



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**17-HİDROKSİPROGESTERON ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY
VE SIVI KROMOTOGRAFI- KÜTLE SPEKTROMETRİ
(LC-MS/MS) METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Fikret AKYÜREK

TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2014



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**17-HİDROKSİPROGESTERON ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY
VE SIVI KROMOTOGRAFI- KÜTLE SPEKTROMETRİ
(LC-MS/MS) METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Fikret AKYÜREK

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ**

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

17-HİDROKSİPROGESTERON ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY VE SIVI
KROMOTOGRAFİ- KÜTLE SPEKTROMETRİ (LC-MS/MS) METODLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Fikret AKYÜREK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12102009 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na

Fikret Akyürek tarafından savunulan bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ali ÜNLÜ Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK Selçuk Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Yönetmeliği'nin İlgili maddeleri uyarınca; yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim KuruluTarih veSayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Oktay SARI
Dekan

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince gerek bilgisi, gerek tecrübesi, gerek iş ve eğitim disiplini, gerek hoşgörüsü, vizyonu ve saygınlığı ile örnek aldığım, bilgi birikimini ve desteğini bizden hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali Ünlü'ye, sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Eğitimimiz boyunca bize verdiği katkılardan dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin Vatansev, Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öztürk ve Yrd. Doç. Dr. Esmâ Menevşe'ye eğitimim sırasında bir müddet birlikte çalışma fırsatını bulduğum Doç. Dr. Aysel Kıyıcı'ya, ayrıca tez çalışmalarım sırasında bölümümüze dahil olan ve her türlü bilgi, tecrübe ve emeğini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Sedat Abuşoğlu'na ve kıymetli arkadaşım Uz. Dr. Abdullah Sivrikaya'ya teşekkür ederim.

Asistanlık süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım tüm teknisyen ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her türlü desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Fatma Tunçez Akyürek'e, hayatımın anlamı, enerji kaynaklarım çok sevgili çocuklarım Zeynep Suna ve Fatma Zehra'ya teşekkürlerimi sunarım.

Varlığıma vesile olan; iyi bir insan, ülkesine-milletine faydalı hayırlı evlat olma bilincini aşıl原因an çok kıymetli Annem Zekiye Akyürek'i saygı, hürmet ve rahmetle anıyorum. Ayrıca bu mefkûreleri hep canlı tutmamızı sağlayan, yeri geldiğinde annelik yeri geldiğinde babalık yapan çok değerli Babam Hakkı Akyürek'e saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Tüm yaşamım boyunca destekleriyle, sevgileriyle, dostluklarıyla her zaman yanımda olan değerli Abim Mevlüt Akyürek'e, Kardeşlerim Zehra Demir ve Orhan Akyürek'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Fikret AKYÜREK

KONYA, 2014

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 STEROİD HORMONLAR	3
2.1.1 Steroid Hormonların Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Steroid Hormon Sentezi (Steroidogenez).....	5
2.1.3. Adrenal Steroidlerin Salınımının ve Kontrolü	6
2.1.4. Fetal Adrenal Steroidogenez	7
2.1.5. Adrenal Steroidogenez	8
2.1.6. Steroidlerin Kanda Taşınması	10
2.1.7. Konjenital Adrenal Hiperplazi	10
2.1.8. 17 α Hidroksiprogesteron.....	12
2.2. 17-OHP ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ.....	13
2.2.1. LC/MS/MS Ölçüm Yöntemi	13
2.2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ölçüm yöntemi	13
2.2.3. Radyoimmunoassay (RIA) ölçüm yöntemi.....	14
2.2.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	14
2.3. KLİNİK LABORATUVARLARDA YÖNTEM SEÇİMİ VE YÖNTEMİN DEĞERLENDİRİLMESİ	15
2.3.1. Yöntem Seçiminde Amaç Ve Kriterler	15
2.3.2. Değerlendirme Kriterleri	15
2.3.3. Performans Standartları.....	18
2.3.4. Seçilen Yöntemin Değerlendirilmesi	19
2.3.5. Ölçüm Aralığının Kontrolü	20
2.3.6. Analitik Hatalar	20
2.3.7. Yöntem Performansını Değerlendirme Deneyleri	21
2.3.7.1. Rastgele Hata ve Replikasyon Deneyleri	23
2.3.7.2. Sabit Sistemik Hata ve İnterferans Deneyleri	23
2.3.7.3. Oransal Sistemik Hata ve Geri Kazanım Deneyleri.....	25
2.3.7.4. Sistemik Hata ve Yöntem Karşılaştırma Deneyleri	25
2.3.8. Veri Analizleri.....	26
2.3.9. Lineer Regresyon Analizi:	27
3. MATERYAL VE METOD.....	29
3.1. KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER.....	29
3.1.1. Cihazlar	29
3.1.2. Kimyasallar	29
3.2. ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	30
3.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Ölçüm Yöntemi	30
3.2.1.1. ELISA Prensibi	30
3.2.1.2. ELISA Prosedür	30
3.2.2. LC-MS/MS Prensip ve Yöntem.....	30
3.2.2.1. Ölçüm Prensibi.....	30
3.2.2.2. LC/MS/MS Ölçüm Yöntemi	32
3.3. METOD VALİDASYONU.....	37
3.3.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması	37
3.3.2. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) Çalışması.....	37
3.3.3. İnterferans Çalışması.....	38

3.3.4. Geri Elde Çalışması	38
3.3.5. Deteksiyon Limitleri	40
3.3.6. Referans Aralık Doğrulama Çalışması.....	40
3.3.7. Duyarlılık (Sensitivite).....	40
3.3.8. Özgüllük (Spesifite)	40
3.3.9. Taşınma (Carryover)	40
3.3.10. Metod Karşılaştırma Çalışması	41
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	41
4. BULGULAR	42
4.1. LİNEARİTE ÇALIŞMASI	42
4.2. KESİNLİK (TEKRARLAYICILIK, PRESİZYON) ÇALIŞMASI.....	43
4.2.1. Çalışma İçi Kesinlik Çalışması	43
4.2.2. Çalışmalar Arası (gün içi) Presizyon Çalışması.....	46
4.2.3. Günler arası presizyon çalışması.....	49
4.3. İNTERFERANS ÇALIŞMASI.....	52
4.4. GERİ ELDE DENEYİ	53
4.5. DETEKSIYON LİMITLERİ	53
4.6. REFERANS ARALIK DOĞRULAMA	54
4.7. DUYARLILIK (SENSİTİVİTE).....	54
4.8. ÖZGÜLLÜK (SPESİFİTE)	55
4.9. TAŞINMA (CARRYOVER)	55
4.10. METOD KARŞILAŞTIRMA DENEYİ.....	56
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR	68
ÖZET.....	72
SUMMARY	73
EKLER.....	74
EK. A: ETİK KURUL RAPORU	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER ve KISALTMALAR

RH: Rastgele Hata

SH: Sistemik Hata

TH: Toplam Hata

SD: Standart Deviasyon

CV: Coefficient of Variation

SA: İzin Verilebilir SD

BA: İzin Verilebilir Bias

TEA: İzin Verilebilir Total Hata

SH: Sistemik Hata

LC/MS/MS: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

HPLC: High Performance Liquid Chromotography

ELISA: Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay

RIA: Radioimmunoassay

17-OHP: 17-hidroksiprogesteron

17 β -HSD: 17 Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz

3 β -HSD: 3 Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz

ACTH: Adreno Kortiko Tropik Hormon

SHBG: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin

CBG: Kortikosteroid Bağlayıcı Globulin

ORD: Oksido Redüktaz Eksikliği

TMB: Tetrametilbenzidin

BSA-SB: Bovin Serum Albumin-Standart Buffer

KAH: Konjenital Adrenal Hiperplazi

PCOS: Polikistik over sendromu

cAMP: Siklik adenozinmonofosfat

MRM: Multiple-reaction monitoring

CLIA: Kemiluminesans immunassay

NCCLS: National Committe for Clinical Laboratory Standards

FDA: Food and Drug Administration

TEa: Müsaade edilen toplam hata

Xc: Tıbbi karar düzeyi

Ea: İzin verilebilir hata

CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendments

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

PBS: Phosphate Buffer Solution

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klinik laboratuvarlar, hastaların tanı, tedavi ve takibinde çok önemli bir yer tutan bu nedenle tüm hastalar ile ve bunların bakımından sorumlu klinik personelin gereksinim ve beklentilerini yerine getiren tıbbi merkezlerdir. Klinik laboratuvar da yapılan hatalar, hasta sağlığını direkt olarak etkileme potansiyeline sahiptir. Klinik laboratuvar testleri tanı, tedavi, terapötik karar, hastalık durumunun izlenmesi ve sağlık durumunun belirlenmesi amacıyla kullanılırlar. Laboratuvar sonuçlarının kesinlik ve doğruluğu direkt olarak hastalıkların ayırıcı tanısını, tedavisini ve takibi açısından son derece önemlidir. Laboratuvar test teknolojileri hızla gelişmekte; çok çeşitlilikte ve duyarlılıkta ölçüm metodları veya prosedürleri klinik laboratuvarların gündemine girmektedir. Bu yeni teknoloji ve yöntemlerin rutin uygulanabilirliğini görmek için performans deneylerini yapmak gerekir.

Metod optimizasyon çalışmasında amaç, laboratuvarlar da uygulanması düşünülen yeni bir yöntemde istenilen amaca uygun nitelikte (performansta, kalitede) sonuç verildiğini test etmek ve metodun rutin kullanımda istenilen performans şartlarını kontrol altında tutmaktır. Bunlar rastgele hata (RH), sistematik hata (SH) ve toplam hatadır (TH). Bu hataları saptamak için hazırlanmış olan deney protokollerine uyularak bazı deneyler yapılır. Rastgele hata için; replikasyon deneyleri, sistematik hata için; interferans, geri elde ve metod karşılaştırma deneyleri yapılır. Deneysel olarak hesaplanan hata o konsantrasyonda izin verilebilen hata düzeyinden küçük bulunduğu takdirde yeni metodun performansının yeterli olduğuna karar verilir (Holick MF 2004,2006). Bu çalışmada LC-MS/MS (Liquid chromatography–tandem mass spectrometry) yöntemi ile 17- α hidrokspregesteron (17-OHP) hormon testi için metod değerlendirme çalışması yapıldı.

17-OHP; 17-hidroksilaz ve sitokrom P450 enzim sistemleri aracılığı ile progesterondan ve ayrıca 3 β hidroksterooid dehidrogenaz izoenzimleri aracılığı ile pregnenalonndan sentezlenir. 17-OHP doğal progestojendir. Bu hormon öncelikli olarak böbrek üstü bezi korteksi ve overlerde sentezlenmektedir.

17-OHP analizlerinde immünolojik yöntemler, kromatografik yöntemler ve kütle spektrometreleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte rutin laboratuvarlar daha çok immünolojik yöntemler kullanmaktadır. Son yıllarda klinik laboratuvarlarda

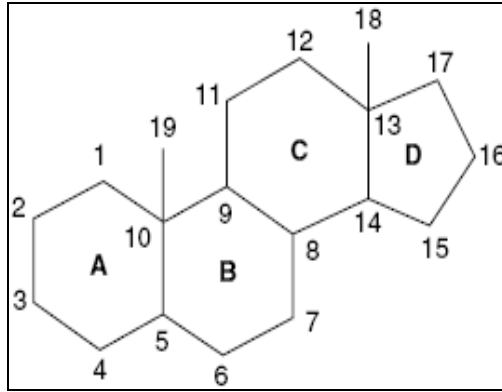
analitik performans parametrelerindeki belirsizlikleri çok azalttığı gösterilen likid kromatografi kütle spektrometreleri kullanılmaya başlanmıştır. Bizde bu çalışmada likid kromatografi tandem kütle spektrometre cihazında 17-OHP hormonu için yeni ölçüm metodu geliştirmeyi ve bu yeni metotla ELISA metodu arasındaki uyumu araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Steroid Hormonlar

2.1.1 Steroid Hormonların Genel Özellikleri

Bütün steroidler siklopentanoperhidrofenantren halkası içerirler (Şekil 2.1.). Steroid hormonlar; canlılarda farklılaşma, gelişme, büyüme ve fizyolojik fonksiyonların gerçekleştirilmesinde önemli görevleri vardır (Simard ve ark. 2005). Tüm steroid hormonlar temel olarak benzer yapıdadır. Fakat biyokimyasal etkilerinde çarpıcı değişikliklere yol açan basit sayılabilecek kimyasal farklılıklarla birbirlerinden ayrılırlar.



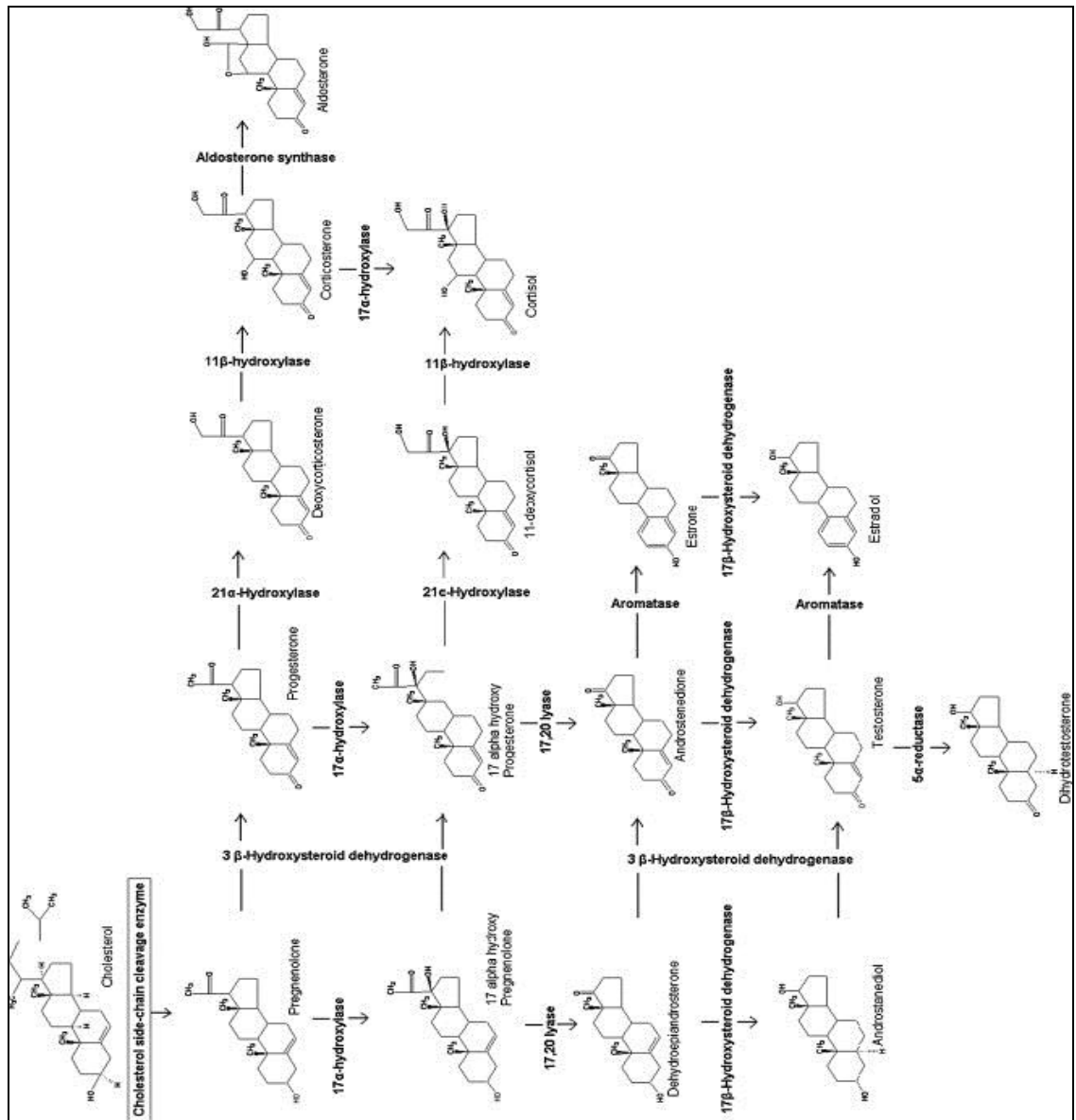
Şekil 2.1. Siklopentanoperhidrofenantren halkası

Temel yapı merkezde siklopentanoperhidrofenantren halkası ve periferde hidrofilik özellik kazandıran yan gruplardan (OH) oluşur. Metabolizma sırasında, genellikle steroidler, hidroksilasyon ve konjugasyon gibi reaksiyonlarla (ör:glukronik asit, sülfirik asit) daha hidrofilik hale dönüşebilir. Buna rağmen genel olarak steroidler, nonpolar-hidrofobik bileşiklerdir ve organik çözücülerde daha iyi çözünürler. Steroidler *in vivo* şartlarda genellikle taşıyıcı bir proteine ihtiyaç duyarlar. Taşıyıcı proteinler o steroide spesifik olabileceği gibi nonspesifikte olabilir. Spesifik proteinlere genellikle daha sıkı bağlanırken albumin gibi nonspesifik proteinlere daha gevşek bağlanarak taşınırlar. Steroidler etkilerini hücrenin çekirdeğinde spesifik proteinler aracılığı ile gösterirler. Nükleusda'da transkripsiyon mekanizmasının kontrolünde rol oynarlar (Kushnir ve ark. 2011).

Seks steroidleri sahip oldukları karbon atomlarının sayısına göre 3 ana gruba ayrılır:

1. 21-karbonlu diziler kortikoidleri ve progesterinleri içerir. 21 karbonlu steroid bileşiklerinin temel yapısı pregnan çekirdektir.
2. 19- karbonlu diziler androjenler olarak adlandırılmakta ve tümü androstan çekirdeğe dayanmaktadır.
3. 18 karbonlu steroid bileşikleri ise östrojenler olup ekstras çekirdeği temel yapıyı oluşturmaktadır (Speroff L ve Fritz 2000).

Steroid hormonlar isimlendirilirken, temel ismi tanımlamak için karbon atomlarının sayısı sıklıkla kullanılır (örnek; pregnan, androstan gibi).



Sekil 2.2. Major steroid biyosentez yolu

(http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid_synthesis#Steroid_biosynthesis. Erişim tarihi 2013)

2.1.2. Steroid Hormon Sentezi (Steroidogenez)

Steroid hormonlar başta surrenal korteks ve overlerde olmak üzere değişik yerlerde sentezlenirler. Steroid hormonlarının sentezindeki ilk enzimatik reaksiyon kolesterolden pregnenolonun sentezlendiği basamaktır. Bu sentez basamağından mitokondriyal sitokrom P450 enzimlerinden olan kolesterol desmolaz sorumludur. Pregnenolon bütün steroidlerin sentezinde öncü moleküldür (White ve Speiser 2000). Steroidler başta adrenal korteks olmak üzere gonadlar, plasenta gibi yerlerde sentezlenebilmektedir. Adrenal korteks; zona glomeruloza, zona fasikülata ve zona retikularis olmak üzere 3 bölgeden oluşur (Trakakis ve ark 2009). Mineralokortikoidler zona glomerulozada, glukokortikoidler zona fasikülata ve androjenler zona retikulariste sentezlenir.

Mineralokortikoidler zona glomeruloza hücrelerinin mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan değişik enzimler aracılığı ile sentezlenir. Bu yolakta 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) pregnanolonu progesterona dönüştürür (Cherradi ve ark 1997). Progesteronun, 21 hidroksilasyonu ile deoksikortikosteron (DOC) ve DOC'un, 11 β hidroksilasyonu ile de kortikosteron sentezlenir. Kortikosteronun 18 hidroksilasyonu ve 18 oksidasyonu ile aldosteron sentezi gerçekleşmiş olur. Aldosteron sentezindeki son üç basamak reaksiyonları mitokondri de gerçekleşir ve bu reaksiyonların gerçekleşmesine mitokondriyal enzimlerinden 11 β -hidroksilaz (aldosteron sentaz) aracılık eder (White ve Speiser 2000).

Glukokortikoidlerin (kortizol) sentezi sırasında zona fasikülata ve zona retikularisin endoplazmik retikulumunda bulunan 17 α -Hidroksilaz/17,20-Liyaz enzim sistemleri rol alır. Bu enzim sistemi aracılığı ile pregnenolondan 17 α -hidroksipregnenolon sentezi gerçekleşmiş olur. Zona fasikülata 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi 17 α -hidroksipregnenolondan 17 α -hidroksiprogesteron dönüşümünü gerçekleştirir. 17 α -hidroksiprogesteron, 21 hidroksilaz aracılığı ile 11-deoksikortizol'e dönüşür. Daha sonra bir mitokondriyal enzim olan 11 β hidroksilaz enzimi ile 11-deoksikortizolden kortizol sentezi gerçekleşmiş olur (White ve Speiser 2000).

