojik düzey için hesaplanan %bias (%9.2, %5.9) değerlerinin, izin verilen %bias (%16) değerinden daha düşük olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlara göre; Architect i 1000 SR Hormon cihazının, CK-MB kütle ölçümünde, hem normal hem de patolojik düzeylerde doğru olarak ölçüldüğünü düşündük.

Sistemik hatanın diğer bileşeni olan, sabit sistemik hatanın belirlenmesi için interferans (girişim) deneyi yapılmalıdır. Ölçülen analit konsantrasyonunda, başka bir bileşimin etkisi veya örneğin özelliği nedeniyle klinik olarak anlamlı bir biasın meydana gelmesi "İnterferans" olarak nitelendirilir. İnterferan maddeler laboratuvar ölçümlerinde önemli bir hata kaynağı oluşturabilmekte ve bu hata kolay bir şekilde saptanamamaktır. Potansiyel interfere edici maddeler; Örnek anormallikleri (Hemoliz, İkter, Lipemi), yaygın kullanılan ilaçlar, belirli hastalıklarda beklenen anormal biyokimyasal metabolitler, benzer reaksiyon göstererek ölçüme girebilen interfere edici maddeler, örnek katkı maddeleri, koruyucular, antikoagülanlar, örnek toplama ve hazırlama esnasında temas eden maddeler, diyetle kullanılan maddeler şeklinde sınıflandırılabilir (99). Laboratuvar analizlerinde hatalara neden olabilen etkenlerden birisi "Hemoliz" dir. Kan örneklerinde bu duruma çok fazla rastlanıldığı uzun zamandır bilinmektedir (130). Hemoglobinin konsantrasyonu 20 mg/dl' yi aştığında, plazma rengi gözle görünür olarak kırmızı rengi almaktadır. Hemoliz, eritrositlerin parçalandığı yere göre vücut içinde (in vivo) veya kan alındıktan sonra vücut dışında (in vitro) oluşabilir. İn vivo hemolize yol açan nedenler arasında hemolitik anemiler, uygunsuz kan transfüzyonları, toksik maddeler ve enfeksiyonlar yer almaktadır. Kan örneklerinde daha sık rastlanan in vitro hemoliz, kan alınması veya örneklerin işlenmesi ve transportu sırasında yapılan hatalardan kaynaklanmaktadır. Hemolizin laboratuvar test sonuçlarını etkilemesi ile ilgili çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar arasında en kesin olan, eritrositlerin içeriğinin seruma geçmesi sonucunda hücre içindeki konsantrasyonu, serumdakinden yüksek olan analitlerin test sonuçlarını direkt olarak etkilemesidir. Ayrıca hemoglobinin görünür ve ultraviyole spektruma yakın dalga boylarında (300-500 nm) ışığı absorbe ettiği için, hemoliz bu dalga boylarının kullanıldığı spektrofotometrik ölçüm yöntemlerini interfere eder. Hemoliz sırasında eritrositlerden salınan

hemoglobin dışındaki diğer hücre bileşenleri, test reaktifleri ile reaksiyona girerek kimyasal interferansa neden olmaktadır (131). Özcan ve arkadaşları yaptığı çalışmada; CK ve CK-MB aktivitesi ile CK-MB kütle ölçümü, Troponin I ve Myoglobin ölçümleri üzerine hemolizin etkisini incelemişler. CK-MB aktivite ölçümü için kullanılan farklı iki reaktif (Olympus ve Roche orjinal kitleri), Olympus AU640 Biyokimya cihazında ve CK-MB kütle ölçümü için kullanılan reaktif (Liaison orjinal kiti) Liaison Hormon cihazında çalışılarak, çıkan sonuçları değerlendirmişler. CK-MB aktivitesi için kullanılan; Olympus ve Roche kitlerinde, normal düzey serum havuzundan hazırlanan serum örneklerinde interferans etkisinin yaklaşık olarak 37 mg/dl civarında başladığını tespit etmişlerdir. Patolojik düzeyde ise Roche kiti için 70 mg/dl, Olympus kiti için ise 80 mg/dl üzerinde başladığını bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre; CK-MB aktivitesinin hemolizden, CK aktivitesine göre daha çok etkilendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, CK-MB kütle ölçümü, Troponin I ve Myoglobin ölçümlerinin hemolizden etkilenmediğini vurgulamışlardır (132). Yücel ve arkadaşlarının, CK-MB aktivitesi ile hemoliz arasındaki ilişkiyi araştırmak için yaptığı çalışmada ise hafif hemolizden şiddetli hemolize kadar, değişik hemoglobin konsantrasyonları ile CK-MB aktiviteleri arasında pozitif ve anlamlı korelasyon olduğu tespit edilmiştir ($r=0.982$, $p<0.0001$). Pozitif yöndeki interferansın, düşük hemoglobin konsantrasyonlarında görülmeye başladığı ve hemoglobin konsantrasyonu arttıkça CK-MB aktivitesinin de arttığı belirtilmiştir (133).

Sabit sistematik hatayı tespit etmek için yapmış olduğumuz interferans deneyinde; CK-MB Aktivite ölçümü yapan Architect c 8000 Biyokimya cihazının, normal ve patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, yüksek Hb konsantrasyonlarından etkilendiği ve Hb konsantrasyonu yaklaşık 2 g/dl olan 1. tüpe ait CK-MB aktivite değerlerinin cihaz tarafından ölçülemediğini tespit ettik (Tablo-14), (Tablo-15). Bu yüzden serum havuzu A olarak etiketlenen 1. tüpe ait %Bias' ı hesaplayamadık. Hemoglobinin interferans etkisinin, CK-MB aktivite ölçümlerinde düşük konsantrasyonlarda başladığı ve giderek arttığı açıkça görülmektedir (Şekil-22), (Şekil-23). CK-MB Aktivite ölçümü için izin verilen %Bias, (%7.8)' dir (94). Bu sınırın, normal serum havuzundan hazırlanan serum örneklerinde yaklaşık olarak 19 mg/dl Hb konsantrasyonlarında başladığı, patolojik

düzyey için ise yaklaşık olarak 63 mg/dl Hb konsantrasyonlarında başladığını tespit ettik (Şekil-24). Architect CK-MB Liquid (CK-MB aktivite ölçümü) kitine ait prospektüste, hemolize bağılı interferans etkisinin yaklaşık olarak 50 mg/dl civarlarında başladığı belirtilmiştir. Yaptığımız interferans deneyinde elde edilen bulguların, Architect CK-MB Liquid kit prospektüsünde belirtilen bilgilere benzer olduğu görülmektedir. CK-MB Kütleye ölçümü yapan Architect i 1000 SR Hormon cihazının, normal ve patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, her iki düzeyde de hemoglobinin interferans etkisini göremedik (Şekil-22), (Şekil-23). Normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde görülen en yüksek % Bias' ı (%-5.8) olarak ve patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde görülen en yüksek % Bias' ı ise (%-5.9) olarak bulduk (Tablo-14), (Tablo-15). CK-MB Kütleye ölçümü için izin verilen %Bias, (%16.0)' dır (94). CK-MB Kütleye ölçümlerinde, her iki düzey için de izin verilen % Bias değerinin aşılmadığını gördük (Şekil-25). Architect STAT CK-MB (CK-MB kütle ölçümü) kitine ait prospektüste, hemolize bağılı interferans etkisinin yaklaşık olarak 500 mg/dl civarlarında başladığı belirtilmiştir.

Artan Hb konsantrasyonlarında ölçülen CK-MB değerleri ile hemolizin interferans etkisini değerlendirmek için her iki cihazda, normal ve patolojik serum havuzlarından hazırlanan örnekler için korelasyon analizi yaptık. CK-MB Aktivite ölçümü yapan Architect c 8000 Biyokimya cihazında; normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde ölçülen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısını ($r=0.996$) ve anlamlılık düzeyini ($p<0.0001$) olarak bulduk (Şekil-26). Patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçülen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısını ($r=0.999$) ve anlamlılık düzeyini ($p<0.0001$) olarak bulduk (Şekil-27). CK-MB Kütleye ölçümü yapan Architect İ 1000 SR Hormon cihazında; normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, artan Hb konsantrasyonları ile ölçülen CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulamadık ($p=0.27$), (Şekil-28). Patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde ise; artan Hb konsantrasyonları ile ölçülen CK-MB değerleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulduk ($r=-0.754$, $p=0.007$), (Şekil-29). Elde edilen bu sonuçlara göre; artan

Hb konsantrasyonlarına paralel olarak, CK-MB aktivite değerlerinin pozitif yönde arttığını ve bunun hemolizin interferans etkisinden kaynaklandığını düşündük. CK-MB kütle değerlerinin ise, artan Hb konsantrasyonlarından etkilenmediğini gördük. Patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde ise; artan Hb konsantrasyonları ile CK-MB kütle ölçüm değerleri arasında görülen negatif yöndeki korelasyonun, yaklaşık olarak 500 mg/dl üzerindeki Hb konsantrasyonlarına ait tüplerden kaynaklandığını düşündük (Şekil-29). Yapmış olduğumuz interferans çalışmasından elde ettiğimiz sonuçların, daha önce yapılan çalışmalar ve Architect STAT CK-MB kit prospektüsünde belirtilen bilgiler ile uyuştuğunu gözlemledik.