Zona retikulariste ve gonadlarda 17α -hidroksilaz/ $17,20$ -liyaz, 17α -hidroksipregnenolonu dehidroepiandrosterona (DHEA) dönüştürür. Daha sonra 3β -HSD enzimi ile DHEA'nın androstenediona dönüşümü gerçekleşir. Gonadlarda 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi ile androstenedion testosterona dönüşür (Penning 1997).

Puberte sonrası overlerde aromataz (CYP19) androstenedionu östrojene dönüştürürken testosteronu östradiole dönüştürebilir. Androjenler hedef hücrelerinde testosteron 5α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona da dönüşebilir (White ve Speiser 2000).

2.1.3. Adrenal Steroidlerin Salınımının ve Kontrolü

Bütün adrenal steroidler kolesterolden sentezlenirler. Kolesterol adrenal bezde asetil KoA'dan sentez edilebilir. Buna rağmen asıl önemli kısmı kandan alınır ve bununda kaynağı kandaki düşük dansiteli lipoproteinlerdir. Steroid sentezi için gerekli substrat, "kolesterol esteraz" enziminin kolesterolu serbestleştirmesi ile sağlanır. ACTH ise "kolesterol esteraz"ı aktive eder. Adrenal bezden salınan farklı hormonların sentezi "sitokrom P-450 enzimleri aracılığı ile gerçekleştirilir. Oksijenazlar steroidlerin hidroksilasyonlarını katalize eder. Steroid sentezinde ilk önce kolesterol pregnenalona çevrilir. Bu çevrilme işlemini $20,22$ -desmolaz enzimi katalizler. Daha sonra değişik basamaklardan sonra kortizol, aldesteron ve DHEA sentezlenir. Yine bu üç hormonun prekürsörleri de adrenal bezde sentezlenebilir. İşte bu sentez yollarındaki enzimlerden bazılarının eksikliği normal yolağı bloke eder ve ara ürünlerde birikmeye yol açar. Bu durum progresif bir seyir takip eder. Çünkü enzim eksikliğine bağlı olarak kortizol sentezi ciddi biçimde etkilenmiştir. Azalan kortizolü artırmak için hipofizden daha çok ACTH salgınır, ara ürünler artar ve sonuç olarak adrenal bez hiperplaziye uğramış olur (Kaplan 1992).

Kortizol ve adrenal androjenlerin salınımını uyaran faktörler zona fasikülata ve zona retikularis üzerine hipertrofik olarak etki etmektedir. Zona glomerulosa tabakasına ise etkisi yoktur. Bunun nedeni zona glomerulosa'dan salgılanan mineralokortikoidlerin salınımı renin-anjiyotensin sistemi kontrolünderken, zona fasikülata ve zona retikularisten salgılanan steroid hormonların, hipotalamo-hipofizer aksın kontrolünde olmasıdır. Hipofiz kaynaklı adrenokortikotropik hormon (ACTH)

kortizol salınımını kontrol eden temel unsurdur. ACTH ise hipotalamustan salınan kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) tarafından kontrol edilir. Artan kortizol konsantrasyonları direkt olarak ön hipofizde negatif feedback ile ACTH salınımını baskılar. Ayrıca ACTH' in salınımının arttığı (ACTH uyarısı ile ve düşük kan kortizol konsantrasyonlarında) durumlarda adrenal bez üzerinde pozitif feedback etkisiyle adrenal androjenlerin salınımı da artar (Molina 2009).

Gonadlarda, steroid hormonların sentezi belli noktaya kadar surrenal kortekste olduğu gibi sentezlenebilmektedir. Ancak overlerde 21 hidroksilaz, 11 β hidroksilaz, 18-hidroksilaz ve 18-hidroksidehidrogenaz enzimleri bulunmadığı için overlerde glukokortikoid ve mineralokortikoid sentezi gerçekleştirilemez (Yılmaz 2007).

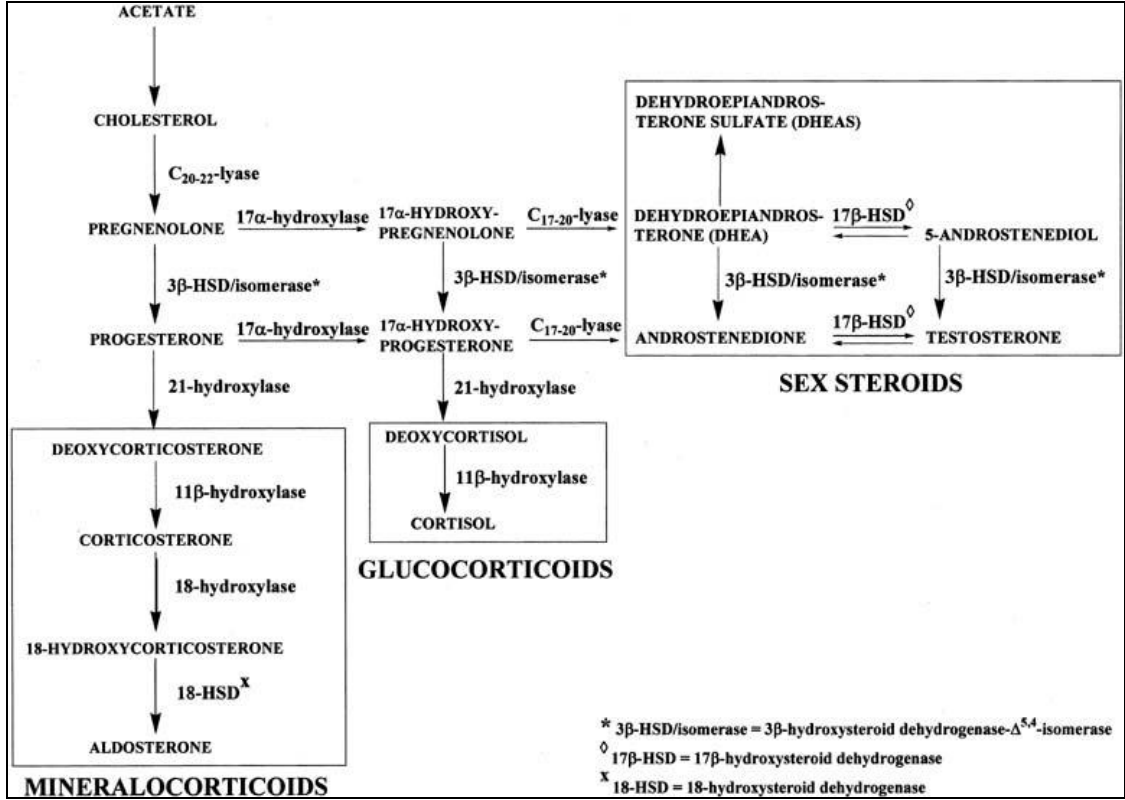
2.1.4. Fetal Adrenal Steroidogenez

Fetoplasental ünite, fetal adrenal, plasental ve maternal steroidogenez arasındaki kompleks uyumu sağlamaktadır. Fetal adrenaller 6-8. haftalarda steroid sentezine başlamaktadır. Hipotalomo-hipofizer-adrenal aks ise 10. haftada feedback mekanizmasını kazanmaktadır. Bunun bir göstergesi olarak konjenital adrenal hiperplazili (KAH) kız fetüslerdeki intrauterin “ambiguous genitalya” gelişimi örnek verilmektedir. 6-8. haftalarda steroidler fonksiyonel korteks olan fetal zondan salgılanmaya başlar. Bu steroidler aynı zamanda karaciğer için dihidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) kaynağını oluşturur ki bu da, 16-hidroksilasyonla 16-DHEAS üretimini sağlar. 16-DHEAS' dan plasentada fetal canlılığın göstergelerinden östriol üretilir. Gebeliğin son dönemlerinde bu plasental östrojen fetal adrenal bezin steroid biyosentezini uyarır. Bu uyarı fetüsün akciğer, karaciğer, tiroid ve barsaklar gibi hayati organlarının matürasyonu için gerekli kortizolün sentezlemesini sağlar. Fetoplasental östrojenin fetal steroidogenez dışında gebelik devamlılığın sağlanmasında, maternal kardiyovasküler sistem regülasyonunda, uteroplasental kan akımının düzenlenmesinde ve progesteron ilişkili immunsupresyonda da etkileri vardır (Diczfalusy ve Mancuso 1965, Molina 2009).

2.1.5. Adrenal Steroidogenez

Adrenal korteks morfolojik olarak 3 zona ayrılmıştır. Bu 3 zon aynı zamanda farklı hormonların sentezinden sorumludur. Bu üç grup hormon glukokortikoidler (kortizol ve kortikosteron), mineralokortikoidler (Aldosteron) ve seks steroidleri'nden (östrojen ve testosteron) oluşmaktadır. Adrenal hormonların tamamı kolesterol kaynaklıdır ve kullanılan kolesterol sıklıkla düşük dansiteli lipoproteinlerden (LDL-Kolesterol) endositozla alınarak sağlanır. Endositozla alınan veziküller lizozomlarla birleştirilerek kolesterol esteraz ile kolesterol esterleri hidrolize edilir ve serbest kolesterol elde edilir. Alternatif olarakta kolesterol kaynağı olarak adrenal bez korteksinde Asetil Koenzim A 'dan kolesterol sentezlenebilir. Ayrıca adrenal bez SR-B1 isimli özel HDL-Kolesterol reseptörleri sayesinde HDL 'den de kolesterol sağlanabilir (Molina 2009).

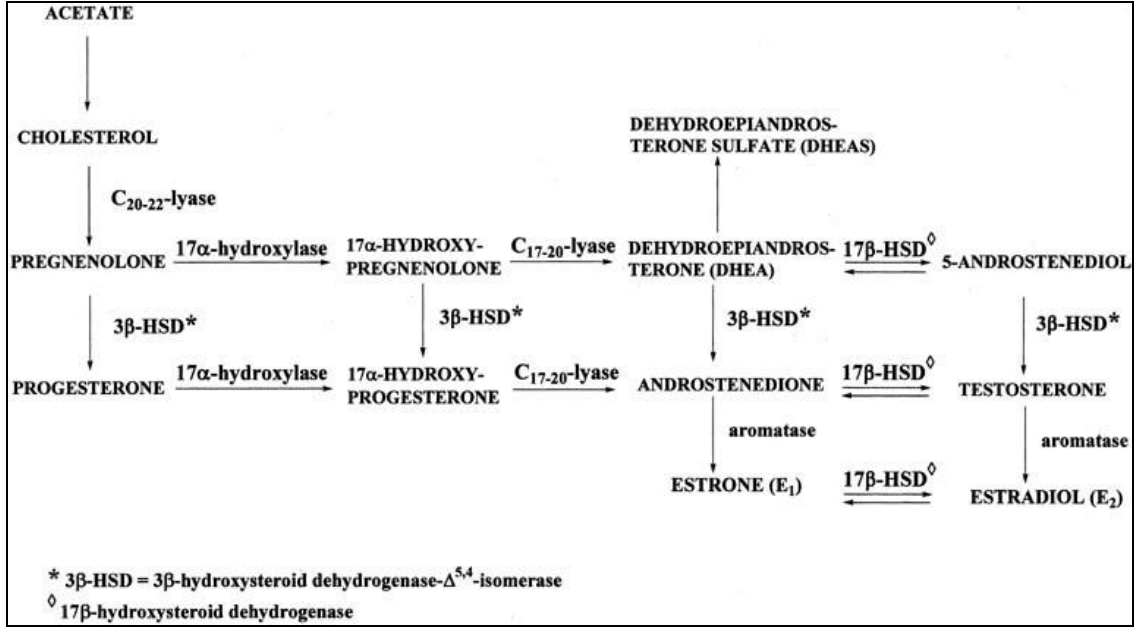
Hormon sentezinin ilk adımında intraselüler kolesterol dış mitokondrial membrandan iç mitokondrial membrana "Steroidogenic Acute Regulatory Protein" (StAR) yardımı ile taşınabilir. StAR aracılıklı bu basamak steroid sentezinde hız-kısıtlayıcı basamak olarak kabul edilmektedir. StAR aktivitesini ACTH' ın kendi reseptörüne bağlanmasıyla artan hücre içi cAMP düzenlemektedir. Mitokondri iç membranına taşınan kolesterol, kolesterol desmolaz enzimi ile pregnenolona çevrilir. Oluşan bu pregnenolon bundan sonra gelecek bir dizi enzimatik reaksiyonun substratıdır. Adrenal korteksin farklı kısımlarını özgün enzimatik özellikleri olan farklı hücre grupları oluşturduğundan, sentez yolu, reaksiyonun sürdüğü korteks bölgesine özgün olarak mineralokortikoid, glukokortikoid ya da androjenik hormon sentezi gerçekleşmiş olur (Diczfalusy ve Mancuso 1965, Molina 2009, Miller 2013).



Şekil 2.3. Surrenal bezde mineralokortikoid, glukokortikoid ve androjen sentezi (Stanczyk 2009).

21- hidroksilaz basamağına kadar tüm steroid üreten endokrin organlarda sentez basamakları aynıdır (White 2000). Sonuç olarak normal insan overi, seks steroidlerinin tümünü (östrojenler, progestinler, androjenler) üretir. Over androjenlerinin önemi, yalnızca östrojenler için zorunlu prekürsör olmalarından dolayı değildir. Androjenler aynı zamanda klinik olarak önemli salgı ürünleridir. Over, testisten kritik enzimlerin temel niteliği ve dolayısıyla salgı ürünlerinin dağılımı açısından farklılık gösterir. Over, adrenal bezden 21-hidroksilaz ve 11-β hidroksilaz reaksiyonlarının eksik olmasıyla ayrılır. Bu nedenle glukokortikoidler ve mineralokortikoidler gonadlarda üretilmemektedir.

17- α hidroksiprogesteron (17-OHP) yüksekliğinin ve konjenital adrenal hiperplazi (KAH)'nin en sık sebebi 21 hidroksilaz enziminin eksikliğidir. 17-OHP, 21 hidroksilaz enziminin substratıdır. Her ne kadar etkilenen bebeklerin %10'unda düşük serum düzeyleri olsa da yenidoğan döneminde 17-OHP'nin bazal serum düzeyleri 10 ng/dL' nin üzerindedir (Peretti ve Forest 1982). 21-hidroksilaz enzim eksikliklerinde farklı klinik tablolar (sonuçlar) görülebilir (Speiser ve ark 1992).



Şekil 2.4. Overler ve testislerde steroid hormon sentezi (Stanczyk 2009).

17- α hidroksiprogesteron, 11-hidroksilaz eksikliklerinde de yükselmektedir. Steroidogenez kusurlarını tam aydınlatılabilmek için adrenokortikal profilin iyi tanımlanması gerekir. 3- β hidroksisteroid dehidrogenaz, 11-hidroksilaz ve 21-hidroksilaz ayırımlarının yapılabilmesi önemlidir (Speiser ve ark 1992). 17-OHP en yüksek seviyeye, ACTH stimülasyonu sonrası (100 ng/dL) ulaşabilir.

2.1.6. Steroidlerin Kanda Taşınması

Kan dolaşımında, ana steroidlerin çoğunluğu, östradiol ve testosteron, seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG) olarak bilinen taşıyıcı bir proteine bağlanır. Bunun dışında steroidlerin %10-40'ı gevşek olarak albumine bağlı olarak taşınır, %1'i ise kanda serbest olarak bulunur. Çok küçük bir yüzde kortikosteroid bağlayıcı globuline bağlanır (Speroff ve Fritz 2007). Hipertiroidizm, gebelik ve östrojen uygulamalarının tümü kan SHBG düzeylerini artırırken; kortikosteroidler, androjenler, progestinler ve büyüme hormonu SHBG seviyelerini azaltır.

2.1.7. Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH) 46XX genotipli çocuklarında belirsiz dış genital yapının en sık nedenidir. Konjenital adrenal hiperplazi kortizol sentez basamaklarından sorumlu enzimlerden birinin ya da birkaçının fonksiyon veya sentez

bozukluğundan kaynaklanan ve otozomal resesif (OR) geçiş gösteren bir hastalıktır. Dünya genelinde yenidoğan tarama programlarından elde edilen verilere göre KAH olgularının insidansı yaklaşık 1:15000 olup, taşıyıcılık ise 1:60 olup hastaların %90-95'inden 21-hidroksilaz enziminin eksikliği sorumludur (Merke ve Bornstein 2005). Klasik olmayan tipte KAH hastalığının genel popülasyonda görülme sıklığı 1:1000'dir (Deneux ve ark 2001).

11-Hidroksilaz ezim eksikliğine bağlı gelişen KAH, tüm KAH vakalarının %5-8' ini oluşturur. Otozomal resesif geçiş gösteren genetik, endokrin ve metabolik bir hastalıktır (Maghribi 2007).

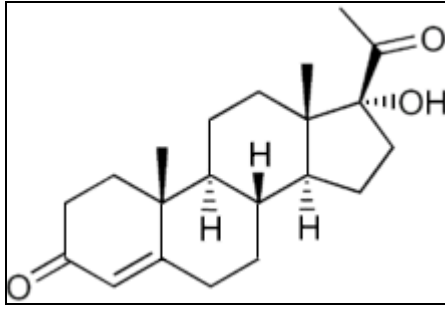
Daha az görülen enzim eksiklikleri olarak 17-hidroksilaz ve 3-hidroksisteroid dehidrogenaz enzim eksikliklerine bağlı KAH tipleriyle karşılaşılmaktadır (White ve Speiser 2000). Enzim eksikliğinin derecesine göre olgularda farklı klinik tablolar görülür. KAH'ın tiplendirmesi klinik, hormonal ve moleküler kriterler ile yapılmaktadır. Klinik tanımlama klasik, ciddi gidiş gösteren tip veya klasik olmayan hafif gidiş gösteren tip olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Klasik tip KAH olguları aldosteron eksikliğinin derecesine bağlı olarak tuz kaybettiren tip ve basit virilizan tip olarak ikiye ayrılır. Klasik tipteki KAH olgularında androjen artışı kız fetusun dış genital yapısında virilizasyona sebep olur (White ve Speiser 2000, Houk ve ark 2006).

Biyokimyasal belirteçler ve klinik semptomlar hangi steroidin eksik ve hangilerinin aşırı üretildiğine göre değişkenlik gösterir ama genel olarak, konjenital adrenal hiperplazide karakteristik özellik şüpheli genital yapı ve bozulmuş cinsel gelişimdir. XX genotipli bir yenidoğan 21-Hidroksilaz ve 11 β -Hidroksilaz enzim eksikliklerinden dış genital yapıdaki aşırı virilizasyonla etkilenirken, XY genotipli bir yenidoğan 17 α -Hidroksilaz ve 3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz Tip-2 eksikliğinden dış genital yapıdaki yetersiz virilizasyonla etkilenir. P450 Oksido-redüktaz Eksikliği (ORD) doğumda her iki cinsiyeti de etkileyebilecek tek tip KAH'dır. Aşırı virilize XX yenidoğan veya yetersiz virilize XY yenidoğan bebeğe neden olabilir. Ayrıca ORD iskelet sistemi bulgularıyla kendini gösterebilecek tek KAH varyantıdır (Molina 2009).

KAH tanısında 17-OHP düzeyinin ölçülmesi değerli bir bilgi sağlar. Ancak tanıyı doğrulamak için ACTH stimülasyonu sonrası adrenal steroid profilinin analizi hangi basamakta kusur olduğunu göstermesi bakımından son derece önemlidir (Merke ve Bornstein 2005).

2.1.8. 17 α Hidroksiprogesteron

17-OHP glukokortikoid ve sex hormonlarının sentezi sırasında üretilen 21 karbon(C) lu steroid bir hormondur.



Şekil 2.5. 17 hidroksiprogesteron (<http://wellnessadvantage.com/?dgl=13410>, Erişim tarihi 2013).

17-OHP'nin fizyolojik fraksiyonu tanımlanmamıştır. Bu hormon bir prekürsör moleküldür. Serum 17-OHP düzeyleri fetal yaşam ve postnatal dönemde yüksek seyredir. Yaşamın ilk haftalarında serum 17-OHP düzeyleri kordon kanına göre 50 kat yüksek olabilir. Postnatal 30-60. günlerde erkek çocuklarda hafif bir artış olabilir. Daha sonra her iki cinsiyet içinde puberteye kadar giderek serum düzeyleri düşer. Kortizol gibi günlük düzeyleri adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımına bağlı olarak diurnal salınım gösterir. Gün içinde en yüksek seviyeye gece sabaha doğru ulaşır. Buna ek olarak menstrual siklusun luteal fazında overlerden salınımı artar. 17-OHP doğal bir progestindir. Gebeliğin üçüncü trimesterinde fetal adrenal salınımına bağlı olarak serum düzeyleri artar. 17-OHP ölçümü 21 hidroksilaz ve 11 β hidroksilaz eksiklikleri gibi enzim eksikliğinden şüphelenilen konjenital adrenal hiperplazi gibi hastalıklarda ölçülmelidir. Buna karşın 17 α hidroksilaz enzim eksikliği nadir görülse de bu enzim eksikliğinde 17-OHP düzeyleri ölçülemeyecek kadar düşük olabilir (De Villa ve ark1972, Wisdom 1976, Hubl ve ark 1982, Arakawa ve ark 1982, Arakawa 1982).