Klinik araştırmalarda kullanılan, “*Metod Karşılaştırma*” ifadesinden anlaşılması gereken, bir klinik araştırmada ele alınan iki klinik tekniğin bir birine uyumu ve referans tekniğe alternatif olarak sunulabilecek olan tekniğin geçerliliğini hatta üstünlüğünü araştırmaktır. Bu sayede yeni gelişmelere, dolayısıyla insan hayatında etkili ve faydalı olabilecek yeni tekniklerin ortaya çıkmasına olanak sağlanması amaçlanmaktadır. İki klinik ölçüm tekniğinin istatistiksel modellemesini yapmak ve karşılaştırmak için mutlaka bu teknikler aracılığı ile elde edilmiş verilere ihtiyaç vardır. Söz konusu teknikler aracılığı ile yapılan bu ölçümlerin ne kadar gerçekçi olduğu, istatistiksel ifade ile ne kadar doğru, yansız ve geçerli olduğu, elde edilen sonuçlara o oranda yansiyacaktır (102). Klinik olarak tıpta; genellikle kan basıncı, gebelik yaşı veya kalp atım hacmi gibi bazı nicelikleri ölçen iki farklı metod karşılaştırılmak istenebilir. Bazen aynı sonucu veren mevcut iki metodun karşılaştırması da yapılır. Bu aslında bir kalibrasyon sorunudur. Ancak metod karşılaştırma çalışmalarında, bazı durumlarda yeni bir metodun, mevcut metod ile aynı sonuçları verdiği bilinmektedir. Ayrıca yeni yöntem hem zaman, hem kullanım kolaylığı, hem de ekonomik açıdan üstünlük sağlayabilir. Bu amaçlar doğrultusunda metod karşılaştırma çalışmalarının önemi büyüktür. Medikal metod karşılaştırma çalışmalarının çoğunluğu, istatistiksel açıdan profesyonel olmayan kişiler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bundan dolayı kullanılan teknikler amaca uygun olmayabilir ve varsayım hataları göz ardı edilebilir. İstatistikçiler ile istatistikçi olmayan ancak konusunda uzman olan kişilerin bir araya gelmesi ve bu alanda yapılan çalışmaların ayrıntılı olarak incelenmesi ile bu tür problemler çözümlenebilir (134). Bazı klinik araştırmalarda, yeni bir ölçüm tekniği ile referans olarak kullanılan ölçüm tekniğinin

uyum düzeyi çeşitli istatistiksel yöntemler kullanılarak incelenir. Genellikle ölçüm teknikleri arasındaki uyum düzeyini belirlemek için korelasyon ve regresyon analizi kullanılır. Fakat korelasyon ve regresyon analizi uyumu ölçmede doğru yöntemler değildir. Önceki yıllarda yapılan metod karşılaştırma çalışmalarında, uyum değerlendirilmesi için genellikle klasik istatistik yöntemlerinin kullanıldığı görülmüş, ancak bilinen yöntemlerin uyumun değerlendirilmesinde hatalı sonuçlar verdiği için bu yöntemlere alternatif yöntemler önerilmiştir. Pearson korelasyon katsayısı, regresyon analizi, bağımlı gruplar için eşleştirilmiş T-testi, yöntem karşılaştırma çalışmalarında kullanılan klasik istatistiksel yöntemlerdir. Sınıf-İçi Korelasyon Katsayısı (SKK), Concordance Korelasyon Katsayısı (CKK), Bland-Altman (Ortalamalar-Farklar) grafiği, Deming regresyon ve Passing-Bablok yöntemleri ise yöntem karşılaştırma çalışmalarında kullanılması önerilen istatistik yöntemleridir (101, 135).

CK-MB tayininde kullanılan aktivite ölçüm yöntemi (immünoinhibisyon) ile CK-MB kütle ölçüm yöntemini (immünoassay) karşılaştırmak için, Küçükercan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; sağlıklı grup olarak kabul edilen, total CK değeri normal olup, CK-MB aktivite değeri firmanın verdiği kit referans aralığının üzerinde olan ve kardiyak şikayeti ve öyküsü olmayan 65 olgu çalışmaya alınmıştır. Ayrıca hasta grubu olarak kabul edilen, klinik olarak akut miyokard infarktüsü (AMI) tanısı almış 34 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Her iki gruptan alınan serum örnekleri; CK-MB aktivite ölçümü için immuninhibisyon metodu ile çalışan Hitachi 911 (Roche Diagnostics) biyokimya cihazında ve CK-MB kütle ölçümü için elektrokemiluminesans immünoassay metodu ile çalışan Elecsys 2010 (Roche Diagnostics) hormon cihazında analiz edilmiştir. Sağlıklı grubun CK-MB değerleri ortalaması CK-MB aktivite ve kütle ölçümleri için sırasıyla 30.75 IU/L ve 1.78 ng/ml olarak bulunmuştur. AMI' lı hastaların değerleri ortalaması ise 112.18 IU/L, 72.4 ng/ml olarak bulunmuştur. Sağlıklı grupta; CK-MB aktivite ve kütle değerlerine ait yapılan korelasyon analizi sonucunda korelasyon katsayısı çok düşük bulunmuştur ($r=0.076$). AMI' lı hasta grubunda; CK-MB aktivite ve kütle değerleri lineer regresyon/korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, her iki yöntemin yüksek korelasyon gösterdiği belirtilmiştir ($r=0.977$). Regresyon eğrisine ait denklem, $y = 0.91x + 46.5$ olarak bulunmuştur. Normal düzey CK-MB değerlerinde, yöntemler

arasında iyi bir korelasyon bulunamayışını; immünoinhibisyon yönteminin makro CK₁, makro CK₂ ve CK-BB düzeylerinden etkilenebilmesi sebebiyle olabileceğini belirtmişlerdir. AMI hasta grubunda, CK-MB aktivite ve kütle ölçüm yöntemleri arasındaki anlamlı korelasyonu ise; serum örneklerinde yüksek düzeyde bulunan CK-MB nedeniyle, makro CK₁, makro CK₂ ve CK-BB düzeylerinin ihmal edilebileceğini belirtmişlerdir (136). Delanghe ve arkadaşları, aktivite ve kütle ölçüm yöntemleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yaptıkları korelasyon/regresyon analizinde; immünoinhibisyon ile immünoassay yöntemlerine ait korelasyon katsayısını $r=0.935$ olarak, regresyon denklemini $y= 1.40x - 12.39$ olarak ve immünopresipitasyon ile immünoassay yöntemlerine ait korelasyon katsayısını $r=0.943$ olarak, regresyon denklemini ise $y= 1.59x - 1.69$ olarak bulmuşlar. Elde edilen bulgulara göre; yöntemler arasında her ne kadar anlamlı bir ilişki olduğu belirtilse de, immünoinhibisyon yöntemine ait CK-MB değerlerinin, diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. CK-MB değer aralığının düşük olduğu düzeylerde görülen yöntemler arasındaki değer farklılığının, atipik CK formları ve adenilat kinaz nedeniyle olabileceğini vurgulamışlardır (129). CK enzimine ait alt birimlerinin elektroforetik ve kromatografik yöntemler ile belirlenmesi ve tanımlanması için, Michelutti ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; CK-MB enziminin katalitik aktivitesi ile kütle konsantrasyonları arasındaki çeşitliliğin nedeninin, karboksipeptidaz N aktivitesine bağlı enzim yapısındaki değişikliklerden olabileceğini belirtmişlerdir (137). Panteghini ve arkadaşları tarafından, immünoassay yöntemi kullanarak CK-MB kütle ölçümü yapan Tandem-E CKMB II cihazı (Hybritech Inc.) ile yapılan başka bir çalışmada; karboksipeptidaz N aktivitesinin, analiz için kullanılan monoklonal antikorlar ile CK-MB izoenzimi arasındaki bağlanma üzerine interferans etkisi yapmadığını belirtmişlerdir (138). Akağaç Etem ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; AMI hastası olan 16 kişi, total CK değeri yüksek ancak sağlıklı olan 30 kişi ve total CK düzeyi normal ancak CK-MB aktivitesi yüksek olan sağlıklı 30 kişi şeklinde toplam 76 kişinin bulunduğu 3 farklı grup oluşturmuşlardır. Serum total CK aktivitesi ölçümü enzimatik kinetik metod ile ve CK-MB aktivitesi ölçümü immünoinhibisyon metodu ile Abbott Architect c 8000 (Abbott Inc, USA) cihazında; CK-MB kütle ölçümleri kemiluminometrik yöntem ile Advia Centaur CP (Siemens Inc, Germany) cihazında yapılmıştır. Her üç grup için,

CK-MB aktivite ve kütle değerlerini, lineer regresyon/korelasyon analizi uygulayarak yöntemlerin uyumunu incelemişlerdir. Total CK düzeyi yüksek sağlıklı grupta, CK-MB aktivite ve kütle değerlerine ait yapılan korelasyon analizi sonucu ($r=-0.013$, $p=0.945$), total CK düzeyi normal CK-MB değeri yüksek sağlıklı grupta ($r=0.042$, $p=0.825$) olarak bulunmuş ve yöntemler arasında anlamlı korelasyon bulamadıklarını belirtmişlerdir. AMI hasta grubunda, CK-MB aktivite ve kütle değerlerine ait yapılan korelasyon analizi sonucu, iki yöntem arasında anlamlı korelasyon görüldüğü belirtilmiştir ($r=0.909$, $p=0.000$). Retrospektif olarak yapılan bu çalışma sonuçlarına göre; sağlıklı gruplarda CK-MB aktivite ve kütle ölçüm yöntemleri arasında anlamlı korelasyon olmamasının nedeninin, CK-MB immuninhibisyon yönteminin makro CK₁, makro CK₂ ve CK-BB düzeylerinden etkilenebileceği veya serumun çeşitli düzeylerde hemolizden etkilenebileceği şeklinde açıklamışlardır. AMI hasta grubunda, CK-MB aktivite ve kütle ölçüm yöntemleri arasında anlamlı korelasyon bulunmasını ise hastalara ait serum örneklerinde yüksek düzeyde bulunan CK formunun, gerçek CK-MB olması nedeniyle, makro CK₁, makro CK₂ ve CK-BB aktiviteleri ve hemolizden kaynaklanan olası etkilerin gerçekten yüksek MB aktivitelerinin yanında ihmal edilebilir düzeylerde kaldığını düşündüklerini belirtmişlerdir (139). Makro CK varlığında, CK-MB' nin immuninhibisyon metodu ile ölçümlerinde interferans oluşturduğu ve yalancı pozitif sonuçlara neden olduğu bilinmektedir (48). Serdar ve arkadaşları tarafından, Makro CK varlığında CK-MB aktivite değerlerinin etkilenme düzeyi araştırılmıştır. Yaklaşık olarak 269 kişinin katıldığı bu çalışmada total CK ve CK-MB aktivite değerleri ölçülmüş ve CK-MB/total CK oranı anormal yüksek (%5' in üstü) çıkan 65 kişiye serum elektroforezi yapılarak, makro CK ve CK-BB izoenzimi varlığı değerlendirilmiştir. 3 hastada Makro CK tip-1, 2 hastada Makro CK tip-2 ve 2 hastada ise CK-BB varlığı tespit edilmiştir (140). Arı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, rutin biyokimya laboratuvarına gelen hasta serumlarından rastgele 20 örnek seçilerek, üç farklı yöntemle Vitros 250 cihazı (Kuru kimya), Targa 3000 cihazı (Optimize UV test), Immulite 120 cihazı (kemilüminesan enzim immunometrik ölçüm) ile ölçülen CK-MB sonuçları arasındaki korelasyon katsayıları hesaplanarak, cihazlar arasındaki uyum değerlendirilmiştir. Korelasyon analizine göre elde edilen bulgular; Vitros 250 - Targa 3000 cihazları için ($r=0.990$,

$p<0.001$), Targa 3000 - Immulite 120 cihazları için ($r= 0.878, p<0.001$), Vitros 250 - Immulite 120 cihazları için ($r= 0.905, p<0.001$) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre her üç yöntemle bulunan değerler arasında istatistiksel olarak çok önemli ($p<0.001$) korelasyon olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda; kullanıcının hızlı sonuç elde etme, maliyet ve kendi laboratuvar şartları gibi faktörleri de göz önünde bulundurarak yöntem seçimi yapmasının uygun olacağı vurgulanmıştır (67).

Yaptığımız yöntem karşılaştırma deneyinde; CK-MB aktivite ölçüm yöntemi ile CK-MB kütle ölçüm yönteminin karşılaştırılması için 40 kişiye ait serum örnekleri, CLSI EP9-A protokolüne uygun olarak, günde 6-7 örnek çalışılarak, 7 günde tamamlandı. Bu çalışmada Abbott firmasına ait, Architect c 8000 Biyokimya cihazı ve Architect i 1000 SR Hormon cihazı kullanılarak, ölçüm yöntemleri arasındaki uyumu değerlendirdik. Cihazlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yaptığımız korelasyon analizinde, korelasyon katsayısını ($r=0.976$) olarak bulduk (Şekil-30). Her iki ölçüm yöntemi arasındaki ilişkinin anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik ($p<0.0001$). Referans yöntem olan CK-MB kütle ölçüm yöntemine ait veriler ile CK-MB Aktivite ölçüm yöntemine ait verileri değerlendirmek amaçlı yaptığımız Lineer regresyon analizine göre elde ettiğimiz denklem; $y= 2.1x + 22.8$ olarak bulundu. Regresyon denklemine ait belirtme katsayısını ise $R^2 = 0.953$ olarak bulduk (Şekil-31). CK-MB kütle (ng/ml) ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite (IU/L) ölçüm yöntemlerine ait birimler farklıdır ve bu yüzden yöntemler arasındaki uyumu, lineer regresyon denklemine göre değerlendiremedik. Her iki cihazdaki ölçüm sonuçlarına göre elde edilen değerleri, Passing-Bablok (P-B) regresyon analizi uygulayarak değerlendirdik. Parametrik olmayan bu yöntem ile ilgili hesaplamalar, ölçüm değerlerinin sıra (rank) numaralarına bağlı olarak yapılır ve test metodu ile referans metot (X ve Y metotları) ile elde edilen verilerin bağımsız olduğu varsayılır (108). Yaptığımız P-B regresyon analizi sonucu elde ettiğimiz denklem; $y= 0.977x + 0.86$ olarak bulundu. Regresyon denklemine ait; eğim (b; slope), % 95 güven aralığında ($0.87 - 1.13$) olarak ve kesişim (a; intercept) % 95 güven aralığında ($-3,93 - 3,29$) olarak tespit edildi (Şekil-32). Regresyon doğrusuna ait doğrusallığın değerlendirilmesi amaçlı uygulanan CUSUM testinde, doğrusallıktan sapma görmedik ($p=0.53$). Ölçüm yöntemlerine ait

birimler farklı olduğu için verilerin standardize edilmesi amaçlı; lineer regresyon denkleminde ($y = 2.1x + 22.8$) faydalanarak, her bir x (referans yöntem; CK-MB kütle) değeri için, olması gereken y' (test yöntemi; CK-MB aktivite) değerini hesapladık. Hesaplama sonucu elde edilen sonuçlar (y') ile CK-MB aktivite yöntemini kullanan Architect c 8000 biyokimya cihazının ölçtüğü gerçek değerler (y) arasındaki farklılığı, varyansların farklılığı açısından F-testi uygulayarak değerlendirdik. F-testi sonucuna göre; varyansların oranını: 1.04 olarak bulduk ve varyanslar arasında farklılık olmadığını tespit ettik ($p=0.88$). Hesaplanan değerler ile ölçülen değerlerin meydanları arasında anlamlı bir farklılık bulamadık ($p=0.63$), (Şekil-33). Yöntemler arasındaki uyumu değerlendirmek için yaptığımız Bland-Altman (ortalamalar-farklar) Grafiğinde ise; hesaplanan değerler ile ölçülen değerlere ait farkların ortalamasını 0.008 (-5.65 ile 5.67 arasında) olarak, standart sapmasını 17.7 olarak bulduk ve ölçüm yöntemlerinin birbirleri ile uyumlu olduğunu düşündük (Şekil-34).

Yaptığımız çalışmada; CK-MB aktivite ölçüm yöntemi ile CK-MB kütle ölçüm yöntemlerinin tanısal açıdan değerlendirilmesi için, her iki cihazdan elde edilen ölçüm sonuçlarının duyarlılıkları (*sensitivite*) ve özgüllüklerini (*spesifisite*) tespit ettik. Bu değerlerden faydalanılarak, her iki cihaza ait ROC eğrilerini oluşturduk. Gerhardt ve arkadaşları, koroner yoğun bakım ünitesindeki 502 koroner kalp hastasını; unstabil anjina pektoris, Q dalgasız veya Q dalgalı erken repüfüzyon hastaları, re-infarktüs hastaları ve subakut MI şeklinde çeşitli gruplar oluşturmuşlar ve hastaların serum örneklerini kullanarak, cTn ve CK-MB kütle ölçümlerinin duyarlılık ve özgüllüklerini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları seri ölçümler sonucu, cTn ölçümüne ait duyarlılık 1.00 ve özgüllük 0.77 olarak, CK-MB kütle ölçümüne ait duyarlılık 1.00 ve özgüllüğü ise 0.99 olarak bulmuşlardır (141). Serdar ve arkadaşlarının, Makro CK varlığında CK-MB aktivite değerlerinin etkilenme düzeyini araştırdığı çalışmada; ; total CK ve CK-MB aktivite değerlerine göre ROC analizi yapılmış ve eğri altında kalan alanlar her iki parametre için sırasıyla 0.853 ve 0.953 olarak belirtilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, özellikle Makro CK tip 1' in interferans etkeni olduğu bilinmesine rağmen Makro CK tip 2' nin de interferans oluşturabileceği vurgulanmıştır (140). Hetland ve arkadaşları, göğüs ağrısı nedeniyle acil servise başvuran 133 hastadan oluşan bir çalışma grubu oluşturarak, AMI' da

kullanılan kardiyak belirteçlerden; CK, CK izoenzimleri/Total CK oranının, CK-MB aktivite ve kütle konsantrasyonlarının, myoglobin ve cTn' in tanısal yeterliliğini değerlendirmişlerdir. Göğüs ağrısı başlangıcına göre 0-3 saat arasında yapılan ölçümlere göre, CK izoenzimleri/Total CK oranının en yüksek duyarlılığa sahip olduğunu belirtmişlerdir. 3-5 saat arasında yaptıkları ölçümlerde ise, CK izoenzimleri/Total CK oranı, myoglobin ve CK-MB kütle ölçümünün en yüksek eğri altında kalan alana sahip oldukları ve bu parametrelerin birbirleri arasında anlamlı farklılık olmadığını söylemişlerdir. Göğüs ağrısı başlangıcından 6 saat sonraki yapılan ölçümler de benzer şekilde bulunmuştur ve sonuç olarak CK izoenzimleri/Total CK oranı, myoglobin ve CK-MB kütle ölçümünün, AMI tanısının erken teşhisinde klinik performansları açısından birbirleriyle uyumlu olduğu belirtilmiştir (142). Hawkins ve arkadaşları; CK, CK-MB (aktivite ve kütle), Tn-I ve Tn-T testlerinin tanısal yararlarını karşılaştırmak için 59 AMI hastasına ait serum örneklerini değerlendirmişlerdir. Kardiyak enzimlerin belirlenmesi için laboratuvara gönderilen kan örneklerinden Total CK ve CK-MB aktivite ölçümleri yapıldıktan sonra numuneleri -20 °C' den daha düşük sıcaklıklarda saklamışlar ve daha sonra, CK-MB kütle, Tn-I ve Tn-T ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. Aynı zamanda, hastalara ait CK-MB/Total CK oranlarını hesaplamışlardır. Yaptıkları ROC analizlerine göre, eğri altında kalan alanlar; CK için 0.56, CK-MB aktivite için 0.72, CK-MB/Total CK için 0.73, CK-MB kütle ölçümü yapan cihazlar için 0.76 (AxSYM, Abbott Inc, USA), 0.77 (Elecsys, Roche Diagnostics, Germany), 0.78 (ECI, Ortho Clinical Diagnostics) olarak bulmuşlardır. Troponin-T için eğri altında kalan alan, duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla 0.94, %93, %92 ve Troponin-I için eğri altında kalan alan, duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla 0.95, %88, %100 olarak bulmuşlardır. Elde ettikleri bulgulara göre; CK-MB kütle ölçüm testlerinin ve Tn-I, Tn-T testlerinin performansları açısından kendi aralarında anlamlı bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. AMI hastalarının tanımlanmasında; troponin-T ve troponin-I testlerinin, CK-MB (aktivite ve kütle) ölçümlerine göre daha üstün olduğunu belirtmişler ve seri CK-MB ölçümleri ile beraber doğrulama amaçlı troponin testlerinin kullanılmasının maliyet açısından daha uygun olacağını belirtmişlerdir (143).

Yaptığımız çalışmada; CK-MB aktivite ve kütle ölçümü yapan her iki cihazda elde edilen sonuçlara göre, ROC eğrileri oluşturularak, eğri altında kalan alanları belirledik. Architect c 8000 Biyokimya cihazına ait sensitivite değerini %90 ve spesifisite değerini %90 olarak bulduk. Eğri altında kalan alanı (AUC) ise 0.939 olarak tespit ettik. Architect i 1000 SR Hormon cihazına ait sensitiviteyi %95 ve spesifisiteyi %95 olarak bulduk. Eğri altında kalan alanı (AUC) ise 0.980 olarak tespit ettik (Tablo-16). Her iki cihaza ait, eğri altında kalan alanları (AUC) karşılaştırdığımızda, yöntemler arasında anlamlı bir farklılık olmadığını tespit ettik ($p=0.118$), (Şekil-35). Bu sonuçlara göre her iki cihazın klinik performanslarının birbirine yakın olduğunu ve her iki yöntemin tanısal açıdan yeterli olduğunu düşünmekteyiz.