Sentezlenen hormon çoğunluğu direkt kana salınır ve taşıyıcı proteinlere bağlanır. Plazmada 17-OHP'nin %55'i albumine zayıf olarak, %41'i kortikosteroid bağlayıcı globuline (CBG) ve küçük bir kısmı da sex hormon bağlayıcı globülin (SHBG)'e bağlı olarak taşınır. Bağlı steroidler biyolojik olarak inaktiftir (Arakawa ve ark 1982). 17-OHP tayini KAH'ın tanı ve takibinde en önemli serum göstergesidir. 17-OHP, 11-deoksikortizol ve kortizole giden yolda anahtar bir steroidtir. 17-OHP tayini, birçok KAH tarama programında rutin parametre haline gelmiştir (Pang ve ark 1988). 17-OHP ölçümü başta KAH olmak üzere bazı mineralokortikoid ve androjen sentez bozukluklarının tanı ve tedavisinde kullanılır. Tedavi edilmeyen KAH'larda 17-OHP düzeyleri genellikle çok yüksektir. Ancak bazen geç başlangıçlı KAH'larda orta düzeyde yükselir (Turpeinen ve ark 2005).

2.2. 17-OHP Ölçüm Yöntemleri

Serum 17-OHP düzeylerinin tayininde rutin yöntemler immunoassayler, radioimmunoassay ve liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS)' dir. Immunoassayler pratik olmalarına rağmen diğer steroidlerle nonspesifik etkileşimler ve çapraz reaksiyonları nedeniyle hatalı sonuçlara neden olabilir. Son zamanlarda 17-OHP ölçümü için likid kromatografi kütle spektrometreleri kullanımı ön plana çıkmaya başlanmıştır (Janne ve ark 1974, Apter ve ark 1976, Saisho ve ark 1990, Nahoul 1994, Katayama ve ark 1998, Boudi ve ark 2000, Wudy ve ark 2000, Kao ve ark 2001, Lai ve ark 2002).

2.2.1. LC-MS/MS Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem 17-OHP'nin serum veya plazmaya internal (d_3 -17 OHP) standart ilavesi ve ekstraksiyondan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır.

2.2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem 17-OHP'nin serum veya plazmada ekstraksiyondan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır.

2.2.3. Radyoimmunoassay (RIA) Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem 17-OHP'nin serum veya plazmada ekstraksiyondan sonra radyoimmünolojik olarak kantitatif ölçülmesi esasına dayanır.

2.2.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA teknikler, antijen-antikor etkileşmesine dayanan analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antijen saptanabilir. ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarı, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarı ölçülebilir. ELISA yöntemi, çeşitli şekillerde uygulanabilir. Ölçüm tüpünde bir katı destek üzerine bir antijen veya antikor adsorbe edilmiştir.

Ölçüm tüpüne serum (işaretsiz ligand içerir) ve reaktif (enzim işaretli ligand içerir) pipetlenir. Kısa inkübasyon süresince immobilize antijen veya antikora bağlanmak için işaretsiz ligand ile enzim işaretli ligand yarışır; antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand kompleksleri oluşur. Yıkama ile antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand kompleksleri dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu end-point veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu, işaretsiz ligandın (serumdaki antijen veya antikor) konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Bu ölçüm yöntemine kompetitif ELISA yöntemi denir ve sıklıkla antikor ölçümünde kullanılmaktadır.

Antijen-antikor birleşmesi spesifik bir olaydır. Fakat birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme olabilir. Buna çapraz reaksiyon adı verilir. Antijen-antikor birleşmesi kimyasal bir olaydır. Bu birleşmede kovalent olmayan bağlar rol oynar. Antijen ve antikor multivalans olduklarından ve reaksiyon için bütün valansların doyması şart olmadığından değişik oranlarda birleşir (De Villa ve ark

1972, Wisdom ve ark 1976, Hubl ve ark 1982, Arakawa ve ark 1982, Arakawa ve ark 1982, Emon ve ark 2000).

2.3. Klinik Laboratuvarlarda Yöntem Seçimi ve Yöntemin Değerlendirilmesi

2.3.1. Yöntem Seçiminde Amaç ve Kriterler

Klinik laboratuvarlar, analiz edilmek üzere gelen hasta örneklerinin analizlerini sonuçlandırarak hasta ve klinisyenlere iletmekle yükümlüdür. Analiz raporları klinik laboratuvarların rutin olarak sağladığı verilerdir. Veri raporlarının güvenilir olması klinik değerlendirmeler için zorunludur. Analiz sonuçlarını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar preanalitik, analitik ve postanalitik olarak üç başlık altında incelenebilir. Analitik faktörler arasındaki en önemlilerden biri analitik yöntemlerdir. Ölçüm yöntemi bir analitin hangi örnekte, hangi kurallara göre, hangi araçlar-gereçler kullanılarak, hangi tekniklerle ve nasıl ölçtüğünü tanımlar. Analitin hangi periyotlarla ölçülebildiği de ölçüm yöntemine göre değişmektedir. Bir analit için çok sayıda ölçüm yöntemi bulunabilir. Ölçüm prosedürleri, ölçüm yönteminin laboratuvarlar da nasıl uygulanacağını da içerir. (Alataş ve ark 2004).

2.3.2. Değerlendirme Kriterleri

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) bir seri değerlendirme protokolü önermiştir.

EP 5-A: Kesinliği (presizyon) değerlendirmek ve üretici firmanın bu yönlü iddialarını sorgulamak içindir. En az 2 farklı düzeyde analit içeren örnekler çift olarak aynı çalışma içinde ve günde iki defa farklı çalışma içinde ve 20 gün boyunca çalışılır. Within-day (gün içi) ve between-day (günler arası) varyanslar hesaplanır ve total SD tahmini yapılır.

EP 6-P: İki yöntemin linearitesini test etmek içindir. Linearitenin sınırını saptamak ve bazı konsantrasyonlar için nonlineariteden doğan hataları saptamak için istatistiksel prosedürler geliştirilmiştir.

EP 7-P: Klinik kimya laboratuvarlarında interferansın etkisini araştırmak içindir. Ayrıca çeşitli ekzojen ve endojen interferanslar ile bunların izin verilebilir düzeylerini bildirir.

EP 9-A: Metod karşılaştırma deneyleri ile ilgilenir.

EP 15-A: Kullanıcılar için kesinlik ve doğrulukla ilgili protokol sunulmuştur. Bu protokolda, metod performansının iyi olduğu ve kişinin kendi laboratuvarın da bu metodu güvenle uygulayabileceği kabul edilir. Bunun amacı kullanıcıya üretici tarafından sunulan bu performansın yakalanabileceği ve CLIA'nın gerektirdiği kriterlere ulaşılabilirliğini göstermektir. Presizyon 5 gün ya da daha az süreyle uygulanan replikasyon deneyleri ile bulunur. Doğruluk ise 20 hastanın serumu için metod karşılaştırma deneyinin yapılması ya da üretici firma tarafından sağlanan kontrol materyallerinin analizi ile bulunur.

EP 10-A: Klinik laboratuvar yöntemlerinin ön değerlendirilmesi içindir. Bu protokol uygulandığında cihazın ya da metodun kabul kararını vermek üzere kullanılabilirlik ön bilgileri sağlanır. Elde edilen bilgiler metodun büyük düzeyde kabul edilemez olduğu sonucunu verirse daha ileri çalışmaları yapmaya gerek kalmaz (Alataş ve ark 2004).

Yöntem seçimi ve değerlendirilmesi yeni yöntemlerin yerleştirilmesi sırasında uygulanan anahtar işlemlerdir. Yeni yöntemin rutine sokulmadan önce laboratuvar koşullarında uygulanabilirliğinin ve performansının değerlendirilmesi iyi laboratuvar uygulamaları gerekliliklerindedir. Yüksek kalitede laboratuvar hizmeti sunmayı hedefleyen klinik laboratuvarlar için yenilenmiş metodları tanıyıp kullanıma sokmak tekrarlayan bir görev olmalıdır. Yeni ya da yenilenmiş bir metodun performansı, rutin kullanıma sokulmadan önce dikkatlice ve tarafsızca incelenmelidir (Kaplan ve ark 2003).

Laboratuvar da halen yapılmakta olan testlere ilaveten yeni bir testin yapılması klinisyen tarafından istenebilir. Ya da daha çok tıbbi yarar sağlamak, teşhiste hassasiyet, doğruluk ve spesifikliği artırmak, maliyetleri azaltmak gibi çeşitli sebeplerden dolayı eski bir yöntemin yerine geçmek üzere yeni bir yöntem arayışına girilebilir. O halde yöntem seçimi duyulan ihtiyaca göre yapılmak zorundadır (Taga ve ark 2000). Yeni bir yöntem ihtiyacı aday yöntemin seçiminde ilk basamaktır. Başlangıçta aday yöntemin gereklilikleri ayrıntılı bir şekilde belirlenirse, yöntem seçimi ve değerlendirilmesi doğru ve etkin bir şekilde yapılabilir. Bu gereklilikler

analitik yöntem seçim ve değerlendirme çalışmalarına kılavuzluk eder (Fraser 1992, Kaplan ve ark 2003).

İhtiyaçlar belirlendikten sonra gereklilikler belirlenmelidir. Bazı bilgiler bir yöntemin rutin kullanımına uygun olup olmadığı konusunda kabaca bilgi verir. Bunlar örnek tipi, analiz örneği miktarı, test kapasitesi, cihazın saatteki test hızı, test istek sonuç verme süresi, test başına maliyet, kalibrasyon yöntemi, kalibrasyon sıklığı, kalite kontrol programı, cihazın kaplayacağı yer, reaktif depolama gereksinimleri, ambalaj hacimleri, eğitim için gereken zaman, yeterli personel becerisi, atıkların atılması olanakları, kimyasal zararlılık ve güvenlik için gerekliliklerdir. Bu açılardan yöntemin laboratuvara uygun olup olmadığına uzman ve teknik elemanlar arasındaki görüşme ile kolayca karar verilebilir. Eğer bu yönlerden uygun değilse zaten daha ileri çalışmalara gerek kalmadan yöntem reddedilir (Fraser ve Petersen 1993, Kaplan ve ark 2003, Alataş ve ark 2004).

Daha sonra metodolojik açıdan yöntemin uygulanabilirlik özellikleri incelenir. Bunlar analitik duyarlılık (analizi yapılan maddenin örnekteki konsantrasyonu değiştiğinde, ölçüm sinyalinde meydana gelen değişiklikler), analitik özgüllük (yöntemin sadece tayini yapılan maddeyi mi ölçtüğünün göstergesidir), kimyasal reaksiyon tipi, reaksiyon koşullarının optimizasyonu, sonuçların klinik kullanıma uygunluğu, testin yapılması ile ilgili detaylı protokoldür.

Bir sonraki basamak, analitik performansın yeterliliğini incelemektir. Yöntemin o analit ölçümünde ne kadar yeterli olduğunu gösterir. Metodun rapor edilebilir aralığı, reaktif ve kontrol materyallerinin stabilitesi, cihazın reaktif tükenmesini algılayabilme yeteneği, beklenen referans aralığı, interferan maddelerin neden olduğu hata düzeyi, geri kazanım, kesinliği (tekrarlanabilirliği) ve metodun doğruluğudur. Bu parametrelerin değerlendirilmesi için deneyler yapılır. Üretici firmalar yöntemin presizyonu ve doğruluğu ile ilgili bilgi vermekle yükümlü olsa da her laboratuvar yöntemin gerçek performansını kendi düzeni içinde sorgulamalıdır (Fraser ve ark 1992, Alataş Ö ve ark 2004,). Bu konularda mevcut literatür dikkatlice incelenir. Yöntemde üreticinin konu ile ilgili iddiaları da dikkate alınarak uygun aday yöntem belirlenir (Fraser ve Petersen 1993).

2.3.3. Performans Standartları

Metod değerlendirme çalışmalarında amaç, üretici ve laboratuvarın tıbbi gereksinimlerin karşılayıp karşılamadığını sorgulamaktır. Metod değerlendirme çalışmalarıyla metodun özünde var olan analitik hataların oranı belirlenir. Her bir analitin analitik performansı için bir performans standardı vardır. Deneysel olarak saptanan hata, klinik izin verilebilir hata ile mukayese edilir. Deneysel olarak hesaplanan hata, belli konsantrasyon düzeyleri için izin verilebilir hata düzeyinden büyük olursa metodun performansı kötüdür. Kit üreticileri yeni bir yöntem geliştirdiğinde Food and Drug Agency (FDA) bu yöntemin analitik performansının ve kabul edilebilirliğinin tanımlanmasını ister. Performans hedefleri analitin belirli konsantrasyon / konsantrasyonlardaki veya aktivite esaslı yöntemlerde aktivite / aktiviteleredeki müsaade edilen toplam hata (TEa) düzeylerini tanımlamalıdır. Belirli analit konsantrasyonları klinisyenlerin, tanı, tedavi ve izleme kararlarını aldıkları tıbbi karar düzeyinde (X_c) seçilirler. Test sonucunda hata tanısal hataya neden oluyorsa o yöntemin kullanımı reddedilir. Analitik bir hatanın en fazla yanlış tanıya yol açtığı konsantrasyon, tıbbi bir tanının bulunduğu tıbbi karar düzeyidir. Her bir karar düzeyi için analitik performans standardı belirlenmiştir, bunlar karar düzeyi konsantrasyonu (X_c) ve izin verilebilir hata (E_a) olarak ifade edilebilir. İzin verilebilir hata düzeyleri genelde total hatanın %25' olarak kabul edilir (Taga ve ark 2004).

Analitik deneylere başlamadan önce performans standartlarının belirlenmesi şarttır. Metodun geçerliliği, uygunluğu ancak performans standartları ile uyumluluğuna göre belirlenir. İlk başta performans standartları belirlenmeden değerlendirme deneylerinin yapılması, hataların tesbiti ve yöntemin kabul edilebilirliği kararının verilmesi, çalışmanın geçerliliği ve kabul edilebilirliğini olumsuz etkiler. Yöntemin performansını ölçmek için yapılacak deney prosedürleri hazırlanır, izin verilebilir maksimum hata sınırının ne kadar altında bir hata ile yöntemin kabul edileceğine karar verilir. Müsaade edilebilir toplam hata sınırlarının belirlenmesi için değişik kaynaklardan istifade edilebilmektedir. Bu kaynaklar laboratuvar test sonuçlarının tıbbi kullanımından elde edilen profesyonellerin kararları, klinisyenlerin deneyimlerinden faydalanmak için uygulanan klinisyen anketleri, analitin birey içi biyolojik değişkenlik/varyasyon düzeyleri, en ideal performansta çalıştıklarını kanıtlayanın bilgileri ve analitin referans aralık değerlerinin farklılıklarını baz alan bilimsel yayınlardır (Tonks 1963, Barnett 1968).

Kaynaklarda tıbbi izin verilebilir hata oranları ile ilgili değişik bilgiler yer almaktadır. Bernet isimli araştırmacı tıbbi olarak izin verilebilir standart deviasyon listesi hazırlamıştır (OSHA regulations on cadmium surveillance 1968). Enzimler için limitin %20, hormonlar için %25'e çıktığı bildirilmiştir (Westgard ve ark 1974). Tanks'a göre izin verilebilir hata referans aralığının %10'u olarak bildirmiştir. Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ağır metaller için izin verilir hata sınırı ile ilgili veriler yayınlamıştır (Westgard 1998). Bu konuda en kapsamlı tanımlamayı 1988 yılında Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) yapmıştır. Ehrmeyer ve arkadaşları bias ve internal değişkenlik/varyasyon katsayılarının CLIA sabit sınır hedeflerinin 1/3' düzeyinde tutulmasını önerirler. Bernet ve Westgard'ın daha sonra yaptıkları öneri ise değişkenlik/varyasyon katsayılarının CLIA sınırlarının 1/4'n geçmemesi şeklinde dir (Kaplan ve ark 2003).

2.3.4. Seçilen Yöntemin Değerlendirilmesi

Laboratuvarlarda kullanılabilen ölüm yöntemi belirlendikten sonra bu yöntemin llebilir özellikleri, deneylerle karar kriterlerine göre değerlendirilir. Bu deneylerde dört aşamada uygulanabilir.

a- Yöntemin tanınması ve hazırlanması

- Çalışma prosedürlerinin oluşturulması
- Ölüm aralığının kontrolü
- Kalibrasyon
- En düşük değeri saptama sınırının kontrolü

b-n değerlendirme deneyleri

- Çalışma grubu içi değişkenliğin saptanması
- Etkileşim (interferans, girişim) deneyleri
- Geri elde (recovery, geri kazanım deneyleri)
- Analitik olarak kabul etme kararı

c-Son değerlendirme deneyleri

- Tekrarlanabilirlik için deneyler (oklu lmler)
- Yöntem karşılaştırma deneyleri
- Analitik geçerlilik kararı
- Referans aralıklarının kanıtlanması
- Dökümantasyon

d-Uygulama hazırlıkları ve hizmete koyma

- Kalite kontrol prosedürlerinin seçimi
- Kalite kontrol çizelgelerinin hazırlanması
- Ölçüm prosedürlerinin hazırlanması ve yazılması
- Görevlilerin eğitimi
- Yöntemin hizmete sokulması
- Günlük performansın izlenmesi

2.3.5. Ölçüm Aralığının Kontrolü

IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) analitik aralığı bir örneğin modifikasyonsuz uygulanabildiği konsantrasyon aralığı olarak tanımlar. Bu yöntemin ölçülebildiği en düşük konsantrasyonu belirler. Bunun altındaki bir değer sayısal olarak raporlanamaz. Linearite çalışması en az 3 konsantrasyon için yapılmalıdır. Öncelikle, yöntemin ideale yakın bir matriksteki performansının değerlendirilmesi için aköz örnekle çalışılmalı, ardından doğal biyolojik matriks (serum veya idrar) kullanılmalıdır. Yöntem ideal çalışıyorsa aköz ve doğal matriks arasında fark olmamalı ya da kabul edilebilir limitlerde olmalıdır. Genellikle linearite sınırını aştığı bilinen insan serum örneğine analit içermeyen ve matriksi bozmayan materyalle dilüsyonlar yapılır. Seri dilüsyon önerilmez çünkü bir konsantrasyonda olabilecek volümetrik hatalar buradan sonrakileri etkiler. Yüksek konsantrasyonlu örnekten her örnek direkt dilüsyonla hazırlanmalıdır. Deneyin sonunda olması gerekenler X eksenine, bulunan değerler Y eksenine yazılarak lineer performans değerlendirilmesi yapılır. Oluşan eğrinin düz kısmı yöntemin lineer kısmına karşılık gelir (Fraser ve Petersen 1992, Taga ve ark 2004).

2.3.6. Analitik Hatalar

Yöntem performansının kanıtlanması veya yöntemin geçerliliği deneyleri, aslında analitik hataların değerlendirilmesidir (Taga ve ark 2004). Bir metod değerlendime çalışması en az hatalı metodu bulmak için değil, seçilen metodun kabul edilebilir düzeyde hatalı olup olmadığını anlamak için yapılır. Metod değerlendirme işlemi tek bir hasta örneğinde olabilecek analitik hatanın büyüklüğünü tahmin etme işlemidir (Fraser 1992).

Analitik hatalar rastgele hata, sistematik hata ve toplam hata olmak üzere üç çeşittir.

Sistematik hata: Ölçülen miktar ile gerçek değer arasındaki uyumun bir ölçütüdür. Sürekli yüksek veya düşük hata demektir. Sistematik hatalar sabit hata ve oransal sistematik hata olmak üzere iki tiptir. Sabit sistematik hata aynı miktarda, tek yönlü ve analit konsantrasyonundan bağımsızdır. Oransal sistematik hata analit konsantrasyonu değiştikçe değişir ve analit konsantrasyonunun yüzdesi olarak değişim gösterir (Westgard ve Hunt 1973). Sabit sistematik hataya, tüm örneklerde veya reaktiflerde bulunan ve yanlış sinyal oluşturan bir interferan madde sebep olur. Hata pozitif ya da negatif olabilir. Oransal sistematik hata, genellikle kalibratör bilgilerindeki yanlışlıktan kaynaklanır. Eğer kalibratör değeri gerçek değerinden düşük alınırsa tüm sonuçlar orantısız şekilde düşük bulunur (Fraser ve Petersen 1993, Kaplan ve ark 2003, Alataş ve ark 2004).

Rastgele hata: Bir analitik metodun tekrarlayan ölçümlerde, aynı örnek için aynı sonucu elde edebilme özelliği yöntemin kesinliği (presizyonu) veya rastgele analitik hata olarak adlandırılır. Bu terimler merkezi eğim etrafında sonuçların rastgele dağılımını ifade eder. Verilerin ortalama etrafında dağılım ölçütü olan standart sapma düzeyi (SD) rastgele hatanın göstergesidir (Westgard ve Hunt 1973, Bookbinder Panosian 1987, Fraser ve Petersen 1993). Rastgele hataya neden olacak faktörler ölçümün tekrarlanabilirliğini etkiler. Bunlar aletin instabilitesi, ısıdaki değişimler, reaktif ve kalibrasyon eğrisi ile kalibratörlerin stabilitesindeki değişim, pipetleme, karıştırma ve zamanlama farklılıkları, operatördeki değişikliklerdir.