CK ölçümü için serum ve heparinli plazma örnekleri tercih edilir. Heparin dışındaki diğer antikoagülanlar, CK aktivitesini olumsuz yönde etkilediği için tercih edilmemelidirler (13). Koroner kalp hastaları, hastaneye yatırıldıklarında genel olarak profeksi amaçlı heparin tedavisi alırlar. Bu hastalardan serum örneği alındığı zaman, antikoagülanlı ajan kullanılmadığında pıhtı oluşumu yaklaşık olarak 10-15 dakika veya daha fazla zaman alır. Serum örneğinde pıhtı oluşumu, santrifüj aşamasından sonra da devam etmektedir. Örnek içinde oluşan pıhtılı materyal, otoanalizördeki problemleri tıkeyebilir. Otomatize immünolojik analiz cihazlarında plazma örnekleri kullanıldığı zaman pıhtılaşma için gereken süre elimine edilir ve böylelikle hedeflenen preanalitik süreç kısalmış olur. Bu yüzden Ulusal Klinik Biyokimya Akademisi (*UKBA, National Academy of Clinical Biochemistry*) tarafından; üretici firmalara, kardiyak belirteçlerin tayini için yapılan çalışmalarda serum yerine plazma örneklerinin kullanılması tavsiye edilmektedir (144). Teorik olarak, kardiyak belirteçlerin tayini için, serum yerine plazma örneklerinin kullanılması daha mantıklıdır. Çünkü antikoagülanlı plazma örnekleri kullanıldığı zaman, pıhtılaşma için gerekli ekstra zaman ortadan kalkar ve böylece preanalitik süre kısalmış olur. Ancak, kardiyak belirteçlerin tayini için kullanılan farklı analiz sistemlerinde plazma ile serum konsantrasyonları arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıkabilmektedir ve elde edilen sonuçları değerlendirmek için üretici firmalar tarafından sağlanan teyit amaçlı pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Yaygın olarak kullanılan kardiyak belirteçlerden birisi olan myoglobin, antikoagülanlar ile önemli

derecede interferans vermektedir ve bu durum antikoagülanlı örneklerin kullanımını kısıtlamaktadır. Aynı sorun, bazı CK-MB ölçümleri için de geçerlidir. Birçok troponin ölçüm sisteminde, serum yerine plazma örnekleri kullanılamaz. Genel olarak cTn-T ölçümlerinde etilendiamintetraasetik asit (EDTA)' lı plazma kullanılır fakat bu durum cTn-I ölçümlerinde oldukça kısıtlıdır. Çünkü EDTA, kalsiyum bağımlı troponin komplekslerini keser ve cTn-I konsantrasyonlarının azalmasına neden olur (145). Stiegler ve arkadaşları; AKS' li 100 hastadan serum ve Li-Heparinli plazma örneği alarak, cTn-I ve cTn-T parametrelerinde plazma ile serum örneklerini karşılaştırmışlardır. cTn-I tayini için; mikropartikül enzim immünoassay sistemle çalışan Axsym cihazını (Abbott Inc, USA) ve akrinin ester bazlı kemilüminesans yöntemle çalışan ACS: Centaur cihazını (Bayer Diagnostics, USA) kullanmışlardır. cTn-T tayini için; üçüncü jenerasyon elektrokemilüminesans sistemle çalışan Elecsys 1010 cihazını (Roche Diagnostics, Germany) kullanmışlardır. Heparinize plazma örneklerine ait ortalamalar (%95 güven aralığında), serum örnekleri ile karşılaştırıldığında; cTn-I için Axsym cihazında (101 ± 2), ACS: Centaur cihazında (94 ± 3) ve cTn-T için Elecsys 1010 cihazında (99 ± 3) olarak bulmuşlardır. Plazma ile serum örnekleri arasında görülen % farklılıklar için %20' den daha büyük farklılıklar; 100 örneğin % 11' i için ACS: Centaur cihazında, 100 örneğin % 2' si için Axsym cihazında ve cTn-T tayininde; Elecsys 1010 cihazı için, 100 örneğin % 9' unda tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre bazı durumlarda, heparinize plazma örneklerindeki troponin konsantrasyonlarının, serum örneklerindeki troponin konsantrasyonlarına göre belirgin olarak düşük çıkabileceğini belirtmişlerdir (146). Pagani ve arkadaşları; myoglobin, CK-MB ve cTn-I kardiyak belirteçlerini analiz ederek, plazma ile serum örnekleri arasında fark olup olmadığını incelemişlerdir. AMI tanısı alan 25 hastadan alınan serum ve plazma örneklerini, ACS 180 immünassay cihazında (Bayer Diagnostics, USA) çalışmışlardır. Plazma örneklerinin elde edilmesinde Li-heparinli tüpler ve EDTA' lı tüpleri kullanmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda serum myoglobin değerleri için; ortanca 79 (ug/L) ve örnekler 24-607 (ug/L) arasındadır. Li-Heparinli plazma myoglobin değerleri için; ortanca 76 (ug/L) ve örnekler 24-588 (ug/L) arasındadır. EDTA' lı plazma myoglobin değerleri için; ortanca 73 (ug/L) ve örnekler 25-601 (ug/L) arasındadır. Serum myoglobin değerleri ile Li-Heparinli

plazma myoglobin değerleri arasında anlamlı fark bulamamışlar ($p=0.0799$), serum myoglobin değerleri ile EDTA' lı plazma myoglobin değerleri arasında anlamlı bir fark bulmuşlar ($p=0.0006$) ve EDTA' lı plazma örneklerinin, serum örneklerine göre %-3.5 daha düşük bulduklarını belirtmişlerdir. Serum cTn-I değerleri için; ortalanca 11.3 (ug/L) ve örnekler 0.4-43.6 (ug/L) arasındadır. Li-Heparinli plazma cTn-I değerleri için; ortalanca 11.7 (ug/L) ve örnekler 0.4-47.7 (ug/L) arasındadır. EDTA' lı plazma cTn-I değerleri için; ortalanca 14.7 (ug/L) ve örnekler 0.5-49.3 (ug/L) arasındadır. Serum cTn-I değerleri ile Li-Heparinli plazma cTn-I değerleri arasında anlamlı fark bulamayıp ($p=0.704$), serum cTn-I değerleri ile EDTA' lı plazma cTn-I değerleri arasında anlamlı bir fark bulmuşlar ($p<0.0001$) ve EDTA' lı plazma örneklerini, serum örneklerinden %30 daha yüksek bulduklarını belirtmişlerdir. Serum CK-MB değerleri için; ortalanca 29 (ug/L) ve örnekler 4-199 (ug/L) arasındadır. Li-Heparinli plazma CK-MB değerleri için; ortalanca 35 (ug/L) ve örnekler 5-252 (ug/L) arasındadır. EDTA' lı plazma CK-MB değerleri için; ortalanca 34 (ug/L) ve örnekler 5-243 (ug/L) arasındadır. Serum CK-MB değerleri ile Li-Heparinli plazma CK-MB değerleri arasında anlamlı bir fark olup ($p<0.0001$), Li-Heparinli plazma CK-MB örneklerini, serum örneklerinden %18.6 daha yüksek bulduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca, serum CK-MB değerleri ile EDTA' lı plazma CK-MB değerleri arasında anlamlı bir fark olup ($p<0.0001$), EDTA' lı plazma örneklerini, serum örneklerine göre %14.6 daha yüksek bulduklarını belirtmişlerdir. Her üç parametre için, EDTA' lı plazma ile serum örnekleri arasında anlamlı fark bulunmasına rağmen, EDTA' lı plazma örnekleri ile serum arasındaki korelasyonları değerlendirdiklerinde, korelasyon katsayılarını yüksek bulmuşlardır ($r>0.99$). Buna bağlı olarak EDTA' lı plazma örneklerinin AMI tanısını değerlendirmek için kullanılabilceğini, fakat farklı tıbbi karar konsantrasyonları kullanılmasını önermişlerdir. Serum ile Li-Heparinli plazma örnekleri arasındaki farklılığın nedenini; farklı antikoagülanlı tüpler veya farklı tip heparin kullanımından dolayı, testlerin analitik varyasyonuna bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (147). Hedberg ve arkadaşları; CK-MB ve cTn-I kardiyak belirteçlerini analiz ederek, plazma ile serum örnekleri arasında fark olup olmadığını incelemişlerdir. AMI tanısı alan 55 hastadan alınan serum ve plazma örnekleri ile cTn-I konsantrasyonlarını ve 79 hastadan alınan serum ve plazma örnekleri ile CK-MB kütle konsantrasyonlarını ölçmüşler, analiz

amaçlı AxSYM cihazını (Abbott Inc, USA) kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre, serum cTn-I örneklerini 0.8-555 (ug/L) arasında ve Li-Heparinli plazma cTn-I örneklerini ise 0.4-468 (ug/L) arasında bulmuşlardır. Li-Heparinli plazma cTn-I örneklerini, serum cTn-I örneklerinden ortalama %15 daha düşük bulduklarını belirtmişlerdir. Serum CK-MB örneklerini 1-495 (ug/L) arasında ve Li-Heparinli plazma CK-MB örneklerini ise 1-525 (ug/L) arasında bulmuşlardır. Li-Heparinli plazma CK-MB örneklerini, serum CK-MB örneklerinden ortalama %17 daha yüksek bulduklarını belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarının, daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğunu belirterek; plazma ile serum değerleri arasındaki farklılığın, CK-MB konsantrasyon düzeyine bağlı olduğunu ve özellikle düşük konsantrasyon aralıklarında bu farkın daha da belirgin olabileceğini vurgulamışlardır (148).

Yaptığımız çalışmada, CK-MB ölçümü üzerine antikoagülanların etkisini incelemek için AKS tanısı alan 10 hasta ve klinik açıdan herhangi bir semptom ve şikayeti olmayan, kardiyak parametreleri normal düzeyde bulunan 10 kişi olmak üzere toplam 20 kişinin her birinden, jelli biyokimya tüplerine (J) ve lityum heparinli (Li. H) tüplere kan örneği alınarak, toplamda 20 adet plazma ve 20 adet serum örneği oluşturduk. Plazma ve serum örneklerini Architect c 8000 Biyokimya cihazı (CK-MB aktivite) ve Architect i 1000 SR Hormon cihazında (CK-MB kütle) çalışarak, her cihaz için ölçülen plazma ve serum değerleri arasında fark olup olmadığını inceledik. Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile yapılan ölçümlere göre normal düzeyde; plazma değerlerini (ortanca; 14 IU/L, ölçülen değer aralığı; 7-20 IU/L), serum değerlerinden (ortanca; 21 IU/L, ölçülen değer aralığı; 12-32 IU/L) anlamlı olarak düşük bulduk ($p=0.0039$), (Tablo-17). Patolojik düzeyde ise; plazma değerlerini (ortanca; 59.5 IU/L, ölçülen değer aralığı; 22-329 IU/L) ve serum değerlerini (ortanca; 68 IU/L, ölçülen değer aralığı; 28-380 IU/L) olarak bulduk. Patolojik düzeyde CK-MB aktivite ölçümlerinde, plazma ile serum değerleri arasında anlamlı bir fark bulmadık ($p=0.0977$), (Tablo-17). Normal ve patolojik düzey olarak gruplama yapmadan, plazma ve serum örneklerini total olarak değerlendirdiğimizde; Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma örneklerini (ortanca; 21.0 IU/L, ölçülen değer aralığı; 7-329 IU/L), serum değerlerinden (ortanca; 30 IU/L, ölçülen değer aralığı; 12-380 IU/L) anlamlı olarak düşük bulduk

($p=0.0006$). Plazma değerlerini, serum değerlerinden %30 daha düşük tespit ettik (Tablo-19). Ayrıca; Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma ile serum örnekleri aralarındaki ilişkiyi korelasyon analizi ile değerlendirdiğimizde, korelasyon katsayısının yüksek bulduk ($r=0.922$) ve aralarında anlamlı bir ilişki tespit ettik ($p<0.0001$), (Tablo-20).

Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile yapılan ölçümlere göre normal düzeyde; plazma değerlerini (ortanca; 0.95 ng/ml, ölçülen değer aralığı; 0.6-1.8 ng/ml), serum değerlerinden (ortanca; 0.8 ng/ml, ölçülen değer aralığı; 0.6-1.4 ng/ml) anlamlı olarak yüksek bulduk ($p=0.0078$), (Tablo-18). Patolojik düzeyde ise; plazma değerlerini (ortanca; 14.7 ng/ml, ölçülen değer aralığı; 2.9-244.5 ng/ml) ve serum değerlerini (ortanca; 13 ng/ml, ölçülen değer aralığı; 2.6-249 ng/ml) olarak bulduk. Patolojik düzeyde CK-MB kütle ölçümlerinde, plazma ile serum arasında anlamlı bir fark bulmadık ($p=0.2324$), (Tablo-18). Normal ve patolojik düzey olarak gruplama yapmadan, plazma ve serum örneklerini total olarak değerlendirdiğimizde; Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma örneklerini (ortanca; 2.3 ng/ml, ölçülen değer aralığı; 0.6-244.5 ng/ml), serum değerlerinden (ortanca; 2 ng/ml, ölçülen değer aralığı; 0.6-249 ng/ml) anlamlı olarak yüksek bulduk ($p=0.0385$). Plazma değerlerinin, serum değerlerinden %15 daha yüksek olduğunu tespit ettik. (Tablo-19). Ayrıca; Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma ile serum örnekleri aralarındaki ilişkiyi korelasyon analizi ile değerlendirdiğimizde, korelasyon katsayısının çok yüksek olduğunu ($r=0.997$) ve aralarında anlamlı bir ilişki olduğunu tespit ettik ($p<0.0001$), (Tablo-20). Architect i 1000 SR cihazında, CK-MB kütle ölçümü için kullanılan Architect STAT CK-MB kit prospektüsünde, plazma örnekleri ile serum örnekleri kıyaslandığında, plazma örneklerinin %18' e kadar daha yüksek çıkabileceği belirtilmiştir. Plazma ile serum örnekleri kullanarak antikoagülanların etkisini araştırdığımız bu çalışmada, elde ettiğimiz bulguların daha önce yapılan çalışmalar ve cihazlara ait kit üreticisinin belirtmiş olduğu bilgiler ile uyduğunu gördük. Sonuç olarak; plazma ile serum değerleri arasındaki farklılığın, önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi CK-MB konsantrasyon düzeyine ve kullanılan heparin ile antikoagülanlı tüplerin çeşitliliğine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; AMI tanısında kullanılan kardiyak belirteçlerden birisi olan CK-MB parametresini ölçen cihazların, analitik performansları ve tanısal yeterlilikleri değerlendirildi. Abbott firmasına ait cihazlardan; immünoinhibisyon yöntemini kullanarak CK-MB aktivitesini ölçen Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile akridinium ester bazlı kemilüminesans yöntemle kütle CK-MB ölçümü yapan Architect i 1000 SR Hormon cihazı kullanıldı.

1. Analitik performans değerlendirilirken, genellikle arzu edilen kesinlik ve doğruluk kriterleri göz önünde bulundurulur. Yaptığımız tekrarlanabilirlik çalışmasında kemilüminesans yöntemi (CK-MB kütle) kullanan Architect i 1000 SR Hormon cihazı; hem normal hem de patolojik düzey CK-MB serum havuzlarında, arzu edilen kesinlik kriterlerini sağlamaktadır. İmmüninhibisyon (CK-MB aktivite) yöntemini kullanan Architect c 8000 Biyokimya cihazı ise; patolojik düzey CK-MB serum havuzunda arzu edilen kesinlik kriterlerini sağlarken, bu durum normal düzey CK-MB serum havuzunda görülmedi. Ancak; CK-MB aktivite ölçümü için, minimum kesinlik kriterine göre ($CV_A < 0.75 \times CV_I$) %14.7' den daha düşük bulundu. Elde edilen bulgulara göre kesinlik açısından cihazların tekrarlanabilirlik performansının yeterli olduğu ve daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu düşünüldü.

2. Oransal sistematik hatayı tespit etmek için yapmış olduğumuz geri kazanım çalışmasında; Architect c 8000 Biyokimya cihazı için elde edilen %bias, normal düzeyde (23.7 IU/L) %7.1 ve patolojik düzeyde (113 IU/L) %7.1 olarak bulundu. Normal düzey ve Patolojik düzey için hesaplanan %Bias (%7.1) değerlerinin, izin verilen %Bias (%7.8) değerinden daha düşük olduğu görüldü. Elde

edilen bulgulara göre Architect c 8000 Biyokimya cihazının, CK-MB aktivitesinin, hem normal hem de patolojik düzeylerde doğru olarak ölçüldüğü düşünöldü. Architect i 1000 SR Hormon cihazı için elde edilen %bias, normal düzeyde (5.67 ng/ml) %9.2 ve patolojik düzeyde (62.55 ng/ml) %5.9 bulundu. Normal düzey ve Patolojik düzey için hesaplanan %bias (%9.2, %5.9) değerlerinin, izin verilen %bias (%16) değerinden daha düşük olduğu göröldü. Bu sonuçlara göre Architect i 1000 SR Hormon cihazının, CK-MB kütle ölçümünün, hem normal hem de patolojik düzeylerde doğru olarak ölçüldüğü düşünöldü.

3. Sabit sistematik hatayı tespit etmek için yapmış olduğumuz interferans deneyinde; CK-MB Aktivite ölçümü yapan Architect c 8000 Biyokimya cihazının, normal ve patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, yüksek Hb konsantrasyonlarından etkilendiği ve Hb konsantrasyonu yaklaşık 2 g/dl olan 1. tüpe ait CK-MB aktivite değerlerinin cihaz tarafından ölçülemediği tespit edildi. Bu yüzden serum havuzu A olarak etiketlenen 1. tüpe ait %Bias hesaplanamadı. Hemoglobinin interferans etkisinin düşük konsantrasyonlarda başladığı ve giderek arttığı tespit edildi. Normal serum havuzundan hazırlanan serum örneklerinde yaklaşık olarak 19 mg/dl Hb konsantrasyonlarında, patolojik düzey için ise yaklaşık olarak 63 mg/dl Hb konsantrasyonlarında, izin verilen % biasın aşıldığı tespit edildi. CK-MB Kütle ölçümü yapan Architect i 1000 SR Hormon cihazının, normal ve patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, her iki düzeyde de interferans etkisi görölmedi. Normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde görölen en yüksek %bias (%-5.8) ve patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde görölen en yüksek %bias ise (%-5.9) olarak bulundu. Artan Hb konsantrasyonlarında ölçölen CK-MB değerleri ile hemolizin interferans etkisini değerlendirmek için her iki cihazda, normal ve patolojik serum havuzlarından hazırlanan örneklerde korelasyon analizi yapıldı. CK-MB Aktivite ölçümü yapan Architect c 8000 Biyokimya cihazında; normal düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçölen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısı ($r=0.996$) ve anlamlılık düzeyi ($p<0.0001$) olarak bulundu. Patolojik düzey serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, ölçölen CK-MB değerleri ile Hb konsantrasyonları arasındaki ilişkide, korelasyon katsayısı ($r=0.999$) ve anlamlılık

düzeıy (p<0.0001) olarak bulundu. CK-MB Kütıe ölçümü yapan Architect i 1000 SR Hormon cihazında; normal düzeıy serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde, artan Hb konsantrasyonları ile ölçülen CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki görülmadı (p=0.27). Patolojik düzeıy serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde ise; artan Hb konsantrasyonları ile ölçülen CK-MB değerleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulundu (r=-0.754, p=0.007). Elde edilen bu bulgulara göre; artan Hb konsantrasyonlarına paralel olarak, CK-MB aktivite değerlerinin pozitif yönde arttığı ve hemolizin interferans etkisinden etkilendiği düşünöldü. CK-MB kütıe değerlerinin ise, artan Hb konsantrasyonlarından etkilenmediği göröldü. Patolojik düzeıy serum havuzlarından hazırlanan hemolizat örneklerinde ise; artan Hb konsantrasyonları ile CK-MB kütıe ölçüm değerleri arasında görölen negatif yöndeki korelasyonun, yaklaşık olarak 500 mg/dl üzerindeki Hb konsantrasyonlarına ait tüplerden kaynaklandığı düşünöldü. Yapmış olduğumuz interferans çalışmasından elde ettiğimiz sonuçların, daha önce yapılan çalışmalar ve her iki cihaza ait kit prospektüsünde belirtilen bilgiler ile uyuştuğu göröldü.

4. CK-MB aktivite ölçüm yöntemi ile CK-MB kütıe ölçüm yönteminin karşılaştırılması için yaptığımız yöntem karşılaştırma deneyinde; korelasyon katsayısı (r=0.976) olarak bulundu. Her iki ölçüm yöntemi arasındaki ilişkinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (p<0.0001). Lineer regresyon analizine göre elde edilen denklem; $y = 2.1x + 22.8$ olarak bulundu. Regresyon denklemine ait belirtme katsayısı ise $R^2 = 0.953$ olarak tespit edildi. CK-MB kütıe (ng/ml) ölçüm yöntemi ile CK-MB aktivite (IU/L) ölçüm yöntemlerine ait birimler farklı olduğu için yöntemler arasındaki uyum, lineer regresyon denklemine göre değerlendirilemedi. Her iki cihazdaki ölçüm sonuçlarına göre elde edilen değerler, Passing-Bablok (P-B) regresyon analizi uygulanarak değerlendirildi. P-B regresyon analizi sonucu elde edilen denklem; $y = 0.977x + 0.86$ olarak tespit edildi. Regresyon denklemine ait; eğim (b; slope), % 95 güven aralığında (0.87 – 1.13) olarak ve kesişim (a; intercept) % 95 güven aralığında (-3,93 - 3,29) olarak tespit edildi. Regresyon doğrusuna ait doğrusallığın değerlendirilmesi amaçlı uygulanan CUSUM testinde, doğrusallıktan sapma görölmadı (p=0.53). Ölçüm yöntemlerine ait birimler farklı olduğu için verilerin standardize edilmesi amaçlı; lineer regresyon

denkleminde ($y = 2.1x + 22.8$) faydalanarak, her bir x (referans yöntem; CK-MB kütle) değeri için olması gereken y' (test yöntemi; CK-MB aktivite) değeri hesaplandı. Hesaplama sonucu elde edilen sonuçlar (y') ile CK-MB aktivite yöntemini kullanan Architect c 8000 biyokimya cihazının ölçtüğü gerçek değerler (y) arasındaki farklılık, varyansların farklılığı açısından F-testi uygulanarak değerlendirildi. F-testi sonucuna göre; varyansların oranı: 1.04 olarak bulundu ve varyanslar arasında farklılık olmadığı tespit edildi ($p=0.88$). Hesaplanan değerler ile ölçülen değerlerin meydanları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0.63$). Yöntemler arasındaki uyumu değerlendirmek için yapılan Bland-Altman (ortalamalar-farklar) grafiğine göre; hesaplanan değerler ile ölçülen değerlere ait farkların ortalaması 0.008 (-5.65 ile 5.67 arasında), standart sapması 17.7 olarak bulundu ve ölçüm yöntemlerinin birbirleri ile uyumlu olduğu düşünüldü.

5. CK-MB aktivite ölçüm yöntemi ile CK-MB kütle ölçüm yöntemlerinin tanısal açıdan değerlendirilmesi için, her iki cihazdan elde edilen ölçüm sonuçlarının duyarlılıkları (*sensitivite*) ve özgüllükleri (*spesifisite*) tespit edildi. Bu değerlerden faydalanılarak, her iki cihaza ait ROC eğrileri oluşturuldu ve eğri altında kalan alanlar belirlendi. Architect c 8000 Biyokimya cihazına ait sensitivite değeri %90 ve spesifisite değeri %90 olarak bulundu. Eğri altında kalan alan (AUC) ise 0.939 olarak tespit edildi. Architect i 1000 SR Hormon cihazına ait sensitivite değeri %95 ve spesifisite değeri %95 olarak bulundu. Eğri altında kalan alan (AUC) ise 0.980 olarak tespit edildi. Her iki cihaza ait, eğri altında kalan alanlar (AUC) karşılaştırıldığında, yöntemler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p=0.118$). Bu sonuçlara göre her iki cihazın klinik performanslarının birbirine yakın olduğu ve tanısal açıdan yeterli oldukları düşünüldü.

6. CK-MB ölçümü üzerine antikoagülanların etkisini incelemek için AKS tanısı alan 10 hasta ve klinik açıdan herhangi bir semptom ve şikayeti olmayan, kardiyak parametreleri normal düzeyde bulunan 10 kişi olmak üzere toplam 20 kişinin her birinden, jelli biyokimya tüplerine (J) ve lityum heparinli (Li. H) tüplere kan örneği alınarak, 20 adet plazma ve 20 adet serum örneği oluşturuldu. Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile yapılan ölçümlere göre normal düzeyde; plazma değerleri, serum değerlerinden anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.0039$). Patolojik düzeyde

ise; CK-MB aktivite ölçümlerinde, plazma ile serum arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p=0.0977$). Normal ve patolojik düzey olarak gruplama yapmadan, plazma ve serum örneklerini total olarak değerlendirdiğimizde; Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma örnekleri, serum değerlerinden anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.0006$). Plazma değerlerinin, serum değerlerinden %30 daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca; Architect c 8000 Biyokimya cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma ile serum örnekleri aralarındaki ilişkiyi korelasyon analizi ile değerlendirdiğimizde, korelasyon katsayısının yüksek olduğu ($r=0.922$) ve aralarında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile yapılan ölçümlere göre normal düzeyde; plazma değerleri, serum değerlerinden anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0078$). Patolojik düzeyde ise; CK-MB kütle ölçümlerinde, plazma ile serum arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0.2324$). Normal ve patolojik düzey olarak gruplama yapmadan, plazma ve serum örneklerini total olarak değerlendirdiğimizde; Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma örnekleri, serum değerlerinden anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0385$). Plazma değerlerinin, serum değerlerinden %15 daha yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca; Architect i 1000 SR Hormon cihazı ile ölçülen Li-Heparinli plazma ile serum örnekleri aralarındaki ilişkiyi korelasyon analizi ile değerlendirdiğimizde, korelasyon katsayısının çok yüksek olduğu ($r=0.997$) ve aralarında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Plazma ile serum örnekleri kullanarak antikoagülanların etkisini araştırdığımız bu çalışmada, elde ettiğimiz bulguların daha önce yapılan çalışmalar ve cihazlara ait kit üreticisinin belirtmiş olduğu bilgiler ile uyduğu görüldü. Sonuç olarak; plazma ile serum değerleri arasındaki farklılığın, önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi CK-MB konsantrasyon düzeyine, kullanılan heparin ve antikoagülanlı tüplerin çeşitliliğine bağlı olabileceği düşünüldü.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; akut miyokard infarktüsü tanısında kullanılan ve tanı açısından önemli bir enzim olan, CK-MB izoenziminin ölçümünde kullanılan farklı yöntemleri doğruluk, kesinlik, güvenilirlik ve maliyet yönünden karşılaştırmayı amaçladık. Referans yöntem olan immünoassay metod (CK-MB kütle ölçümü, Architect i 1000 SR cihazı) ile test edilen yöntem olan immünoinhibisyon metodun (CK-MB aktivite ölçümü, Architect c 8000 cihazı) analitik açıdan

performanslarını değerlendirdiğimizde, yöntemlerin kesinlik ve doğruluklarının yeterli olduğunu düşündük. Ayrıca her iki yöntemi, kendi aralarında analitik ve tanısal açıdan karşılaştırdığımızda, cihazlardan elde edilen değerlerin birbirleri ile uyumlu olduğunu düşündük.

Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK) tarafından düzenlenen ve belirli aralıklar ile güncellenen Sağlık Uygulama Tebliği (SUT)' nde belirtilen bu iki yöntemin fiyat farkları göz önünde bulundurulduğunda, ekonomik açıdan uygun olan immünoinhibisyon metodun, referans yöntem olan immünoassay metodun yerine alternatif olabileceğini düşündük. Ancak, immünoinhibisyon ölçüm yönteminin interferan ajanlardan daha kolay etkilendiği ve akut miyokard infarktüsü tanısının hayati öneme sahip olduğu göz önünde bulundurulursa, Ulusal Klinik Biyokimya Akademisi (*UKBA, National Academy of Clinical Biochemistry*) kılavuzlarında belirtildiği üzere, miyokard infarktüsünde tanısal amaçlı gold standart olan cTn ile birlikte CK-MB ölçümü yapılması gerekmektedir. cTn ile CK-MB kütle ölçümünün mevcut olmadığı durumlarda, total CK ve CK-MB aktivite ölçümleri kullanılabilir. Fakat sonucu teyit etmek için CK-MB/total CK oranını kullanmak gerekir.

Ekonomik açıdan uygun olan yöntem mi? Yoksa pahalı ama güvenilir sonuç mu? Bu karmaşık sorunun önüne geçmek için bir laboratuvar uzmanının asıl hedefi; her laboratuvarın farklı koşullara sahip olduğunu göz önünde bulundurarak, doğru ve güvenilir olan, ayrıca ekonomik açıdan uygun yöntemi seçerek, olabildiğince çabuk sonuç vermek olmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Chatterjee K. Thrombolysis in acute myocardial infarction. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1986;21(4):117-24.
2. DeWood M, Spores J. Prevalance of Total Coronary Occlusion During the Early Hour of Transmural Myocardial Infarction. *N-Engl J Med*. 1980;303:897-902.
3. Lee T, Rouan G, Weisberg M, Brand D, Cook E, Acampora D, et al. Sensitivity of routine clinical criteria for diagnosing myocardial infarction within 24 hours of hospitalization. *Ann Intern Med*. 1987;106(2):181-6.
4. Kwong T, Fitzpatrick P, Rothbard R. Activities of some enzymes in serum after therapy with intracoronary streptokinase in acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 1984;30(5):731-4.
5. Puleo P, Guadagno P, Roberts R, Scheel M, Marian A, Churchill D, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for subforms of creatine kinase-MB. *Circulation*. 1990;82(3):759-64.
6. Turi ZG, Rutherford JD, Roberts R, Muller JE, Jaffe AS, Rude RE, et al. Electrocardiographic, enzymatic and scintigraphic criteria of acute myocardial infarction as determined from study of 726 patients (A MILIS Study). *Am J Cardiol*. 1985;55(1):1463-8.
7. Donnelly R, Hillis WS. Cardiac troponin T. *Lancet*. 1993;341(8842):410-1.

8. Drexel H, Dworzak E, Kirchmair W, Milz MM, Puschendorf B, Dienstl F. Myoglobinemia in the early phase of acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1983;105(4):642-51.
9. Schwane JA, Buckley RT, Dipaolo DP, Atkinson MA, Shepherd JR. Plasma creatine kinase responses of 18- to 30-yr-old African-American men to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(2):370-8.
10. Gillum RF, Fortmann SP, Prineas RJ, Kottke TE. International diagnostic criteria for acute myocardial infarction and acute stroke. *Am Heart J*. 1984;108(1):150-8.
11. Lott JA, Stang JM. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. *Clin Chem*. 1980;26(9):1241-50.
12. Henderson AR, Donald WM. Enzimler. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*. 5th ed: Palme Yayıncılık; 2005. p. 352-89.
13. Panteghini M, Bais R. Serum Ezymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2012. p. 565-98.
14. Falk E, Fuster V. Aterogenez ve Belirleyicileri. *Hurst's The Heart*. 2002:1065-83.
15. Liu JL, Maniadakis N, Gray A, Rayner M. The economic burden of coronary heart disease in the UK. *Heart*. 2002;88(6):597-603.
16. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
17. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined-- a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(3):959-69.
18. Alhadi HA, Fox KA. Do we need additional markers of myocyte necrosis: the potential value of heart fatty-acid-binding protein. *Qjm*. 2004;97(4):187-98.