Toplam hata: Sistematik hata ve rastgele hatanın toplamıdır. Toplam hata analitik kalitenin kabul edilebilirliğini belirleyen ve sonuç olarak yöntemin hedeflenen klinik kullanıma uygunluğu kararını aldırان bir değerdir. Toplam hata rastgele ve sistematik hatalar aynı yönde olduğu zaman hatanın ne kadar büyük olduğunu gösterir (Westgard ve Hunt 1973, Alataş ve ark 2004).

2.3.7. Yöntem Performansını Değerlendirme Deneyleri

Kullanıcı minimum deneysel işle, yöntemin performansının kabul edilebilirliği konusunda etkin karara varmak zorundadır. Hataların sayısal olarak

ayını için daha basit ve ucuz sonra daha komplike ve pahalı deneyler sırasıyla yapılmalıdır. İlk basamakta bulunan hatalar, izin verilen hatadan düşükse ikinci basamak deneylere geçilir.

Tablo 2.1. Yöntem performansını değerlendirme deneyleri

Hatanın tipi	İlk basamak	Son basamak
Rastgele hata	Çalışma-içi	Çalışma-arası
Sabit hata	İnterferans	Karşılaştırmalı
Oransal hata	Geri elde	Karşılaştırmalı

Tablo 2.2. Metod değerlendirme çalışmaları sonucunda hata tahminlerinin kabul kriterleriyle olan ilişkisi

Hata Tipi	Deney	Kriter
Rastgele hata	Replikasyon	$S_{obs} < SA$ ya da $4 \times S_{obs} < TEA$
Oransal hata	Recovery	$(R-100)/100 \times X_c < BA$
Sabit hata	İnterferans	$Bias < BA$
Sistematik hata	Metod karşılaştırma	$(a+bX_c) < BA$
Toplam hata	Replikasyon ve Metod karşılaştırma	$4 \times S_{obs} + (a+bX_c) - X_c < TEA$

Sobs: Replikasyon deneyinde bulunan SD

R:Recovery deneyinde bulunan ortalama recovery

a: Y intercept, Regresyon analizi ile bulunur

b: Slop, Regresyon analizi ile bulunur

Xc: Tıbbi karar düzeyi

SA: İzin verilebilir SD

BA: İzin verilebilir bias

TEA: İzin verilebilir total hata

2.3.7.1. Rastgele Hata ve Replikasyon Deneyleri

Presizyon genellikle replikasyon deneyleri ile bulunur. Kesinliğin hesaplanması için aynı örnek ard arda en az 20 kez analiz edilir ve SD hesaplanır (Fraser ve Petersen 1993, Kaplan ve ark 2003). İlk önce çalışma-içi (Within-run) replikasyon deneyi uygulanır. Aynı materyal aynı analitik çalışma içinde arka arkaya çalışılır ya da bir seri örnek aynı çalışma içinde çift çalışılır ve çiftlerin SD'si bulunur. Eğer SD izin verilebilir SD'den küçükse hata kabul edilebilir. Rastgele hata $4 \times SD$ formülü ile bulunur, tahmini rastlantısal hata izin verilebilir hatadan düşüğe hatanın kabul edilebilir olduğuna karar verilir. Daha sonra ikinci basamak deneye geçilir. Bu çalışmalar arası (between-run) presizyon deneyidir. Within-day (gün-içi) ve between-day (günler arası) olarak ikiye ayrılır.

Gün-içi presizyonda, aynı örnek aynı gün içinde ancak farklı analitik çalışma içinde çalışılır. Burada performansı etkileyen faktörler kalibrasyonlar tekrarlanırken oluşan farklılıklar, kalibratör ve reaktiflerdeki değişiklikler ve çalışanların gün içinde gösterdiği performans değişiklikleridir.

Günler arası (between-day) presizyonda ise aynı örnek farklı günlerde çalışılır. Farklı operatörlere göre yöntem performansının değişiminden, enstrümandaki günden güne değişikliklerden, farklı pipetlerden, sıcaklıktaki farklılıklardan veya diğer laboratuvar değişimlerinden en fazla etkilenen kesinlik değeridir (Fraser ve Petersen 1993, Kaplan ve ark 2003, Alataş ve ark 2004).

2.3.7.2. Sabit Sistemik Hata ve İnterferans Deneyleri

Yöntemin herhangi bir basamağında olumsuz yönde etki gösteren maddelerin yarattığı etkiye bozucu etki (interferans) denir. Bozucu etkenler çoğunlukla lipemi, hemoliz, ikter, ilaçlar, patolojik durumlarda miktarı artan maddeler olup sabit hataya neden olurlar (Alataş ve ark 2004, Fraser CG 1992). İnterferans deneyleri recovery çalışmalarına benzer şekilde yapılır. Analiz yapıldıktan sonra, bozucu etkisi incelenecek maddeler örneklere ilave edilir. Eklenen hacim örnek hacminin % 10'undan az olmalı ve orjinal matriksi bozmamalıdır. Aynı miktardaki örneğe materyalin eklendiği hacimde dilüent eklenir. Her iki örnek analiz edilir. Aradaki fark saptanır. Bu fark analit için izin verilebilir hatadan küçükse interferan maddenin etkisi kabul edilebilir sonucuna varılır (Fraser ve Petersen 1993).

Hemolizin interferan etkisinin araştırılması için aynı kan örneği iki parçaya bölünerek, ilki santrifüj edilip sonra analiz edilir. Bu bazal örnektir. Diğer örnekte tüp içinde eritrositler fiziksel olarak travmatize edilerek hücre membranları parçalanır ve hemogloblin açığa çıkartılır. Santrifüjden sonra bu hemolizli örnek analiz edilir. İki örnek arasındaki fark hemolizin etkisidir.

Lipeminin etkisini araştırmak için, lipemik örnek iki parçaya ayrılır, birincisi direkt ölçülür, diğeri lipoproteinlerin ayrılması için ultrasantrifüje edilir. Sonuçlar arasındaki fark lipeminin yol açtığı interferanstır. Alternatif olarak her bir karar düzeyi konsantrasyonu için bulanık örnekler hazırlanabilir. Bunun için az miktarda lipid içeren materyaller (örneğin lyposin) lipemik olmayan örneklere eklenerek hafif, orta ya da ileri düzeylerde lipemik örnekler elde edilir. Temel konsantrasyonlar orjinal örneğe eşit hacimde su eklenerek hazırlanır (Fraser 1992, Fraser ve Petersen 1993).

Bilirubinin stok çözeltisinden belirli miktarlar eklenerek çeşitli konsantrasyonlarda unkonjuge bilirubinli örnekler hazırlanabilir. Berrak nonikterik hasta serumuna bu bilirubinli örneklerden eklenir. Bazal örnekler, orjinal örneğe eşit miktarda su eklenerek hazırlanır ve sonuçlar karşılaştırılır. Bu teknikte analizde suda çözünen konjuge bilirubinin etkisi araştırılmaz.

İnterferans çalışmalarında dikkat edilmesi gereken noktalar vardır: Pipetleme doğru ve tekrarlanabilirliği yüksek olmalıdır. Eklenen interferan madde miktarı doğru olmalıdır. Örnekte esas ölçümü yapılacak analitin konsantrasyonu tıbbi karar seviyesinde veya yakın olmalıdır.

İnterferans deneylerinde sabit hata hesaplaması;

Eklenen konsantrasyon=Standartın konsantrasyonu x Standartın hacmi/Total hacim

İnterferans=Testin konsantrasyonu - Bazal konsantrasyonu

Sabit hata=İnterferans

Sabit hata<izin verilebilir hatada ise interferan maddenin etkisinin kabul edilebilir düzeyde olduğuna karar verilir (Fraser 1992,Fraser ve Petersen 1993).

2.3.7.3. Oransal Sistematik Hata ve Geri Kazanım Deneyleri

Geri kazanım bir analitik yöntemin konsantrasyonu bilinen örneklerle bilinen miktarlarda eklenen analiti, doğru olarak ölçme kapasitesidir. Geri kazanım ölçümleri bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgiyi sağlar. Çünkü içeriği bilinen örneğin doğasında bulunan tüm diğer bileşiklerin varlığında, analiti ne derece ölçtüğü bilgisi elde edilir (Kaplan ve ark 2003). Geri kazanım deneylerinde, interferans deneylerinde olduğu gibi örnek iki eşit parçaya bölünür. Biri bazal örnektir, diğeri test edilecek örnektir. Bu örneğe analit içeren stok solüsyondan eklenir, bazal örneğe de aynı hacimde dilüent eklenir ve her iki örnek analiz edilir. Ekleme yapılan örnek ile baseline örnek arasındaki fark eklenen analit miktarını verir. Örnek matriksini çok fazla etkilememesi için eklenen analitin hacmi örnek hacminin %10'undan az olmalıdır. Eklenen analit miktarı hacimden hesaplandığı için pipetlemenin doğru yapılması çok önemlidir.

Oransal hata şu şekilde hesaplanır:

Eklenen konsantrasyon=Standartın konsantrasyonu x Standartın hacmi/Total hacim

Geri elde edilen konsantrasyon=Testin konsantrasyonu – Bazal konsantrasyon

% Geri elde edilen miktar = Geri elde edilen miktar/Eklenen miktar

Oransal hata (OH) = % 100 - % geri elde edilen miktar

Örneğin ve eklenen analitin hacmi metodun tıbbi karar düzeylerindeki performansını test edecek miktarda olmalıdır. Bazen çok az miktarda analit eklenir ve metodun belirsizliği içinde geri elde edilen miktar kaybolur.

Oransal hata, konsantrasyon cinsinden hesaplanmadığı için direkt olarak izin verilebilir hata ile karşılaştırılmaz. Tıbbi karar düzeylerinde oransal hata konsantrasyon ünitesine çevrilir. Eğer oransal hata izin verilen hatadan küçükse performans kabul edilebilir (Fraser 1992).

2.3.7.4. Sistematik Hata ve Yöntem Karşılaştırma Deneyleri

İkinci basamak deneylerindedir. Ortalama sistematik hatanın hesaplanmasını sağlarlar. Aynı zamanda sistematik hatanın sabit veya oransal olup olmadığı hakkında bilgi elde edilebilir. Hasta örnekleri toplanır. Örnekler hem aday yöntemle hemde daha önce kullanılmış ve doğruluğu kanıtlanmış yöntem ile analiz edilir. Doğru

olmama 'inaccuracy' veya bias terimleri karşılaştırılan yöntemler arasında uyum olmadığını ifade ederler. Sabit ve oransal hatalar yöntem karşılaştırma deney sonuçlarının, y ekseninde aday yöntem verileri, x ekseninde referans yöntem ve/veya gerçek değerleri belirtmek üzere çizilen grafiklerden kolaylıkla saptanabilir.

Bu tür çalışmalarda 40 ile 200 arası örnek toplanarak herbiri iki kısma ayrılır ve performansları karşılaştırılacak yöntemler ile analiz edilir. Tıbbi koşullar, hastalığın türü ve örneğin analiz aralığı örnek sayısından daha fazla önem taşımaktadır. O halde uygun koşullarda saklanmış örnekler kullanılmalıdır. Örneklerin beklemesinden doğabilecek hataları önlemek için örnekler her iki yöntem ile 4-6 saat içinde çalışılmalıdır. Her iki yöntemde hastalar çift çalışılmalıdır, aynı yöntemde çift çalışmalardan biri farklı bulunursa da tekrarlanmalıdır. Eğer farklılık tekrarda da ısrar ederse, hasta ile görüşülüp neden olabilecek (hastalık, ilaç vs) faktörler sorgulanmalıdır.

2.3.8. Veri Analizleri

X ekseninde referans yöntem değerleri, Y ekseninde aday yöntem verileri olacak şekilde sonuçlara ilişkin grafik çizilir. Test ve karşılaştırılan metod arasındaki sistematik farklılık, en basit şekilde verilerden elde edilen bias (fark) değerlendirilerek bulunur. Bias, test metodunun bulduğu ortalama ile karşılaştırılan metodun bulduğu ortalama arasındaki farktır.

$$\text{Bias} = \sum(Y_i - X_i) / N$$

Bias iki metod arasındaki farkın büyüklüğünü verir ve her iki yöntemle alınan sonuçların tek tek farklılıklarının toplamının denek sayısına bölünmesi ile hesaplanır. Farkların standart deviasyonu SD, replikasyon deneylerindeki SD'nin hesaplanmasına benzer şekilde yapılır. SD her bir farkın gerçek biastan ne kadar saçıldığını gösterir.

$$Sd = \sqrt{\sum(Y_i - X_i - \text{bias})^2 / (N - 1)}$$

Biasın istatistiksel önemi yani sıfırdan farklı mıdır değil midir hesabı t testi ile yapılır.

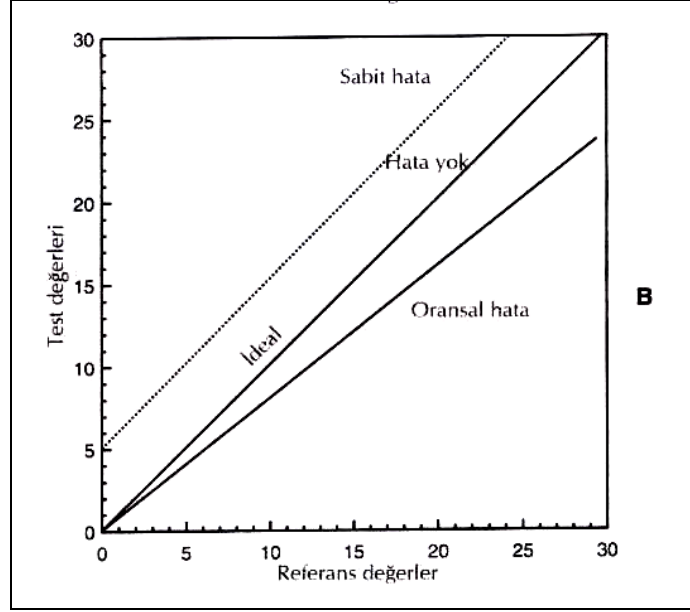
$$t=(\text{Bias}\sqrt{N})/Sd$$

t değeri sistematik hatanın rastgele hataya oranıdır. Hesaplanan t değeri ile tablodaki t değeri karşılaştırılır. Eğer t hesap > t tablo ise iki metod arasında fark olduğu anlaşılır. Eğer t hesap < t tablo ise karşılaştırılan metodlar arasında fark olmadığı sonucuna varılır. Kabul edilebilirlik kararı tek başına t değerine bakılarak verilmemelidir. Çünkü yüksek bias ve yüksek SD birlikte önemsiz bir t değeri verebilir. Biasta hem oransal hemde sabit hata birlikte bulunur. Oransal hata SD'yi artırır. Bu nedenle oransal hata varlığında, bias sistematik hatayı tahmin etmede kullanılmamalıdır.

Metod karşılaştırma deneylerinde kullanılan bir diğer istatistik analiz korelasyon katsayısıdır. Korelasyon katsayısı (r değeri) iki değişken arasındaki ilişkiyi saptayan lineer regresyon istatistiğidir. İdeal olanı r = 1 olmasıdır. İki metod arasında mükemmel pozitif korelasyon olduğunu gösterir. Eğer r değeri 0 ise iki metod arasında korelasyon yoktur. Korelasyon katsayısı analitin konsantrasyon aralığından etkilenir (Holick 2004). Geniş aralık veri dağılımından bağımsız olarak 1'e daha yakın değerler verir. Korelasyon katsayısı diğer istatistiklerle beraber kullanılır ancak metodun analitik performansı hakkında tek başına karar vermez, r değeri basitçe iki metod arasında korelasyon olup olmadığını gösterir (Fraser ve Petersen 1993).

2.3.9. Linear Regresyon Analizi:

Analiz verileri X eksenine, karşılaştırma sonuçları Y eksenine yazılır ve sonuçlara ilişkin grafik çizilir. Eğer test metodu ve karşılaştırılan metod uyum içindeyse X:Y grafiği doğrusal olur. Regresyon denklemi $y=a+bx$ 'tir. Metodlar arasındaki oransal hatanın belirlenmesinde eğim (b), sabit hatanın belirlenmesinde y-eksenini kesme noktası (a) ve rastgele hatanın saptanmasında standart sapma (Sy/x) kullanılmaktadır. Orantısal hatanın olmadığı ideal eğride eğim (b) 1'dir. Denklemden, kullanılacak X değerine (Xc) karşılık Y değeri, $Yc=a+bXc$ denklemi ile hesaplanır ve sistematik hata $Xc-Yc$ arasındaki farktan hesaplanır. ($SH=Yc-Xc$). Gözlenen sistematik hataya, saptanan standart sapmanın 2 katı ilave edildiğinde toplam hata elde edilmektedir ($TH=SH+2Sobs$). Sonuç olarak bu değer kabul edilebilir hatanın altında ise yöntemin performansı kabul edilebilir (Taga ve ark 2004, Bookbinder ve ark 1987, Westgard 1998).



Şekil 2.6. Sabit ve oransal sistematik hata türlerinin görüntüleri

Analitik hataları ve etkiledikleri istatistik ölçütleri kısaca şöyle özetleyebiliriz;

<u>Rastgele hata</u>	<u>Sabit hata</u>	<u>Oransal hata</u>
Sy/x	a	b
Sd	Bias	Bias
R		Sd

Her ölçüm yöntemi kullanılacak laboratuvar koşullarında değerlendirilmelidir. Bir ölçüm yönteminin çok sayıda özelliği ve etkileyeni bulunmaktadır. Her bir yöntemin iyice incelenmesi gereklidir. Özellikle reaktif ve analitler açısından çok değişkenlik söz konusudur. Bu açıdan klinik laboratuvar analiz metodlarının çok ayrıntılı değerlendirilmesi gerekmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1. Cihazlar

- Tandem MS (ABSCIEX API 3200) (Singapore)
- HPLC { (SHIMADZU UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20 AD (A pompası), LC-20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT (oto sampler) }(Japan)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra™ X-2212)
- Vortex (Heidolph, Germany)
- Evaporator (Teknosem TEB 40-WEL WT)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand)
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (Rayto Microplate Washer RT-2600, Rayto Microplate Reader RT-2100Cmarka)

3.1.2. Kimyasallar

- Nitrojen tüpü (Habaş)
- HPLC kolonu (Retsek pinnacle marka DB C8, 50x4,6mm, 3µm. ters faz)
- 17-OHP standardı {Sigma;H5757-5g (Lot:041M1713V) }
- İnternal standart {(d₈) (2,2,4,6,6,21,21,21-d₈,%98) Cambridge DLM-6598-PK (Lot:I-16281) }
- Metanol {Merck: 1655907 237 (Darmstadt, Germany) }
- HPLC grade su {Th. Geyer Lot: Q2A085192A (Darmstadt, Germany) }
- Formik asit {Sigma: BCBB5500V (Switzerland) }
- Dietil eter {Merck: K43976621 245 (Darmstadt, Germany) }
- Etil asetat {Merck: K41554264 043(Darmstadt, Germany) }
- Bilirubin (Sigma: 4126)
- Trigliserid (Sigma: 17811)
- NaH₂PO₄ 2H₂O (Sigma: 82470, Germany)
- NaCl (Merck: K40124804 919, Darmstadt, Germany)
- Na₂HPO₄ (Merck: F1576286 915 Darmstadt, Germany)
- Albumin fraction V (Merck: K38566318 816 Darmstadt, Germany)

17-OHP hormon testi için, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ABSCIEX API 3200 Likid kromatografi-kütle spektrometri (LC/MS/MS) ölçüm yöntemi için metod değerlendirme çalışması yapıldı. Bu metod ELISA ölçüm yöntemi ile karşılaştırıldı.

3.2. Analiz Yöntemleri

3.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Ölçüm Yöntemi

3.2.1.1. ELISA Prensibi

Katı faz üzerine bağlanmış 17-OHP antikoruna bağlanmak için 17-OHP, yaban turpundan üretilen peroksidaz ile yarışır. ELISA kuyucuklarına konulan serumlar belli inkübasyondan sonra yıkanır. Bağlı olanlar kalırken serbest olanlar yıkama ile uzaklaştırılır. Sonra üzerine enzim substratı (H_2O_2) ve tetrametilbenzidin (TMB) substrat ilave edilerek renklenmesi beklenir. Daha sonra reaksiyon stop solüsyonu eklenmesi ile durdurulur ve oluşan rengin absorbansı 450 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda ölçülür. Kalibrasyon grafiği esas alınarak konsantrasyon hesaplanır. Konsantrasyon ile renk yoğunluğu ters orantılıdır.