19. Vallance PJ, Webb DJ. Vascular Endothelium in Human Physiology and Pathophysiology: Taylor & Francis; 2004.
20. Ellis AK. Serum protein measurements and the diagnosis of acute myocardial infarction. *Circulation*. 1991;83(3):1107-9.
21. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R, Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem*. 1999;45(7):1104-21.
22. Antman E, Braunwald E. Acute Myocardial Infarction. In: Braunwald E, Zipes D, Libby P, editors. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p. 1131-5.
23. Gibler WB, Lewis LM, Erb RE, Makens PK, Kaplan BC, Vaughn RH, et al. Early detection of acute myocardial infarction in patients presenting with chest pain and nondiagnostic ECGs: serial CK-MB sampling in the emergency department. *Ann Emerg Med*. 1990;19(12):1359-66.
24. Wallach J. Kardiyovasküler Hastalıklar. In: Wallach J, editor. *Tanıda Laboratuvar Testleri*. 7th ed. İstanbul: Yüce Yayınları; 2003. p. 113-32.
25. GÖK H. *Klinik Kardiyoloji: Nobel Kitabevi*; 1996.
26. Moss DW, Henderson AR. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd ed: W.B. Saunders Company; 1994. p. 735-896.
27. Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation*. 1993;88(2):750-63.
28. Owen A. Tracking the rise and fall of cardiac enzymes. *Nursing*. 1995;25(5):34-8.
29. Porela P, Helenius H, Pulkki K, Peltola O, Hanninen K, Pettersson K, et al. Cardiac decompensation during an ischemic event weakens the predictive power of myocardial injury markers. *Clin Chim Acta*. 2000;302(1-2):133-44.

30. Wu AHB. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. 4th ed: Saunders/Elsevier; 2006.
31. Amelink GJ, van der Wal WA, Wokke JH, van Asbeck BS, Bar PR. Exercise-induced muscle damage in the rat: the effect of vitamin E deficiency. *Pflugers Arch*. 1991;419(3-4):304-9.
32. Bompa TO. *Periodization Training: Theory and Methodology*. 4th ed. Orlando: Human Kinetics; 1999.
33. Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(4):429-35.
34. Tsung SH. Creatine kinase isoenzyme patterns in human tissue obtained at surgery. *Clin Chem*. 1976;22(2):173-5.
35. Apple FS. Acute myocardial infarction and coronary reperfusion. Serum cardiac markers for the 1990s. *Am J Clin Pathol*. 1992;97(2):217-26.
36. Wallach J. Temel Kan İncelemeleri: Hastalıkta Değişiklikler. In: Wallach J, editor. *Tanıda Laboratuvar Testleri*. 7th ed. İstanbul: Yüce Yayınları; 2003. p. 35-86.
37. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper' in *Biyokimyası*. 24th ed. İstanbul: Barış Kitabevi; 1998.
38. Chapelle JP, Heusghem C. Further heterogeneity demonstrated for serum creatine kinase isoenzyme MM. *Clin Chem*. 1980;26(3):457-62.
39. Perryman MB, Knell JD, Roberts R. Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma. *Clin Chem*. 1984;30(5):662-4.
40. Wu AH, Gornet TG, Harker CC, Chen HL. Role of rapid immunoassays for urgent ("stat") determinations of creatine kinase isoenzyme MB. *Clin Chem*. 1989;35(8):1752-6.

41. Bell RD, Rosenberg RN, Ting R, Mukherjee A, Stone MJ, Willerson JT. Creatine kinase BB isoenzyme levels by radioimmunoassay in patients with neurological disease. *Ann Neurol.* 1978;3(1):52-9.
42. Hans P, Born JD, Chapelle JP, Milbouw G. Creatine kinase isoenzymes in severe head injury. *J Neurosurg.* 1983;58(5):689-92.
43. Phillips JP, Jones HM, Hitchcock R, Adama N, Thompson RJ. Radioimmunoassay of serum creatine kinase BB as index of brain damage after head injury. *Br Med J.* 1980;281(6243):777-9.
44. Pettersson T, Weber TH, K. O. Creatine kinase isoenzyme BB as a tumor marker in pleural effusions. *Clin Chem.* 1981;27(6):1147-8.
45. Wevers RA, Mul-Steinbusch MW, Soons JB. Mitochondrial CK (EC 2.7.3.2) in the human heart. *Clin Chim Acta.* 1980;101(1):103-11.
46. Mifflin TE, Bruns DE, Wrotnoski U, MacMillan RH, Stallings RG, Felder RA, et al. University of Virginia case conference. Macroamylase, macro creatine kinase, and other macroenzymes. *Clin Chem.* 1985;31(10):1743-8.
47. Lee KN, Csako G, Bernhardt P, Elin RJ. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin Chem.* 1994;40(7 Pt 1):1278-83.
48. Sturk A, Sanders GT. Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1990;28(2):65-81.
49. Gibler WB, Gibler CD, Weinshenker E, Abbottsmith C, Hedges JR, Barsan WG, et al. Myoglobin as an early indicator of acute myocardial infarction. *Ann Emerg Med.* 1987;16(8):851-6.
50. Plebani M, Zaninotto M. Diagnostic strategies in myocardial infarction using myoglobin measurement. *Eur Heart J.* 1998 Nov;19:12-5.
51. Habif S. Kardiyak Troponinler. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2003;23(1):74-80.

52. Hazar S. Egzersize Bağlı İskelet ve Kalp Kası Hasarı. *Spor metre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*. 2004;2(3):119-26.
53. Green GB, Li DJ, Bessman ES, Cox JL, Kelen GD, Chan DW. The prognostic significance of troponin I and troponin T. *Acad Emerg Med*. 1998;5(8):758-67.
54. Black HR, Quallich H, Gareleck CB. Racial differences in serum creatine kinase levels. *Am J Med*. 1986;81(3):479-87.
55. Apple FS, Goetze JP. Cardiac Function. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2012. p. 1457-522.
56. Cummins P, Young A, Auckland ML, Michie CA, Stone PC, Shepstone BJ. Comparison of serum cardiac specific troponin-I with creatine kinase, creatine kinase-MB isoenzyme, tropomyosin, myoglobin and C-reactive protein release in marathon runners: cardiac or skeletal muscle trauma? *Eur J Clin Invest*. 1987;17(4):317-24.
57. Macrae AR, P.A. K, Lustig V, Bharqava R, Vandersluis R, Palomaki GE, et al. Assessing the requirement for the 6-hour interval between specimens in the American Heart Association Classification of Myocardial Infarction in Epidemiology and Clinical Research Studies. *Clin Chem*. 2006;52(5):812-8.
58. Szasz G, Gerhardt W, Gruber W. Creatine kinase in serum: 3. Further study of adenylate kinase inhibitors. *Clin Chem*. 1977;23(10):1888-92.
59. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Féraud G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(6):635-42.
60. Schumann G, Klauke R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects. *Clin Chim Acta*. 2003;327(1-2):69-79.

61. McClatchey KD. Clinical Laboratory Medicine, 2e: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
62. Wu A, Bowers GN. Evaluation and comparison of immunoinhibition and immunoprecipitation methods for differentiating MB and BB from macro forms of creatine kinase isoenzymes in patients and healthy individuals. Clin Chem. 1982;28(10):2017-21.
63. Wicks R, Usategui-Gomez M, Miller M, Warshaw M. Immunochemical determination of CK-MB isoenzyme in human serum. II. An enzymic approach. Clin Chem. 1982;28(1):54-8.
64. Panteghini M. Diagnostic application of CK-MB mass determination. Clin Chim Acta. 1998;272(1):23-31.
65. Uras F. Yöntem Seçimi Ve Standardizasyonu. In: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ, editors. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. İstanbul: Mart Matbaacılık Hizmetleri A.Ş.; 2000. p. 72-81.
66. Aslan D. Ölçüm Yöntemlerinin Değerlendirilmesi. In: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ, editors. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. İstanbul: Mart Matbaacılık Hizmetleri A.Ş.; 2000. p. 82-105.
67. Arı Z, Aytakin M, Yiğitoğlu MR, Uyanık BS, Yar B. Total CK Ve CK-MB Ölçümlerinde Kullanılan Farklı Yöntemlerin Analitik Performansının Karşılaştırılması. İbni Sina Tıp Dergisi. 2002;7:171-6.
68. Bekiroğlu N, Günel P, Aksu B. Deneye Dayalı Çalışmalarda Bazı İstatistiksel Kavramlar. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2009;29(4):997-1006.
69. Yücel D. Niçin Metod Validasyonu? In: Akın KO, Öğüş İH, Serdar MA, Şeneş M, Tokgöz S, Yücel D, editors. Bilgisayar Uygulamalı Yöntem Geçerliliğini Kanıtlama (Metod Validasyonu) Kurs Kitabı. Eskişehir: Türk Biyokimya Deneği; 2010. p. 1-5.
70. İnal BB, Topkaya Ç. Klinik Biyokimya Laboratuvarlarında Akreditasyona Geçiş. İstanbul Tıp Dergisi. 2010;2:74-6.

71. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. United Kingdom: LGC (Teddington) Ltd; 1998.
72. International Organization for Standardization (ISO). International vocabulary of metrology: basic and general concepts and associated terms (VIM). Geneva: ISO; 2007.
73. Dybkaer R. Vocabulary for use in measurement procedures and description of reference materials in laboratory medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35(2):141-73.
74. CLSI. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. CLSI document EP09-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1995.
75. Koch DD, Peters T. Yöntemlerin Değerlendirilmesi-İstatiksel Tekniklere Giriş. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*. 5th ed: Palme Yayıncılık; 2005. p. 234-50.
76. Westgard JO, Carey RN, Wold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clin Chem.* 1974;20(7):825-33.
77. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. *Biyostatistik*. 10th ed. Ankara: Hatiboğlu Yayınları; 2002.
78. Bluman AG. *Elementary Statistics: A Step by Step Approach, A Brief Version*. 5th ed. New York: McGraw Hill; 2004.
79. Buttner J, Borth R, Boutwell JH. (IFCC Committee on Standards): Provisional recommendations on quality control in clinical chemistry: general principles and terminology. *Clin Chem.* 1976;22:532-9.
80. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem.* 1994;40(11 Pt 1):1996-2005.
81. Green JM. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem.* 1996;68(9):305A-9A.