3.2.1.2. ELISA Prosedürü

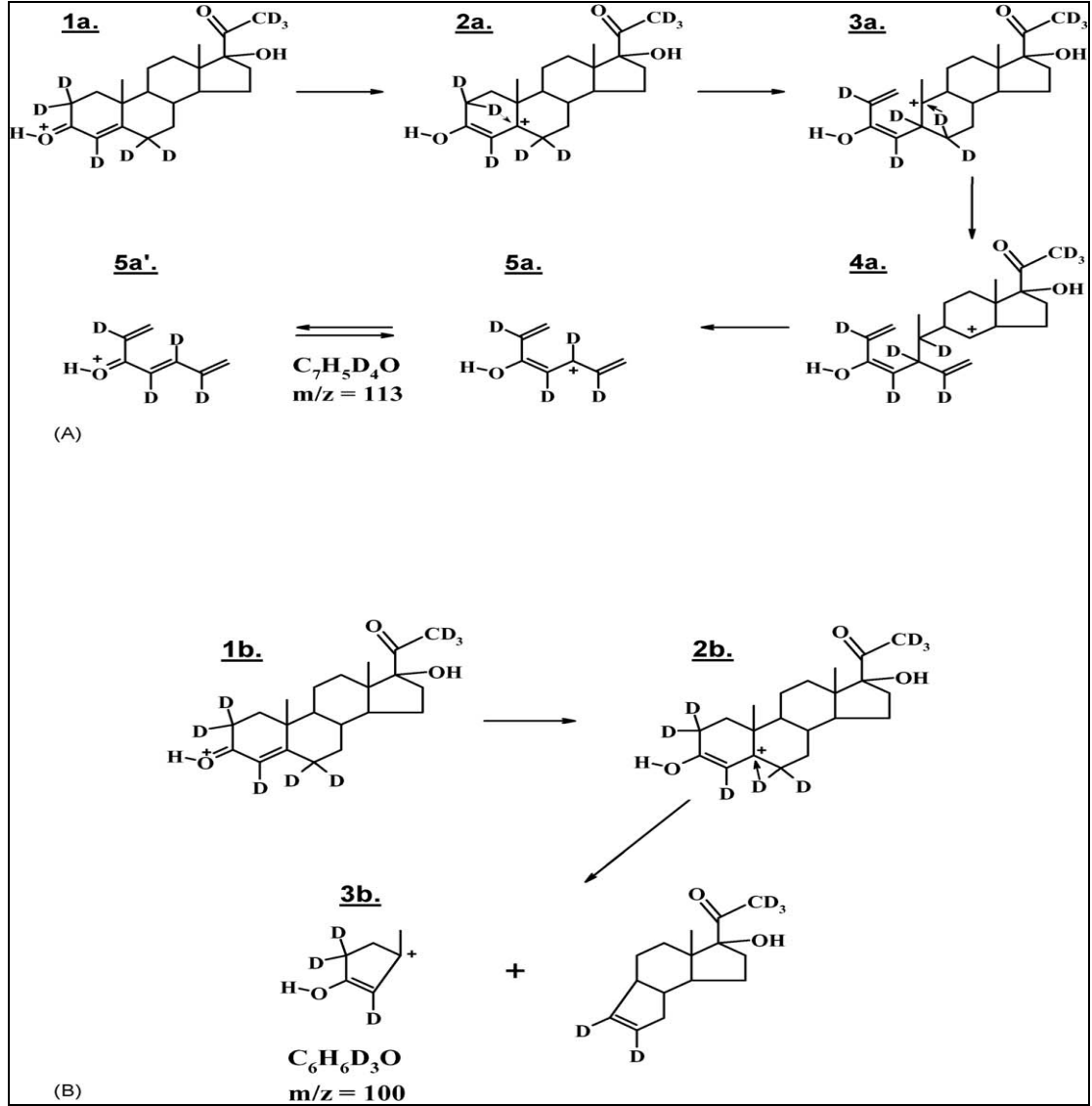
Standart 17-OHP konsantrasyonları hazırlandıktan sonra ELISA plate'nin her bir kuyucuğuna ayrı ayrı olmak üzere 50 μ L standart ve numune konuldu. Numune ve standart kuyucuklarına 50 μ L konjugat ilave edilip 37°C de 1 saat bekletildi. Daha sonra kalibratör, numune ve blank'in üzerine 100 μ L TMB substrat ilave edildi. Oda ısısında (22-28°C) 15 dakika bekledikten sonra tüm kuyucuklara 100 μ L stop solüsyonu eklenip karıştırıldı ve 450 nm dalga boyunda absorbans alınıp kalibrasyon grafiğine göre konsantrasyonlar hesaplandı.

3.2.2. LC-MS/MS Prensip ve Yöntemi

3.2.2.1. Ölçüm Prensibi

Bu yöntem 17-OHP'nin serumdan ekstraksiyondan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır. Ölçüm sırasında tandem MS'in Q1 quadropolünde ana iyonlar taranır, Q2 quadropolde ana iyon fragmanlarına parçalanır ve Q3 quadropolde ise yavru iyonlar taranarak analizi yapılan analitin daha doğru tanımlanması sağlanır. Kütle dedektöründe saptanacak iyon fragmanlarının sayısının artırılması analizin

daha hassas olmasını sağlar. Şekil 3.1. de 17-OHP için iyonizasyon sonrası ana ve yavru iyonların örnek bir oluşumu gözlenmektedir. Michele L. Etter ve arkadaşları yaptıkları iyonizasyon ile 17-OH progesteronun ana ve yavru iyonlarını göstermişlerdir.



Şekil 3.1. d_8 -17-OHP. (A) $m/z = 339-113$ ve (B) $m/z = 339-100$ için parçalanma mekanizmaları (Etter ve ark 2006).

ABSCIEX API 3200 tandem mass spektrometresi 5.5 kV voltajında ve 600 °C sıcaklığında çözünürlükle çalışan Turbo Ion Spray Elektrospray (ESI) kaynaklı bir pozitif mod kullanıldı. Analitlerin tesbiti için MRM modu kullanıldı. Her analit için iki MRM (Multiple-Reaction Monitoring) geçişi ve internal standart monitorize edildi. MRM modu ikişer tane seçilerek piklerin çıkma zamanları teyit edilmiş oldu.

17-OHP için m/z 331.4/109.2 – 331.4/97.125 d₈-17-OHP için 339.1/99.9 ve 339.1/113.2 MRM modları kullanıldı.

3.2.2.2. LC/MS/MS Ölçüm Yöntemi

Tablo 3.1. LC-MS/MS parametreleri

LC-MS/MS PARAMETRELERİ	
Declustering Potential (DP)	44
Entrance Potential (EP)	7.3
Collision Energy (CE)	33
Collision Cell Exit Potential (CXP)	4
Curtain Gas (CUR)	10
Collision Gas (CAD)	6
Ionspray Voltage (IS)	5500 V
Temperature (TEM)	600°C
Ion Source Gas1 (GS1)	50
Ion Source Gas2 (GS2)	60
İnterface Heater	On
Ionisation Mode	Electro Sprey İyonizasyon (ESI)
Ionisation Source	Turbo Spray
Collision Gaz Olarak	N ₂
Dwell Time	150 milisaniye
Pompa Modu	Binary Flow
Total Akış	0.6 mL/dk

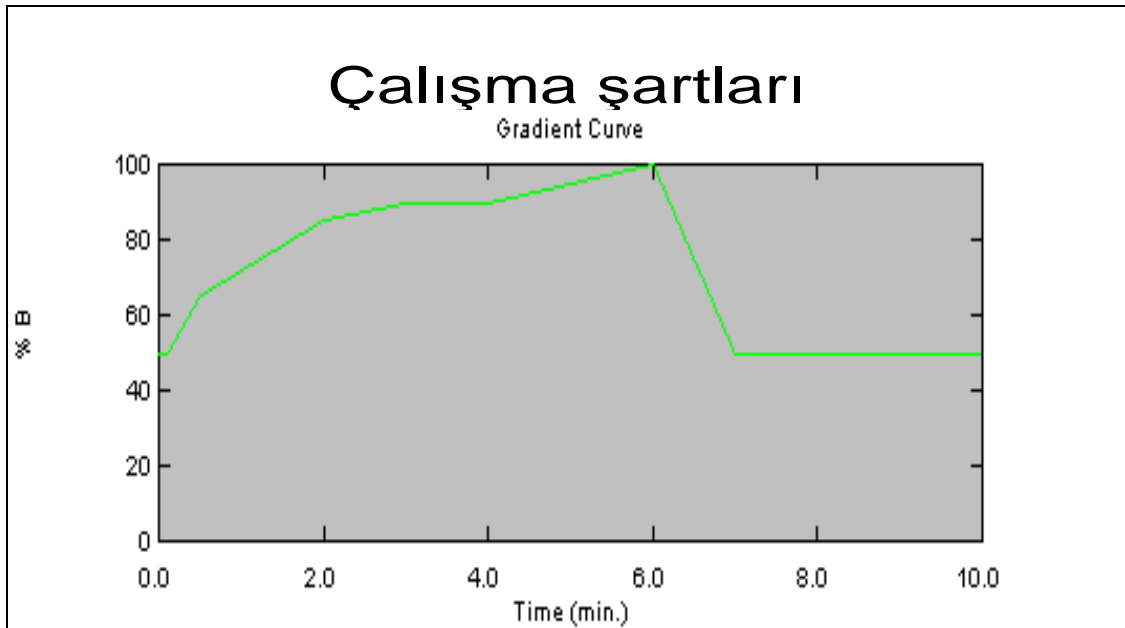
17-OHP saf metanolde çözdürülüp Q₁ ve Q₃ iyonlarının tayini ABSCIEX API 3200 tandem mass spektrometri cihazında AutoTune algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre 17-OHP için en yüksek intensiteye sahip Q₁ ve Q₃ iyonları 331.4/109.2-331.4/97.125 olarak tesbit edildi. İzotop (d₈) için ise en yüksek intensiteye sahip iyonlar 339.1/99.9 ve 339.1/113.2 olarak bulundu. LC-MS/MS parametreleri Tablo 3.1. deki gibi ayarlandı.

Analizi yaptığımız High Performance Liquid Chromotography (HPLC) cihazı SHIMADZU UFLC marka olup DGU-20 A3 (degasser), LC-20 AD (A pompası), LC-20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT (oto sampler) bileşenlerinden

oluşmaktadır. Ayrıca tandem MS sistemimizde fırın (CTO-10 AS vp) bulunmakta olup analiz sırasında fırın sıcaklığı kullanılmadı. Mobil faz için iki farklı eluent kullanıldı. Mobil faz A olarak su ve mobil faz B olarak ise içerisinde % 1 oranında formik asit eklenmiş metanol kullanıldı. Akış hızı 600 µL/dk ve her numune için 40 µL örnek enjekte edildi. Analitleri kolondan elue etmek için metanol gradienti kullanıldı. Akış Gradienti Tablo 3.2. deki gibi oluşturuldu. Toplam çalışma süresi 10 dakika olarak belirlendi.

Tablo 3.2. Mobil faz akış gradienti (Gradient pompa B ye göre yapılmıştır.)

Mobil Faz Akışı (Gradient)	
Zaman	% akış
0.1	50
0.5	65
2	85
3	90
4	90
6	100
7	50
9.5	50
10	50



Şekil 3.2. Mobil faz akış gradientin grafiği

Standard Hazırlama

Stok1: Liyofilize standart 100.000 ng/mL olacak şekilde saf metanolde çözüldü.

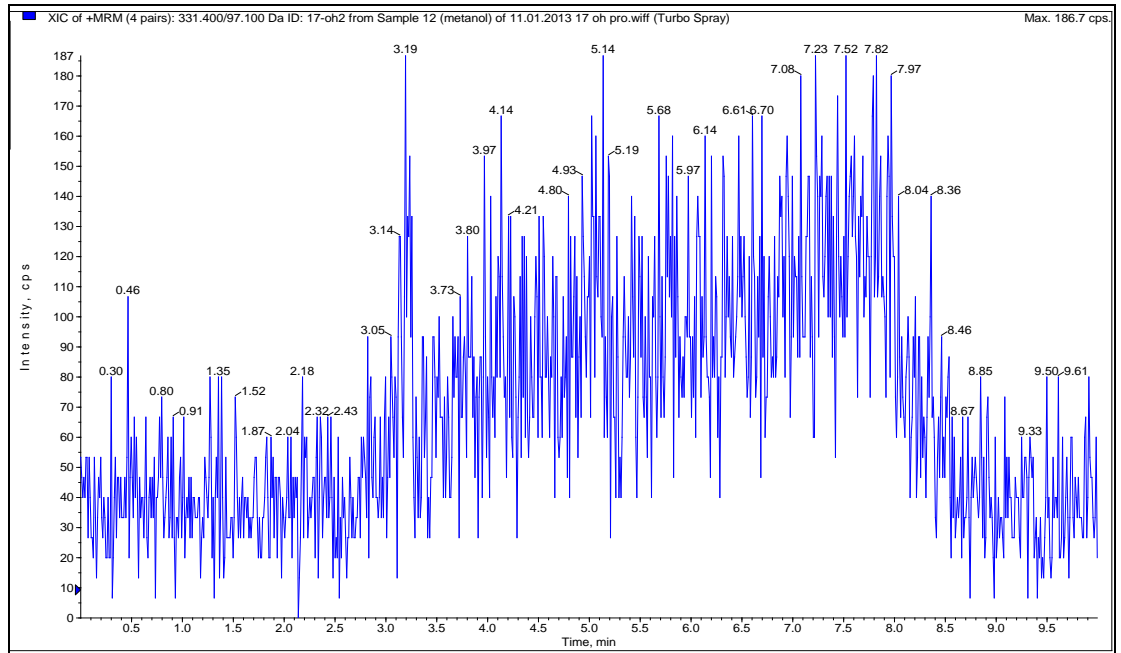
Stok2: Stok1'den 1500 ng/mL olacak şekilde saf metanolla dilüsyon yapıldı.

Stok3: Stok2'den 500 ng/mL olacak şekilde %70 lik metanolla/su (70/30) ile dilüsyon yapıldı.

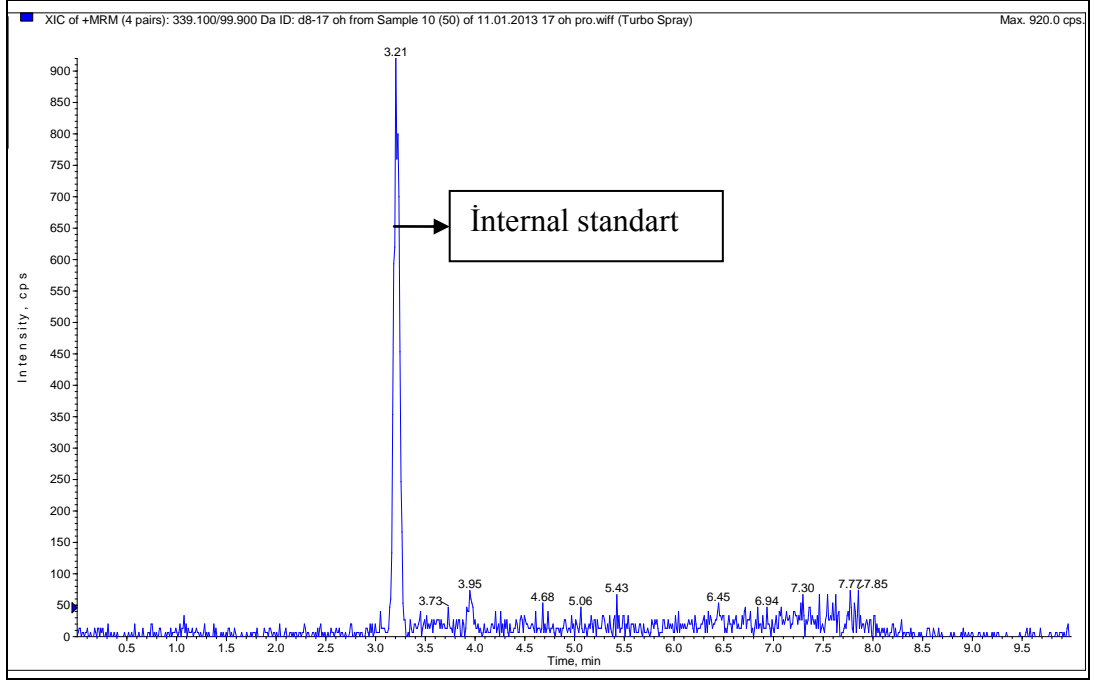
Bovin Serum Albumin-Standart Buffer (BSA-PBS), 0,1M PBS, %1 BSA, %0,9 NaCl, pH 7.4: Çözelti 1.134g Na₂HPO₄, 0,302g NaH₂PO₄ 2H₂O, 0.9 g NaCl, 1 g sığır serum albumin 75 mL HPLC grade suda önce çözdürüldü. Sonra 100 mL hacime tamamlandı pH ise NaOH ve HCl ile 7.4 'e getirildi.

Stok 3'den BSA-PBS kullanılarak standartlar hazırlandı.

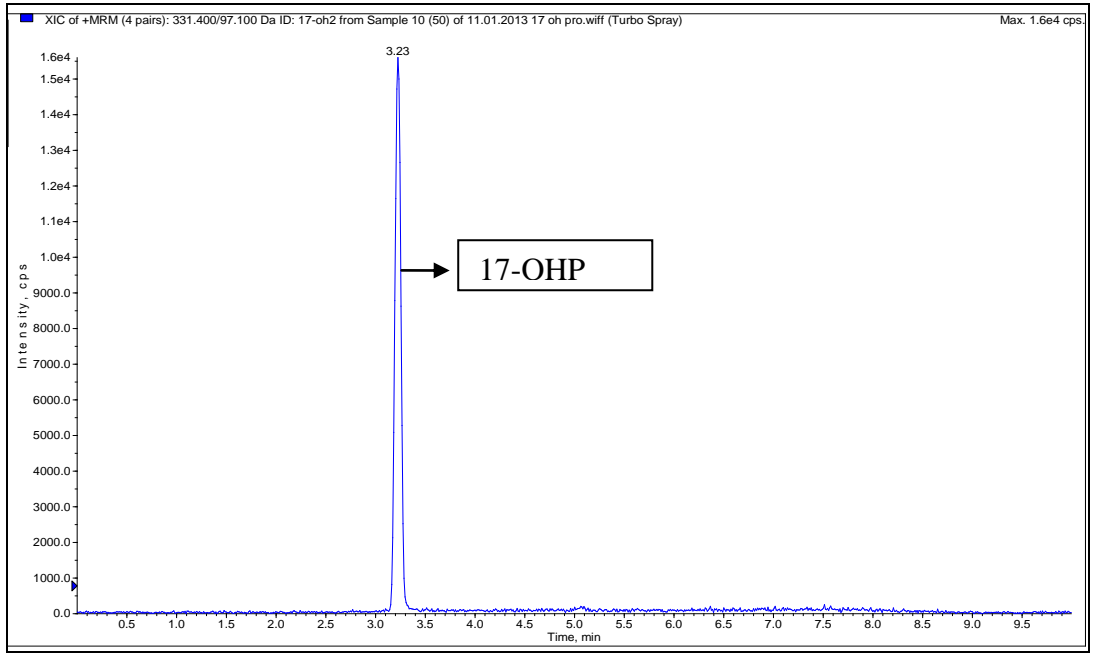
Hazırlanan standartlarla kütle spektrometresinde pikler elde edilmiştir (Şekil 3.3. , Şekil 3.4. , Şekil 3.5. , Şekil 3.6. , Şekil: 3.7.).



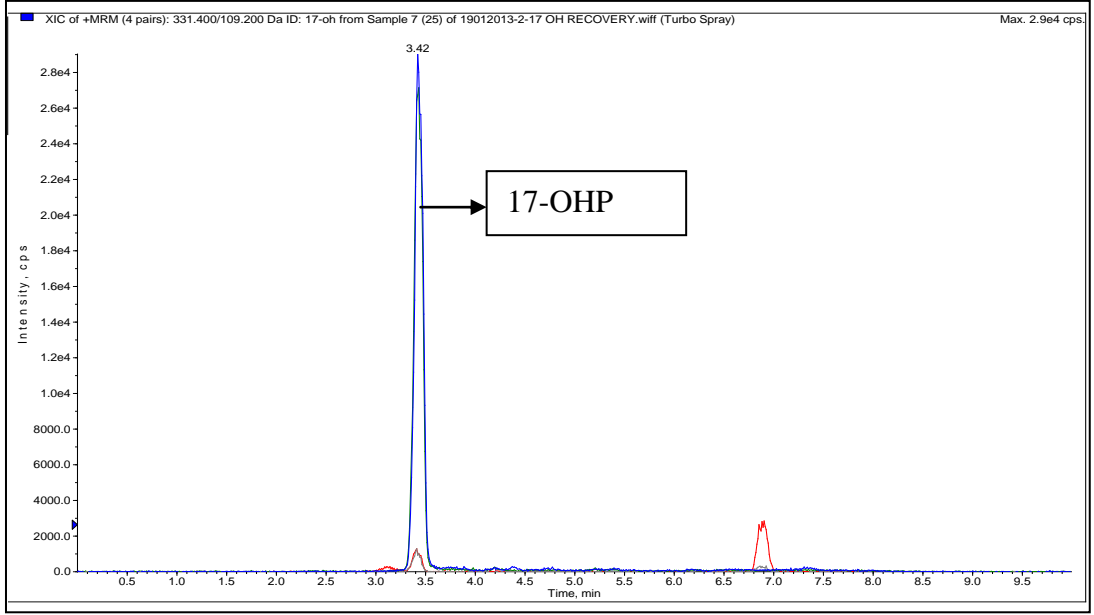
Şekil 3.3. Metanol örneğinin kullanıldığı LC-MS/MS'teki background iyon kromatogram görünümü



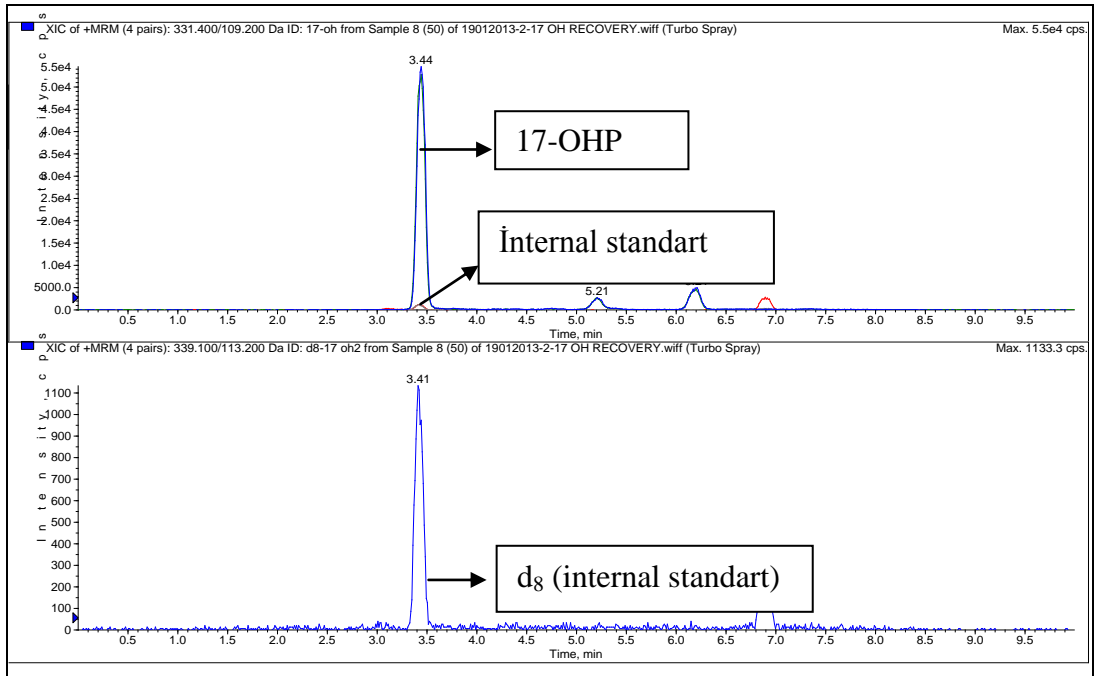
Şekil 3.4.. BSA-PBS’de hazırlanmış ve ekstrakte edilmiş bir internal standart (d₈-17-OHP)’in LC-MS/MS’teki iyon kromotogramı



Şekil 3.5. BSA-PBS’de hazırlanmış ve ekstrakte edilmiş bir 17-OHP standardının LC-MS/MS’deki iyon kromotogramı



Şekil 3.6. Ekstrakte edilmiş standart örneğinde 17-OHP ve internal standart (d_8 -17-OHP) LC-MS/MS'deki iyon kromatogramı



Şekil: 3.7. Ekstrakte edilmiş standart örneğinde üstte 17-OHP ve internal standart(d_8 -17-OHP), altta d_8 -17-OHP'in LC-MS/MS'deki iyon kromatogramı

3.3. Metod Validasyonu

3.3.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

Metod değerlendirme çalışmasına öncelikle linearite çalışmasıyla başlandı. Daha sonra sırasıyla kesinlik, interferans, geri elde, referans aralık ve metod karşılaştırma deneyleri yapıldı.

Linearite çalışması için, Sigma–Aldrich marka liyofilize 17 α -hidroksiprogesteron standardı temin edildi. 500 ng/mL 17 α -hidroksiprogesteron içeren örnekten BSA-PBS ile 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195 ve 0,1 ng/mL’lik dilüsyonlar hazırlandı. Volümetrik dilüsyonların doğru yapılması çok önemli olduğu için 500ng/mL’lik örnekten her örnek direkt dilüsyonla hazırlandı ve her örnek çift çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

3.3.2. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) Çalışması

Bu çalışmada sırası ile gün içi, çalışmalar arası ve günler-arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı.

Hazırlanan standart çözeltilerden 0.8 ng/mL, 6 ng/mL, ve 12 ng/mL’ den oluşan üç farklı karar seviyesindeki standart kullanıldı. Her üç konsantrasyon için standartlar 11 örnek kabına ayrıldı. Çalışma içi değişkenliği göstermek için her üç seviyeli standart aynı çalışma içinde arka arkaya 11 kez çalışıldı.

Çalışmalar arası tekrarlanabilirlik (precision) çalışmasında üç farklı düzeyde 17 α -hidroksiprogesteron içeren standartlar kullanıldı. Her üç seviye standart örnekleri ayrı ayrı 11 porsiyona ayrıldı ve gün boyunca her üç seviyeden de örnek olacak şekilde ayrı ayrı çalışıldı.

Günler-arası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise üç farklı düzeyde 17 α -hidroksiprogesteron içeren örnekler kullanıldı. Her seviyedeki kontrol standart örnekleri herbiri ayrı ayrı 11 kez porsiyonlandı ve -20°C’de saklandı. 11 gün boyunca her gün her üç seviyedeki örnekler çalışıldı.

3.3.3. İnterferans Çalışması

Hemolizin 17 α -hidroksiprogesteron düzeyine olan etkisini araştırmak için 1 kişiden K₃EDTA' lı tüpe venöz kan örneği alındı. Tüp içerisinde eritrositler farklı düzeylerde travmatize edilerek farklı hemoliz düzeyleri oluşturuldu. Lipeminin 17-OHP düzeyine olan etkisini araştırmak için lipemik olmayan serum örneği alındı ve iki tüpe bölündü. Tüplerden birine %10'u (v/v) geçmeyecek şekilde BSA-PBS diğerine de 1000 mg/dL' lik trigliserid çözeltilisinden ilave edildi. Bilirubineminin 17-OHP düzeyine olan etkisini araştırmak için normal serum örneği alındı. Serum iki tüpe bölündü. Tüplerden birine %10'u (v/v) geçmeyecek şekilde BSA-PBS, diğerine de 20 mg/dL' lik bilirubin çözeltilisinden ilave edildi. Bu üç farklı örnek çalışıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Hemoliz, ikter ve lipemik örneklerin yanı sıra moleküler benzerliği olan 17-OHP harici steroidler (östrojen, progesteron, kortizol, spiroteron asetat, kolesterol) için interferans çalışması yapıldı. Östrojen, progesteron ve kortizol için Roche Cobas marka kalibratör örnekleri kullanıldı. Kolesterol için standart çözeltili hazırlandı. Sproteron asetat için Elleacnelle^R draje tabletten çözeltili hazırlandı. Önce 17-OHP için üç farklı konsantrasyonda hazırlanan standartlar çalışıldı. Daha sonra %10 (v/v) interferans için araştırılan steroidler ilave edilerek tekrar analizler yapılıp sonuçlar değerlendirildi.

3.3.4. Geri Elde Çalışması

Bu çalışma da hasta serumu beş tüpe porsiyonlandı. Porsiyonlardan biri standart prosedüre göre çalışıldı. Diğer tüplere sırası ile %5 (v/v) hacimde BSA-PBS solüsyonu, 25 ng/mL, 50 ng/mL 100 ng/mL' lik standart çözeltilerden eklendi. Her bir havuzdan 950 μ L serum örnekleri alındı. Matriksin etkisini bozmaması için (örnek hacminin % 10'unu geçmeyecek şekilde) standartlardan 50 μ L alındı ve son hacim 1000 μ L tutuldu. Elimizdeki standart serum örneğindeki 17-OHP konsantrasyonu 1.25 ng/mL olarak ölçüldü. Buna göre aşağıdaki formül uygulanarak eklenen konsantrasyonlar bulundu.

Eklenen Konsantrasyon = Standartın konsantrasyonu x Standartın hacmi/Total hacim

$$1. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 100 \times 50 / 1000$$

$$1. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 5 \text{ ng/mL}$$

$$2. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 50 \times 50 / 1000$$

$$2. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 2.5 \text{ ng/mL}$$

$$3. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 25 \times 50 / 1000$$

$$3. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 1.25 \text{ ng/mL}$$

$$4. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 0 \times 50 / 1000$$

$$4. \text{Eklenenin Konsantrasyonu} = 0 \text{ ng/mL}$$

Bu bize standart çözeltilerden 100 ng/mL' den 50 µL aldığımız takdirde, içindeki 17-OHP 5 ng/mL, 50 ng/mL' den 50 µL aldığımız takdirde, içindeki 17-OHP konsantrasyonun 2.5 ng/mL, 25 ng/mL' den 50 µL aldığımız takdirde, içindeki 17-OHP konsantrasyonun 1.25 ng/mL ve BSA-PBS solüsyonundan 100 µL aldığımız takdirde içindeki 17-OHP konsantrasyonunun 0 ng/mL olduğunu görülmektedir.

1,25 ng/mL düzeyinde 17α-hidroksiprogesteron içeren serum havuzundan 4 örnek kabına 950'şer µL alındı. Dilüent olarak BSA-PBS kullanıldı. Birinci örnek kabına 50 µL BSA-PBS, ikinci örnek kabına 50 µL 100 ng/mL'lik standart, üçüncü örnek kabına 50 µL 50 ng/mL'lik standart ve dördüncü örnek kabına 50 µL 25 ng/mL lik standart eklendi. Örneklerin son hacmi 1000 µL oldu. Her örnek 2 kez okutuldu. Ekleme yapılan örneklerle baseline örnek arasında ölçümle bulunan fark, formül yardımıyla hesaplanan fark ile karşılaştırıldı.

Geri elde edilen konsantrasyon = Testin konsantrasyonu – Bazal konsantrasyon

$$\% \text{ Geri elde edilen miktar} = \text{Geri elde edilen miktar} / \text{Eklenen miktar}$$

Her dört seviye için de % Geri elde ortalaması bulundu.

$$\% 100 - \% \text{ Geri elde edilen miktar} = \text{Oransal Hata}$$

Bu % oranının kritik karar düzeyinde kaç konsantrasyon ünitesine karşılık geldiği hesaplandı. Elde edilen değer izin verilebilir hata düzeyi ile karşılaştırıldı.

3.3.5. Deteksiyon Limitleri

Tandem MS cihazlarında yapılan analizlerde <%20 hata oranı ile sinyal/gürültü (S/N) 10 ve üzeri olması kantitasyon limiti (LOQ), LOQ'nın 1/3 ise deteksiyon limiti (LOD) olarak kabul edilir (Miller ve ark 2011).

3.3.6. Referans Aralık Doğrulama Çalışması

Referans aralık doğrulama testi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)' ya göre geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralığı ile yeni geliştirilen yöntemle çalışılmış 20 örnek karşılaştırılır. 20 örnekten bir veya daha az miktarda geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralıklarının dışına çıkar ise bu referans aralıkları geliştirilen yöntem için kullanılabilir (Clinical and Laboratory Standards Institute 2010). 20 örnekten ikisi geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralıklarının dışına çıkar ise bu referans aralıkları geliştirilen yöntem için uygulanamaz.

3.3.7. Duyarlılık (Sensitivite)

Aranan hastalığın hastada bulunması durumunda test sonucunun pozitif olma olasılığı olup, gerçek pozitif sonuç sayısı, pozitif olması gereken sonuç sayısı (hasta sayısı) ile karşılaştırılarak bulunur (Taga ve ark 2000).

$$\text{Duyarlılık (\%)} = \left\{ \frac{\text{GP}}{\text{GP} + \text{YN}} \times 100 \right\}$$

3.3.8. Özgüllük (Spesifite)

Aranan hastalığın hastada bulunmaması durumunda test sonucunun negatif olma olasılığı olup gerçek negatif sonuç sayısı, negatif olması gereken sonuç sayısı (hasta olmayan sayısı) ile karşılaştırılarak bulunur (Taga ve ark 2000).

$$\text{Özgüllük (\%)} = \left\{ \frac{\text{GN}}{\text{GN} + \text{YP}} \times 100 \right\}$$

3.3.9. Taşınma (Carryover)

Otomatik ve akış hücresi bulunan sistemlerde sistem çalışırken önceki numuneden sonraki numuneye aktarım olup olmadığını oluyorsa bunun kabul edilebilirliğini göstermek için yapılır. Düşük ve yüksek seviyeli örnekler belli bir

düzen içinde çalışılır. Bu çalışmada BSA-PBS ve 25 ng/mL' den oluşan iki örnek belli bir düzen içinde çalışıldı.

3.3.10. Metod Karşılaştırma Çalışması

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ABSCIEX API 3200 Likid kromatografi-kütle spektrometri (LC/MS/MS) ölçüm 17-OHP hormon testi için, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ABSCIEX API 3200 Likid kromatografi-kütle spektrometri (LC/MS/MS) ölçüm yöntemi için metod değerlendirme çalışması yapıldı. Bu yöntem Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında rutin olarak kullanılan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ölçüm yöntemi ile karşılaştırıldı. Çalışma Dia Metra (Ref: DKO004) marka hazır ELISA kiti kullanıldı. Çalışmaya hastanemiz polikliniklerine müracaat eden 107 kişi dahil edildi.

Laboratuvarımıza 15 Ekim 2012 - 15 Ocak 2013 tarihleri arasında 17-OHP ölçümü için başvuran toplam 107 kişiden sabah 08.30 – 09.00 arası oturur pozisyonda antekübital venden düz tüplere rutin tetkikler için jelli düz tüplere kan örnekleri alındı. 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Rutin tetkikler için gerekli serumlar alındıktan sonra artan serumlar çalışma gününe kadar eppendorf tüplere aktarılarak çalışma gününe kadar -80 C'de saklandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Her yöntemle, numuneler çift çalışıldı ve ortalamaları alındı. Elde edilen verilerin tanımlanmasında ortalama (Mean), standart sapma (SD) kullanıldı. MedCalc Versiyon 9.2..0.1 istatistik programı, EP Evaluator Release 8.0.0.171 versiyon ve Excel (2010) programları kullanıldı.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle elde edilen değerler Y eksenine, LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen değerler X eksenine yerleştirilerek lineer regresyon grafikleri çizilerek regresyon analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

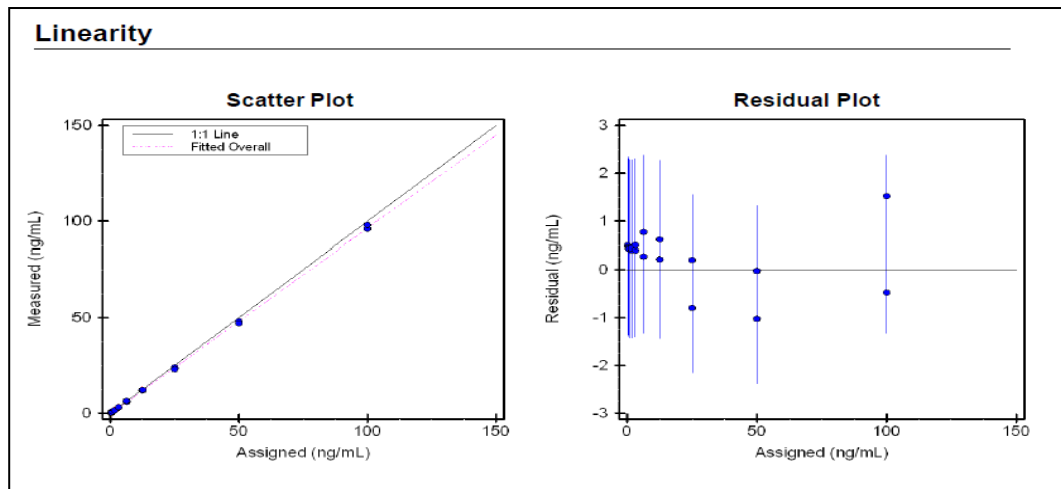
4.1. Linearite Çalışması

17-OHP için linearite belirleme çalışmasının sonuçları Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. 17-OHP için linearite çalışmasından elde edilen veriler.

17-OHP (ng/mL)	1.Ölçüm17-OHP (ng/mL)	2.Ölçüm17-OHP (ng/mL)	Ortalama17-OHP (ng/mL)	Dilüsyon No	Uygunluk %
100	96	99	97	1	97.0
50	48	47	47.5	2	95.0
25	24	23	23.5	3	94.0
12,5	11.9	12.3	12.1	4	96.8
6.25	5.9	6.4	6.15	5	98.4
3.125	3	3.1	3.05	6	97.6
1.56	1.49	1.52	1.505	7	96.5
0.78	0.76	0.75	0.755	8	96.8
0.39	0.42	0.39	0.405	9	103.8
0.195	0.23	0.25	0.24	10	123.1

Tablo 4.1'de çift çalışılarak ölçülen 17-OHP ortalamaları ve beklenen değerler görülmektedir. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp sonuç 100 ile çarpılarak uygunluk yüzdeleri bulundu. 100 ng/mL' ye kadar lineer bulundu. Daha yüksek dozlar klinik olarak yaygın şekilde rastlanılmadığından çalışılmamıştır. Çok düşük dozda analitik belirsizliğin arttığı görülmektedir.



Şekil 4.1. Linearite grafiği ve sonuçların dağılımı

Linearite grafiğinde $y=0.9649x$ ve eğrinin $R^2=0.999$ olarak bulundu.