82. Fraser CG. Quality specifications in laboratory medicine. *Clin Biochem Revs.* 1996;17:109-14.
83. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):758-64.
84. Ricós C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N, Jiménez CV, et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scand J Lab Invest.* 2004;64(3):175-84.
85. Petersen P. Making the most of a patient's laboratory data: optimisation of signal-to-noise ratio. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(4):91-6.
86. Lazarim FL, Antunes-Neto JM, da Silva FO, Nunes LA, Bassini-Cameron A, Cameron LC, et al. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *J Sci Med Sport.* 2009;12(1):85-90.
87. Banfi G, Dolci A. Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology. *J Sports Med Phys Fitness.* 2003;43(2):223-30.
88. Fraser CG. Changes in the serial results. In: Fraser CG, editor. *Biological variation: from principles to practice.* Washington DC: AACC Press; 2001. p. 67-90.
89. Westgard JO. Design of internal quality control for reference value studies. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):863-7.
90. Fraser CG, Petersen PH. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem.* 1999;45(3):321-3.
91. Fraser CG. Changes in the serial results. In: Fraser CG, editor. *Biological variation: from principles to practice.* Washington DC.: AACC Press; 2001. p. 50-4, 133-41.

92. Karkalousos P, Evangelopoulos A. Quality Control in Clinical Laboratories. In: Ivanov O, editor. Applications and Experiences of Quality Control. 1th ed: In Tech; 2011. p. 331-60.
93. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Lab Invest. 1999;59(7):491-500.
94. Ricós C, García-Lario JV, Alvarez V, Cava F, Domenech MV, Hernández A. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2012 update:<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
95. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. 3. Physiological and medical implications. Clin Chem. 1970;16(12):1028-32.
96. Gowans EM, Petersen PH, Blaabjerg O, Hørder M. Analytical goals for the acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. Scand J Clin Lab Invest. 1988;48(8):757-64.
97. CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices: Approved Guideline. CLSI document EP05-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
98. CLSI. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. CLSI document EP06-A. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
99. CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP7-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
100. CLSI. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP9-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.

101. Linnet K, Boyd JC. Selection and Analytical Evaluation of Methods -With Statistical Techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th ed. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2012. p. 7-47.
102. Saraçlı S, Doğan İ, Doğan N. Medikal Metod Karşılaştırma Çalışmalarında Deming Regresyon Tekniği. *Türkiye Klinikleri J Biostat.* 2009;1(1):9-15.
103. Westgard JO, Hunt MR. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin Chem.* 1973;19(1):49-57.
104. Cornbleet PJ, Gochman N. Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis. *Clin Chem.* 1979;25(3):432-8.
105. Linnet K. Performance of Deming regression analysis in case of misspecified analytical error ratio in method comparison studies. *Clin Chem.* 1998;44(5):1024-31.
106. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983;21(11):709-20.
107. Saraçlı S, Çelik HE. Performance of Ols-Bisector Regression in Method comparison studies. *World Appl Sci J.* 2011;12(10):1860-5.
108. Magari RT. Statistics for laboratory method comparison studies. *BioPharm.* 2002;38:28-32.
109. Payne R. Method comparison: evaluation of least squares, Deming and Passing/Bablok regression procedures using computer simulation. *Ann Clin Biochem.* 1997;34(Pt 3):319-20.
110. Triboli K. The Grind about Sonicated Chlorophyll (or: Did a Method Change in 1998 Affect EMP Chlorophyll Results?). *IEP Newsletter.* 2003;Sect. 13-24.
111. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1(8476):307-10.

112. Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet*. 1995;346(8982):1085-7.
113. Bland JM, Altman DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003;22(1):85-93.
114. Martin CB, Shaw AD, Gal J, Aravindan N, Murphy F, Royston D, et al. The comparison and validity of troponin I assay systems in diagnosing myocardial ischemic injury after surgical coronary revascularization. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2005;19(3):288-93.
115. Güner G. Tanısal Yeterlilik Testleri. In: Tağa Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ, editors. *Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi*. İstanbul: Mart Matbaacılık Hizmetleri A.Ş; 2000. p. 106-23.
116. Uebersax JS. Modeling approaches for the analysis of observer agreement. *Invest Radiol*. 1992;27(9):738-43.
117. Dirican A. Evaluation of the diagnostic test's performance and their comparisons. *Cerrahpaşa J Med*. 2001;32:25-30.
118. Kanık EA, Erden S. Tanı testlerinin değerlendirilmesinde ROC (Receive Operating Characteristics) eğrisinin kullanımı. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2003;3:260-4.
119. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988;44(3):837-45.
120. McClish DK. Analyzing a portion of the ROC curve. *Med Decis Making*. 1989;9(3):190-5.
121. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*. 1983;148(3):839-43.

122. Tomak L, Bek Y. İşlem karakteristik eğrisi analizi ve eğri altında kalan alanların karşılaştırılması. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2010;27(2):58-65.
123. Panteghini M. The new definition of myocardial infarction and the impact of troponin determination on clinical practice. *Int J Cardiol*. 2006;106(3):298-306.
124. Panteghini M. Creatine Kinase Isoenzymes. In: Hickman PE, Koerbin G, editors. *Methods in Clinical Chemistry, Kaplan and Pesce's : Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation**. 5th ed: Pesce-Kaplan Publishers; 2009. p. 436-9.
125. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem*. 2007;53(4):552-74.
126. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AH, Christenson RH, Cannon CP, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem*. 2007;53(4):547-51.
127. Fleming JJ, Janardhan HP, Jose A, Selvakumar R. Anomalous Activity Measurements of Creatine (Phospho) Kinase, CK-MB Isoenzyme in Indian Patients in the Diagnosis of Acute Coronary Syndrome. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26(1):32-40.
128. De Keijzer MH, Perkins S, Motta V, Morelli D, Cristol JP, Dupuy AM, et al. Multi-site, multi-country evaluation of analytical and operational performance of a low-mid volume chemiluminescent immunoassay analyzer. *Clin Lab*. 2009;55(9-10):363-70.
129. Delanghe JR, De Mol AM, De Buyzere ML, De Scheerder IK, Wleme RJ. Mass Concentration and Activity Concentration of Creatine Kinase Isoenzyme MB Compared in Serum after Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem*. 1990;36(1):149-53.
130. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1986;24(2):127-39.

131. Orhan N, Yıldırım HA, Yüksel H, Yavuz Ö, Memişoğulları R. Troponin I Ölçümünde Hemolizin İmmünoassay Sisteminin Analitik Performansına Etkisi. Türk Klinik Biyokimya Derg. 2010;8(1):1-7.

132. Özcan O, Karakaş A, Yücel D. Serum CK ve CK-MB aktiviteleri ile CK-MB kütle, troponin ve miyogloblin ölçümleri üzerine hemolizin etkisi. Türk Biyokimya Dergisi. 2012;37(4):375-85.

133. Yücel M, Tokalak İ, Kulaksızoğlu S, Arat Z. CK-MB activity and hemolysis: Where the interference begins? Türk Biyokimya Dergisi. 2005;30(3):216-9.

134. Altman DG, Bland JM. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. The Statistician. 1983;32:307-17.

135. Genç Y, Sertkaya D, Demirtaş S. Klinik Araştırmalarda İki Ölçüm Tekniğinin Uyumunu İncelemede Kullanılan İstatistiksel Yöntemler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2003;56(1):1-6.

136. Küçükercan İ, Çakır Ö, Tokdemir G, Baloğlu G, Orçun A. Akut Miyokard Enfarktüsü Ve Sağlıklı Olgularda CK-MB Aktivite Ve Kütle Ölçümü Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi. 2003;14(1):27-9.

137. Michelutti L, Falter H, Certossi S, Marcotte B, Mazzuchin A. Isolation and purification of creatine kinase conversion factor from human serum and its identification as carboxypeptidase N. Clin Biochem. 1987;20(1):21-9.

138. Panteghini M, Pagani F. Comparison of catalytic activity and mass concentration of serum creatine kinase MB isoenzyme in the detection of coronary reperfusion in acute myocardial infarction after therapeutic thrombolysis. J Clin Chem Clin Biochem. 1988;26(5):277-80.

139. Akağaç Etem A, Önalın Etem E, Türkmen Yıldırım S, Ulutaş GŞ, Ünal S. CK-MB Kütle ve Aktivite Ölçüm Yöntemlerinin Akut Miyokard Enfarktüsü ve Sağlıklı Gruplarda Karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Derg. 2011;9(2):53-9.

140. Serdar MA, Tapan S, Türkmen Y, Onur İ, Yaman H, Tokgöz S, et al. İmmünoinhibisyon Kreatin Kinaz MB Aktivite Ölçümünün Yanlış Değerlendirilmesi: Tip I ve Tip II Makro CK Ve CK-BB. Türk Biyokimya Dergisi. 2000;25(1):5-10.

141. Gerhardt W, Ljungdahl L. Detection of myocardial damage by serial measurements of cardiac troponin T, CK MBmass, and TROPT rapid test. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997;11(1):227-40.
142. Hetland O, Dickstein K. Cardiac markers in the early hours of acute myocardial infarction: clinical performance of creatine kinase, creatine kinase MB isoenzyme (activity and mass concentration), creatine kinase MM and MB subform ratios, myoglobin and cardiac troponin T. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996;56(8):701-13.
143. Hawkins RC, Tan HL. Comparison of the diagnostic utility of CK, CK-MB (activity and mass), troponin T and troponin I in patients with suspected acute myocardial infarction. *Singapore Med J.* 1999;40(11):680-4.
144. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem.* 1999;45(7):1104-21.
145. Panteghini M. The measurement of cardiac markers: where should we focus? *Am J Clin Pathol.* 2002;118(3):354-61.
146. Stiegler H, Fischer Y, Vazquez-Jimenez JF, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, et al. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem.* 2000;46(9):1338-44.
147. Pagani F, Bonetti G, Stefani F, Cuccia C, Panteghini M. Serum and plasma samples for ACS:systems cardiac markers. *Clin Chem.* 2000;46(7):1020-2.
148. Hedberg P, Melkko T, Valkama J, Puukka M. Higher CK-MB mass values in heparin plasma than in serum measured with the Abbott AxSYM system. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(9):872-4.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Burak GÜRPINAR, 1982 yılında Tokat' ın Turhal ilçesinde doğdu. 2000 yılında Turhal Anadolu Lisesi'ni, 2007 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi' ni bitirdi. 2007-2009 yılları arasında Artova Devlet Hastanesi Acil Polikliniği' nde görev yaptı. 2009 yılında araştırma görevlisi olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda çalışmaya başladı ve 2013 yılında uzmanlık eğitimini tamamladı.