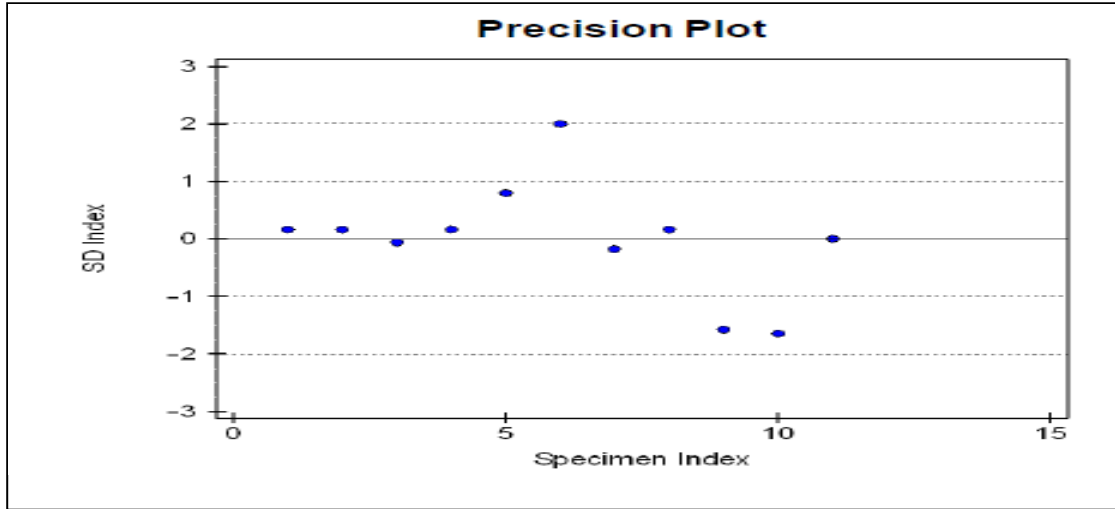
4.2. Kesinlik (Tekrarlayıcılık, Presizyon) Çalışması

4.2.1. Çalışma İçi Kesinlik Çalışması

Bu çalışma için 17-OHP standardından hazırlanmış 3 farklı konsantrasyondaki (0.8 ng/mL, 6 ng/mL, ve 12 ng/mL) standartlar aynı çalışma içinde ard arda 11'er kez çalışıldı. 0.8 ng/mL konsantrasyondaki örneğin tekrarlanabilirlik sonuçları tablo 4.1'de verilmiştir. 0.8 ng/mL'deki CV değeri % 5.6 olarak belirlenmiştir. Yine çalışılan örneğin 2 SD aralığındaki dağılım noktaları grafik olarak verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma içi kesinlik deneyinde, 0.8 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve çalışma içi kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	0,79270 ng/mL	95% Confidence for Mean	0,76306 to 0,82234
Standard Deviation (SD)	0,04412	2 SD Range	0,70446 to 0,88094
95% Confidence for SD	0,03083 to 0,07743	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	5,6%	Number of Outliers	-

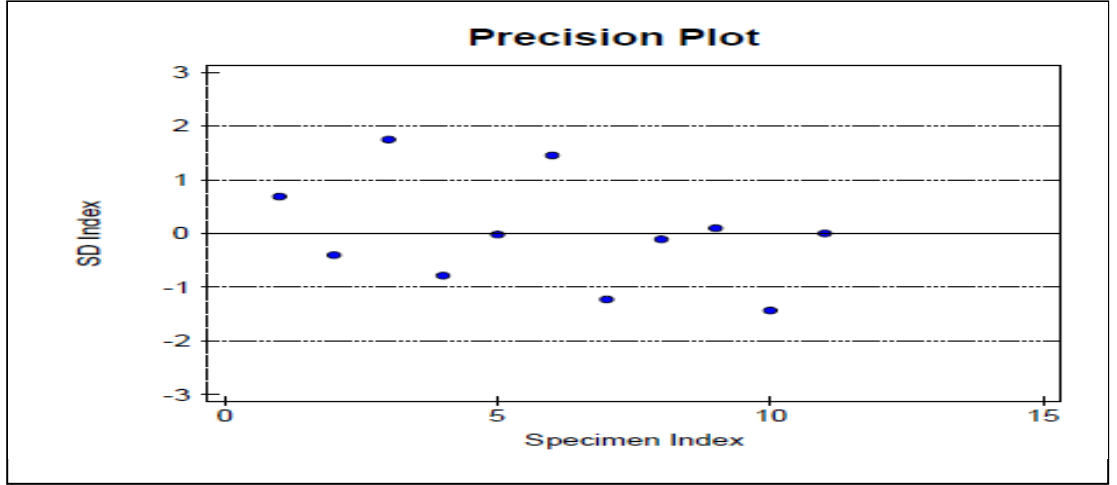


Grafik 4.1 0.8 ng/mL için gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı

6 ng/mL konsantrasyondaki örneğin tekrarlanabilirlik sonuçları tablo 4.2'de verilmiştir. 6 ng/mL'deki CV değeri % 5.7 olarak belirlenmiştir. Yine çalışılan örneğin 2 SD aralığındaki dağılım noktaları grafik (grafik 4.2.) olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma içi kesinlik deneyinde 6 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve çalışma içi kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	6,0070 ng/mL	95% Confidence for Mean	5,7789 to 6,2351
Standard Deviation (SD)	0,3395	2 SD Range	5,3280 to 6,6860
95% Confidence for SD	0,2372 to 0,5958	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	5,7%	Number of Outliers	--

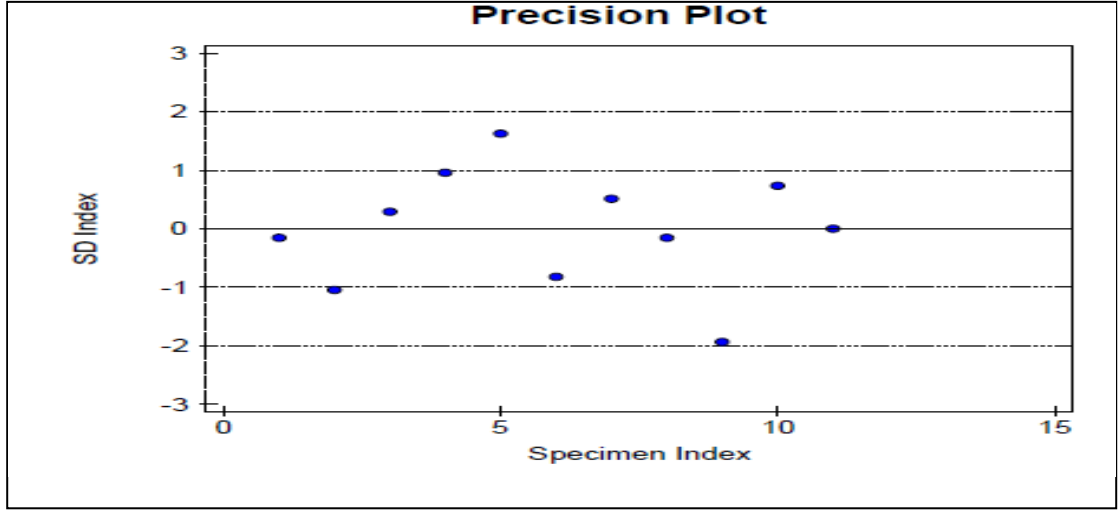


Grafik 4.2. 6 ng/mL için gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı

12 ng/mL konsantrasyondaki örneğin tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.3'de verilmiştir. 12 ng/mL'deki CV değeri % 3,7 olarak belirlenmiştir. Yine çalışılan örneğin 2 SD aralığındaki dağılım noktaları grafik (Grafik 4.3.) olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. Çalışma içi kesinlik deneyinde, 12 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve çalışma içi kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	12,070 ng/mL	95% Confidence for Mean	11,768 to 12,372
Standard Deviation (SD)	0,450	2 SD Range	11,171 to 12,969
95% Confidence for SD	0,314 to 0,789	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	3,7%	Number of Outliers	--



Grafik 4.3 12 ng/mL için gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı

Tablo 4.4. Çalışma içi kesinlik deneyinde, üç farklı standart için elde edilen 17-OHP verileri.

Düzye	Ortalama(ng/mL)	SD	%CV
1	0.8	0.04	5.6
2	6	0.34	5.7
3	12	0.45	3.7

Çalışma içi kesinlik deneyinde 0.8 ng/mL'lik 17-OHP konsantrasyonlu standart için CV % 5.6, 6 ng/mL'lik 17-OHP konsantrasyonlu standart için CV % 5.7 olarak bulundu. 12 ng/mL'lik 17-OHP konsantrasyonlu için CV % 3.7 olup 17-OHP için izin verilebilir hata düzeyi CLIA-88 kriterlerinde bildirilmemiştir. Genel olarak hormonlar için bildirilen kabul edilebilir analitik performans kriteri hedef değerlerin % 20-25' i dir. Westgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) 17-OHP için total hata % 29.7 olarak verilmiştir. Çalışma için kesinlik deneyinde 0.8 ng/mL konsantrasyon için bulunan SD değeri 0.04, 6 ng/mL konsantrasyon için bulunan SD değeri 0.34 iken 12 ng/mL konsantrasyon için SD değeri 0.45'dir.

17-OHP için ortalama değerimizin % 25' ini izin verilebilir hata kabul edersek;

- 0.8'in % 25'i olan 0.2 ng/mL izin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, E_a 'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $0.2 \times 0.25 = 0.05$ 'dir. $0.04 < 0.05$

olduğundan 0.8 ng/mL konsantrasyonu için çalışma içi presizyonu kabul edilebilir düzeydedir.

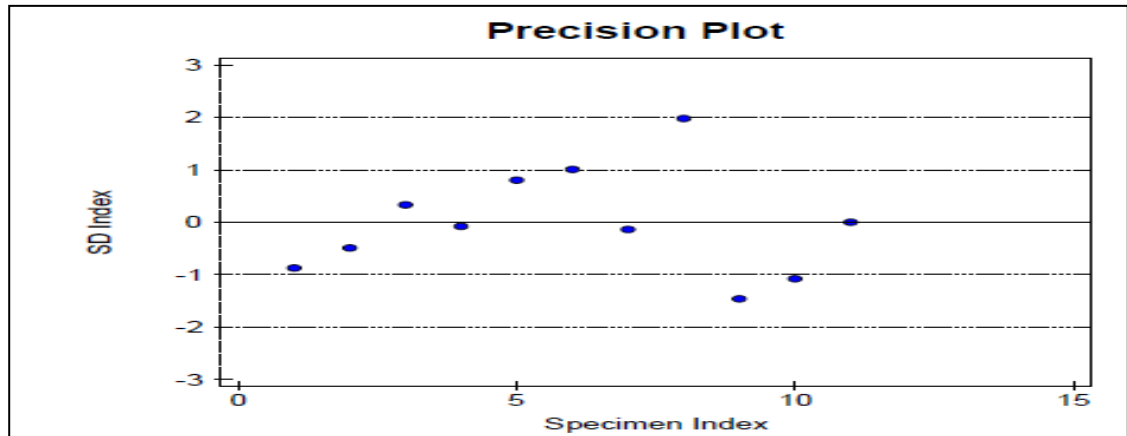
- 6 ng/mL konsantrasyon için SD=0.34'dir. Ortalama değerimiz 6' nin % 25'i, 1.5 izin verilebilir analitik hatadır. 1.5'in 1/4'ü, 0.375 izin verilebilen SD'dir. $0.34 < 0.375$ olduğundan, 6 ng/mL için çalışma içi presizyon kabul edilebilir düzeydedir.
- 12 ng/mL konsantrasyon için SD=0.45'tir. Ortalama değerimiz 12' nin % 25'i, 3 izin verilebilir analitik hatadır. 3'ün 1/4'ü, 0.75 izin verilebilen SD'dir. $0.45 < 0.75$ olduğundan 12 ng/mL için çalışma içi presizyon kabul edilebilir düzeydedir.

4.2.2. Çalışmalar Arası (Gün içi) Presizyon Çalışması

Bu çalışma için 17-OHP standardından hazırlanmış 3 farklı konsantrasyondaki (0.8 ng/mL, 6 ng/mL, ve 12 ng/mL) standartlar ayrı ayrı çalışmalarda 11 kez çalışıldı. Gün içi farklı çalışmalardaki presizyon değerleri sırası ile Tablo 4.5, 4.6 ve 4.7'de verilmiştir. Her bir ölçümün 2 SD aralığında dağılımı ise grafiklerde sırası ile Grafik 4.4, 4.5, 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Çalışmalar arası kesinlik deneyinde 0.8 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve çalışmalar arası kesinlik deneyi sonuçları

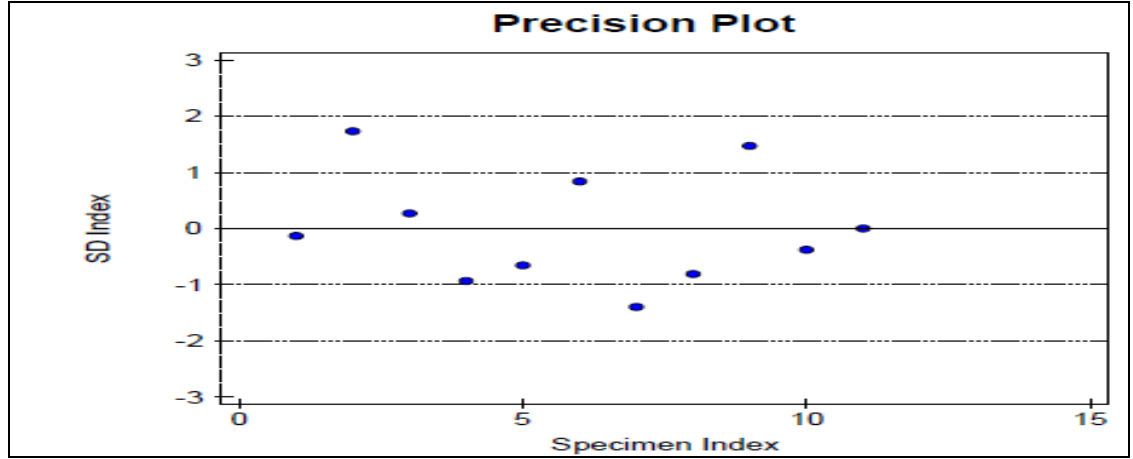
Precision Statistics			
Mean	0,80835 ng/mL	95% Confidence for Mean	0,79692 to 0,81978
Standard Deviation (SD)	0,01702	2 SD Range	0,77431 to 0,84239
95% Confidence for SD	0,01189 to 0,02987	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	2,1%	Number of Outliers	--



Grafik 4.4. 0.8 ng/mL için çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

Tablo 4.6. Çalışmalar arası kesinlik deneyinde 6 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve çalışmalar arası kesinlik deneyi sonuçları

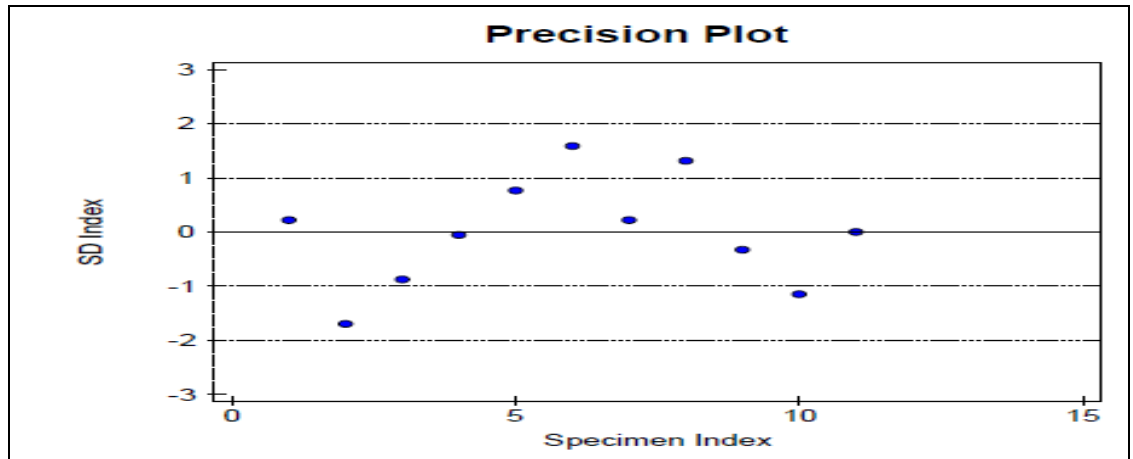
Precision Statistics			
Mean	6,0430 ng/mL	95% Confidence for Mean	5,8250 to 6,2610
Standard Deviation (SD)	0,3246	2 SD Range	5,3939 to 6,6921
95% Confidence for SD	0,2268 to 0,5696	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	5,4%	Number of Outliers	--



Grafik 4.5. 6 ng/mL için çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

Tablo 4.7. Çalışmalar arası kesinlik deneyinde 12 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve çalışmalar arası kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	12,110 ng/mL	95% Confidence for Mean	11,987 to 12,233
Standard Deviation (SD)	0,183	2 SD Range	11,744 to 12,476
95% Confidence for SD	0,128 to 0,321	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	1,5%	Number of Outliers	--



Grafik 4.6. 12 ng/mL için çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

Tablo 4.8. Çalışmalar arası kesinlik deneyinde üç farklı standart için elde edilen 17-OHP verileri.

Düzyey	Ortalama(ng/mL)	SD	%CV
1	0.8	0.017	2.1
2	6	0.32	5.4
3	12	0.18	1.5

Çalışmalar arası kesinlik deneyinde 0.8 ng/mL'lik 17-OHP konsantrasyonlu standart için CV % 2.1, 6 ng/mL'lik 17-OHP konsantrasyonlu standart için CV % 5.4 olarak bulundu. 12 ng/mL'lik 17-OHP konsantrasyonlu için CV % 1.5 17-OHP için izin verilebilir hata düzeyi CLIA-88 kriterlerinde bildirilmemiştir. Genel olarak hormonlar için bildirilen kabul edilebilir analitik performans kriteri hedef değerlerin % 20-25' i dir. Westgard'ın web sitesinde 17-OHP için verilen total hata değeri (% 29.7) kullanıldığında çalışma için kesinlik deneyinde her 3 parametrenin SD değerlerinin total hatanın altında olduğu görülmektedir. 0.8 ng/mL konsantrasyon için bulunan SD değeri 0.017, 6 ng/mL konsantrasyon için bulunan SD değeri 0.32 iken 12 ng/mL konsantrasyon için SD değeri 0.18'dir.

17-OHP için ortalama değerimizin % 25' ini izin verilebilir hata kabul edersek;

- 0.8 ng/mL konsantrasyon için $SD=0.07$ 'dir. 0.8'in % 25'i olan 0.2 ng/mL izin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, Ea 'nın $\frac{1}{4}$ 'dür. $0.2 \times 0.25 = 0.05$ 'dir. $0.017 < 0.05$ olduğundan 0.8 ng/mL konsantrasyonu için çalışmalar arası presizyonu kabul edilebilir düzeydedir.
- 6 ng/mL konsantrasyon için $SD=0.34$ 'dir. Ortalama değerimiz 6'nın % 25'i, 1.5 izin verilebilir analitik hatadır. 1.5'in $\frac{1}{4}$ 'ü, 0.375 izin verilebilen SD'dir. $0.32 < 0.375$ olduğundan, 6 ng/mL için çalışmalar arası presizyon kabul edilebilir düzeydedir.
- 12 ng/mL konsantrasyon için $SD=0.18$ 'dir. Ortalama değerimiz 12'nin % 25'i, 3 izin verilebilir analitik hatadır. 3'ün $\frac{1}{4}$ 'ü, 0.75 izin

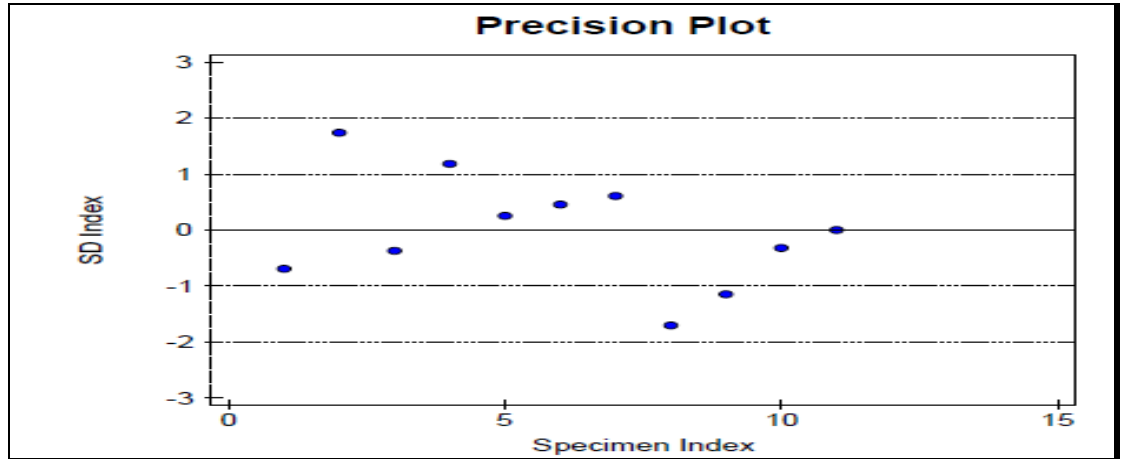
verilebilen SD'dır. $0.18 < 0.75$ olduğundan 12 ng/mL için çalışmalar arası presizyon kabul edilebilir düzeydedir.

4.2.3. Günler arası presizyon çalışması

Bu çalışma için 17-OHP standardından hazırlanmış 3 farklı konsantrasyonda (0.8 ng/mL, 6 ng/mL, ve 12 ng/mL)'ki standartlar kullanılarak 11 gün boyunca her gün çalışıldı. 0.8 ng/mL standart için elde edilen değerler tablo 4.9'da verilmiştir. Yine çalışılan her bir örneğin 2 SD aralığındaki dağılım noktaları grafik 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.9. Günler arası kesinlik deneyinde 0.8 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve günler arası kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	0,79950 ng/mL	95% Confidence for Mean	0,77960 to 0,81940
Standard Deviation (SD)	0,02963	2 SD Range	0,74025 to 0,85875
95% Confidence for SD	0,02070 to 0,05199	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	3,7%	Number of Outliers	--

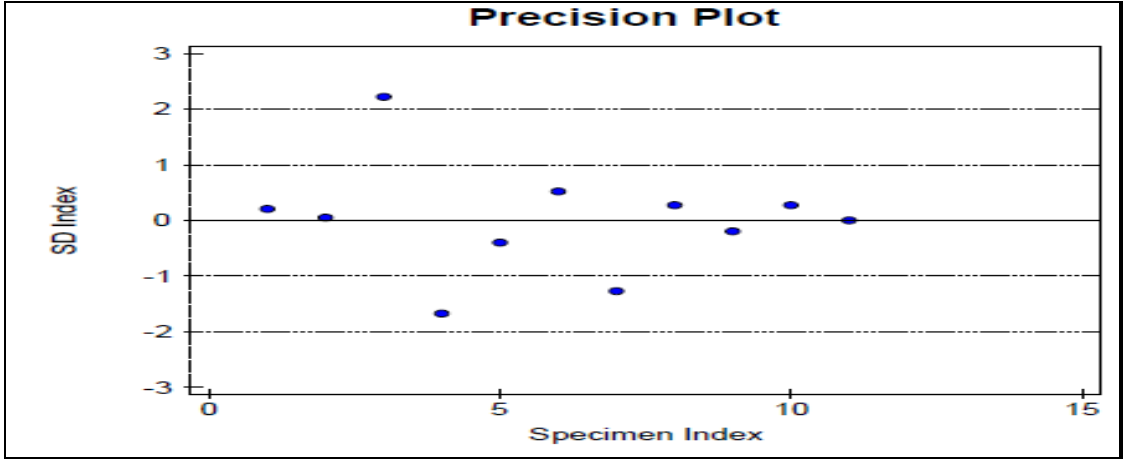


Grafik 4.7. 0.8 ng/mL için günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

6 ng/mL standart için elde edilen değerler tablo 4.6'da verilmiştir. 6 ng/mL için elde edilen CV değerinin % 3.7 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.10. Günler arası kesinlik deneyinde 6 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve günler arası kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	6,0740 ng/mL	95% Confidence for Mean	5,9238 to 6,2242
Standard Deviation (SD)	0,2235	2 SD Range	5,6270 to 6,5210
95% Confidence for SD	0,1562 to 0,3922	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	3,7%	Number of Outliers	--

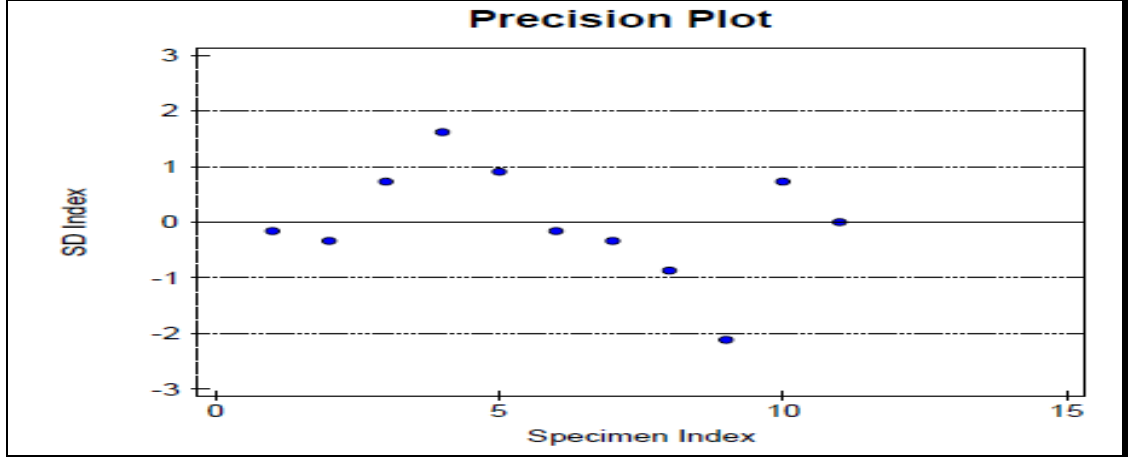


Grafik 4.8. 6 ng/mL için günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

12 ng/mL için günler arası tekrarlanabilirlik tablo 4.11’de verilmiştir. 12 ng/mL konsantrasyonundaki standart için elde edilen CV değeri % 2.3 olarak belirlenmiştir. Yine çalışılan her bir örneğin 2 SD aralığındaki dağılım noktaları grafik 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.11. Günler arası kesinlik deneyinde 12 ng/mL standart için elde edilen 17-OHP değerleri ve günler arası kesinlik deneyi sonuçları

Precision Statistics			
Mean	12,1950 ng/mL	95% Confidence for Mean	12,0059 to 12,3841
Standard Deviation (SD)	0,2815	2 SD Range	11,6321 to 12,7579
95% Confidence for SD	0,1967 to 0,4940	Number of Specimens (N)	11 of 11
Coefficient of Variation (CV)	2,3%	Number of Outliers	--



Grafik 4.9. 12 ng/mL için günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

Günler arası kesinlik deneyinde 0.8 ng/mL’lik 17-OHP standardı için CV(coefficient of variation) değeri % 3.7; 6 ng/mL’ lik 17-OHP standardı için % 3.7; 12 ng/mL’lik 17-OHP standardı için % 2.3 olarak bulundu.

17-OHP için ortalama değerimizin % 25’ini izin verilebilir hata kabul edersek;

- Presizyon için izin verilebilir SD; izin verilen hatanın 1/3’üdür. 0.8 ng/mL için izin verilen hata; $0.8 \times 25/100 = 0.2$. İzin verilebilir SD $0.2 \times 1/3 = 0.07$ ’dir. $0.03 < 0.07$ olduğundan 0.8 ng/mL için günler arası presizyon kabul edilebilir düzeydedir.
- 6 ng/mL için izin verilen hata $6 \times 25/100 = 1.5$ ’dir. İzin verilebilir SD ise; $1.5 \times 1/3 = 0.5$ ’dir. $0.22 < 0.5$ olduğundan 6 ng/mL için günler arası presizyon kabul edilebilir düzeydedir.
- 12 ng/mL için izin verilen hata $12 \times 25/100 = 3$ ’dir. İzin verilebilir SD ise; $3 \times 1/3 = 1$ ’dir. $0.28 < 1$ olduğundan 12 ng/mL için günler arası presizyon kabul edilebilir düzeydedir.

4.3. İnterferans Çalışması

Hemoliz, ikter ve lipeminin etkisini araştırmak için hazırlanan örnekler çalışılıp sonuçları karşılaştırıldı.

Tablo 4.12. Hemoliz, ikter ve lipemik örneklerde yapılan interferans deneyi sonuçları

İnterferan	Ölçülen Değer ng/mL	Bazal Değer ng/mL	% Fark
hemoliz	1.43	1.48	3.5
lipemi	1.40	1.49	6.0
bilirubin	1.41	1.49	5.6

Tablo 4.13. Steroid yapıdaki moleküllerle yapılan interferans deneyi sonuçları

İnterferan Madde	Ölçülen Değer ng/mL	Beklenen Değer ng/mL	% Fark
5 ng/mL std + BSA-PBS	4.60	4.50	2.2
std+östrojen	4.85	4.50	7.7
std+progesteron	4.63	4.50	2.8
std+ testosteron	4.87	4.50	8.2
std+kortizol	4.85	4.50	7.7
std+kolesterol	4.92	4.50	9.3
std+spiroteren asetat	4.89	4.50	8.6

Hemoliz, ikter ve lipemik örneklerin yanı sıra moleküler benzerliği olan 17-OHP harici steroidlerden östrojen, progesteron, kortizol, spiroteren asetat, kolesterol için interferans çalışması yapıldı. Tabloda (Tablo 4.12-4.13) görüldüğü gibi % farklar total hatanın (% 29.7) altında bulundu ve interferansın olmadığı sonucuna varıldı.

4.4. Geri Elde Deneyi

1.25 ng/mL’ deki serum havuzuna 3 farklı konsantrasyonda 17-OHP’nin standart çözeltilisinden ve BSA-BS’den eklendi ve ölçüm yapıldı. Bazal konsantrasyon ile ikinci ölçüm değerleri arasındaki fark hesaplanarak geri elde edilen miktar bulundu. Yüzde geri elde edilen oran ise geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranınının 100 ile çarpılması ile hesaplandı.

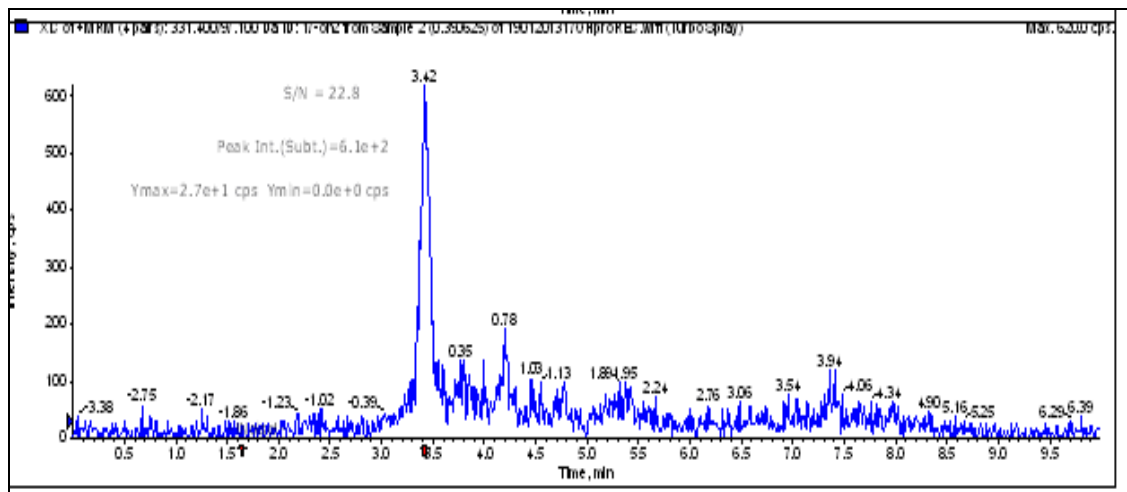
Tablo 4.14. 1.25 ng/mL konsantrasyonlu serum örneğindeki geri elde deneyi sonuçları

	Ölçülen ng/mL	Eklenen ng/mL	Beklenen ng/mL	Recovery (%)
Serum+ BSA-BS	1,18			
Serum+ 25 ng/mL std	2,42	1,25	1,24	99,2
Serum+ 50 ng/mL std	3,66	2,5	2,48	99,2
Serum+ 100 ng/mL std	6,1	5	4,92	98,4

% Geri elde ortalaması % 99 olarak bulundu. Oransal hata izin verilebilir hata düzeyinin altında (%1) olarak bulundu.

4.5. Deteksiyon Limitleri

17-OHP LC-MS/MS ile ölçümünde ölçülebilir en düşük kantitasyon düzeyi (LOQ) 0.4 ng/mL olarak tespit edildi (sinyal gürültü oranı 22.8, Grafik 4.10.). Ölçülebilir en düşük düzeyini (LOD) ise 0.15 ng/mL olarak bulundu.



Grafik 4.10. Deteksiyon limitleri (sinyal/gürültü = S/N)

4.6. Referans Aralık Doğrulama

Referans aralık çalışması için 22 sağlıklı erkekten kan örnekleri alındı. Standart prosedürlere göre ön işlemler ve analizler gerçekleştirildi. Sonuçlar Mayo Medical Laboratuvarı 17-OHP referans aralıkları ile karşılaştırıldı. 21 örnek referans aralığı içinde 1 örnek ise referans aralığı dışında bulundu. Bu sonuç Mayo Medical Laboratories 17-OHP referans aralıklarına uygun olduğu ve benzer metodu kullanan bu laboratuvarın referans aralığının kullanılabilirliğini göstermektedir (<http://www.mayomedicallaboratories.com/> Erişim tarihi 2013).

Mayo klinik laboratuvarına göre belirlenen 17-OHP referans aralıkları;

Çocuklar

- Prematür doğan bebeklerde
- Prematür bebeklerde 6.3 ng/mL aşabilir, ancak düzeyleri 10ng/mL ulaştığını görmek nadirdir.

Term bebekler

- 0-28 gün: <6.3 ng/mL

Seviyeleri giderek 6 ay içinde prepubertal düzeylere düşer.

- Prepubertal erkek: <1.1 ng/mL
- Prepubertal kadın: <1 ng/mL

Erişkin

- Erkekler: <2.20 ng/mL

Kadın

- Foliküler: <0.8 ng/mL
- Luteal: <2.85 ng/mL
- Postmenopozal: <0.51 ng/mL

4.7. Duyarlılık (Sensitivite)

Sensitivite cut-off değeri olarak her bir referans aralığının en üst düzeyi belirlenerek hesaplanmıştır. Klinik olarak kesin tanı almış 26 polikistik over hastalığı (PCOS) ve KAH hastasının serum örneklerinden 17-OHP analizleri yapıldı. Çalışılan örneklerden 1 hasta örneği referans aralıklarının altında yani yalancı negatif bulundu. Sonuçlar değerlendirildi. Duyarlılık % 96 olarak bulundu.

4.8. Özgüllük (Spesifite)

Spesifite cut-off değeri olarak her bir referans aralığının en üst düzeyi belirlenerek hesaplanmıştır. Klinik olarak sağlıklı olduğu bilinen 22 kişinin serum örneklerinden 17-OHP çalışıldı. Çalışılan örneklerden bir tanesi referans aralıkların üzerinde yani yalancı pozitif bulundu. Sonuçlar değerlendirildiğinde özgüllük % 95 olarak hesaplandı.

4.9. Taşınma (Carryover)

Taşınma işlemi için düşük (L) ve yüksek (H) örnekler belirli bir düzende analiz edildiğinde ortaya çıkan düşük örnek ölçümleri tablo 4.15 verilmiştir. Tabloda düşük ölçüm sonrası düşük ölçüm sonuçları low-low results kolonunda yüksek ölçüm sonrası yapılan düşük ölçüm sonuçları high-low results kolonunda verilmiştir.

Tablo 4.15. Taşınma deney çalışma sonuçları

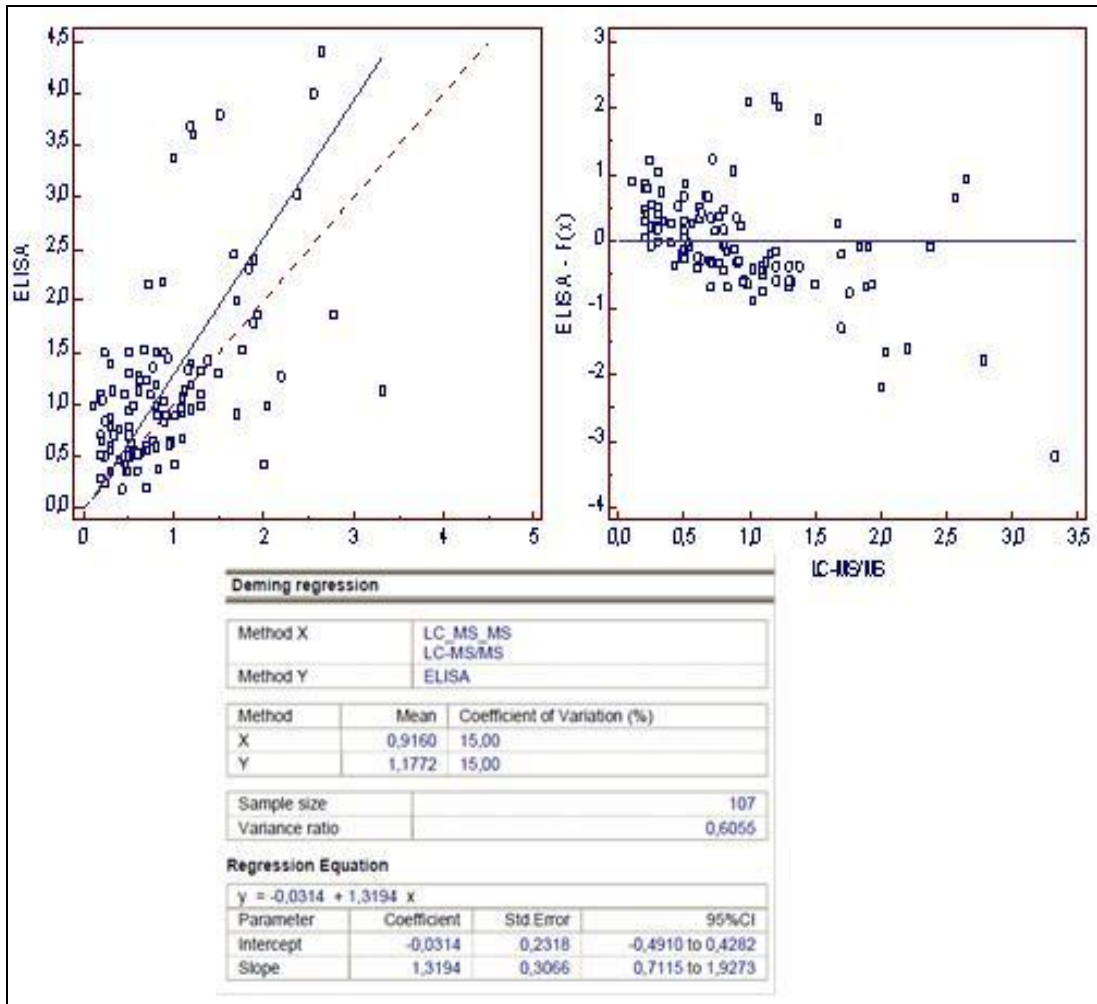
Carryover Analysis			
High-Low Mean	0,020	Error Limit	0,024
Low-Low Mean	0,007	Passes?	Yes
Carryover	0,013		

Experimental Results			
Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	0,01		
L2	0,02	0,02	
L3	0,01	0,01	
H1	20,3		
H2	22,1		
L4	0,01		0,01
H3	23,7		
H4	21,8		
L5	0,04		0,04
L6	0,00	0,00	
L7	0,00	0,00	
L8	0,00	0,00	
H5	23,6		
H6	23,8		
L9	0,02		0,02
H7	25		
H8	23,7		
L10	0,03		0,03
H9	21,8		
H10	22,7		
L11	0,00		0,00
Mean		0,007	0,020
SD		0,008	0,013

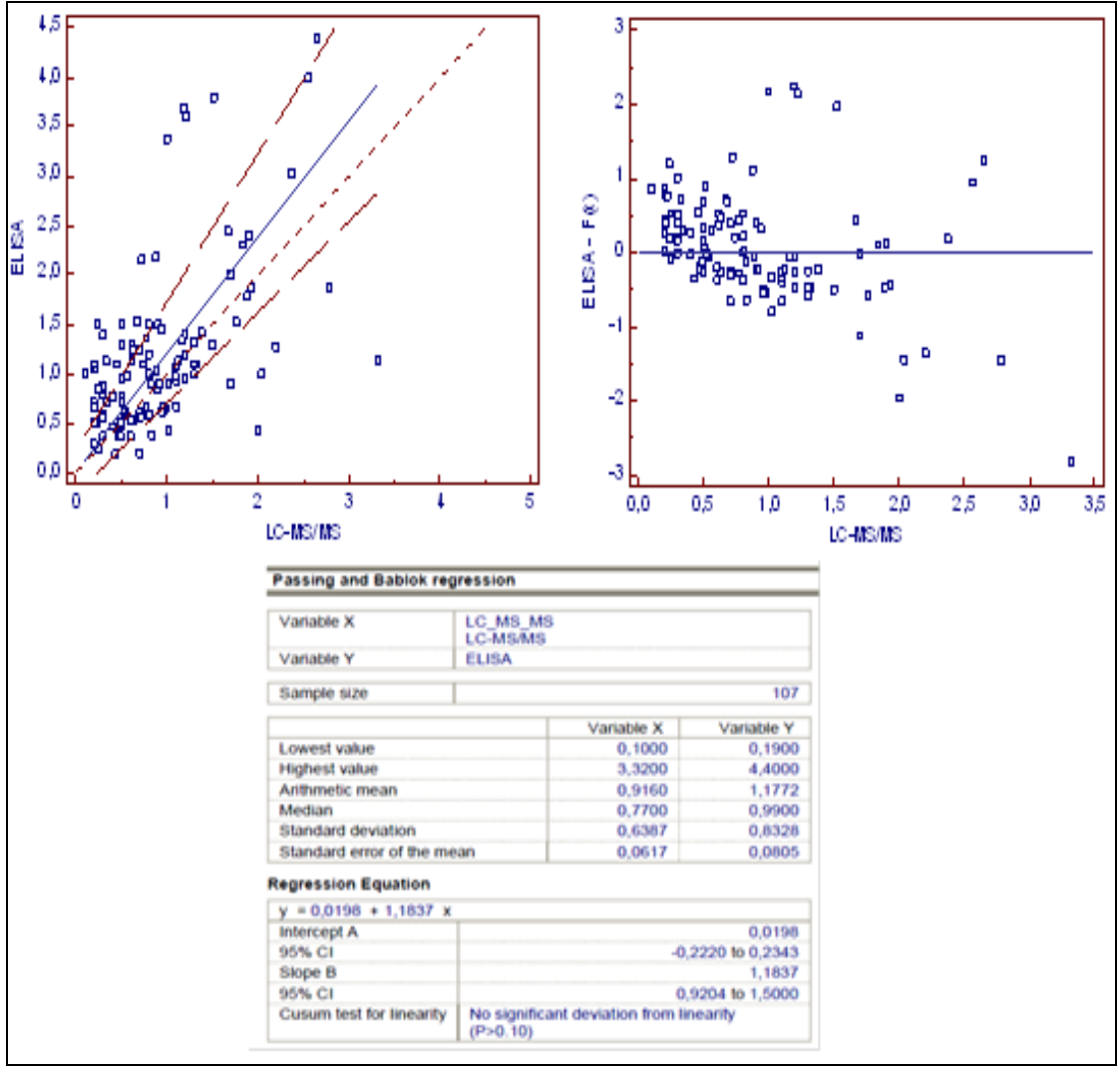
Taşınma çalışması değerlendirildiğinde (high-low results kolonu) her bir yüksek örnek çalışıldıktan sonra düşük örneğe % 1.3 lük bir oranda aktarım olduğu EP-evaluator analizi (Tablo 4.15) ile belirlenmiş ve aktarımın olmadığı görülmüştür.

4.10. Metod Karşılaştırma Deneyi

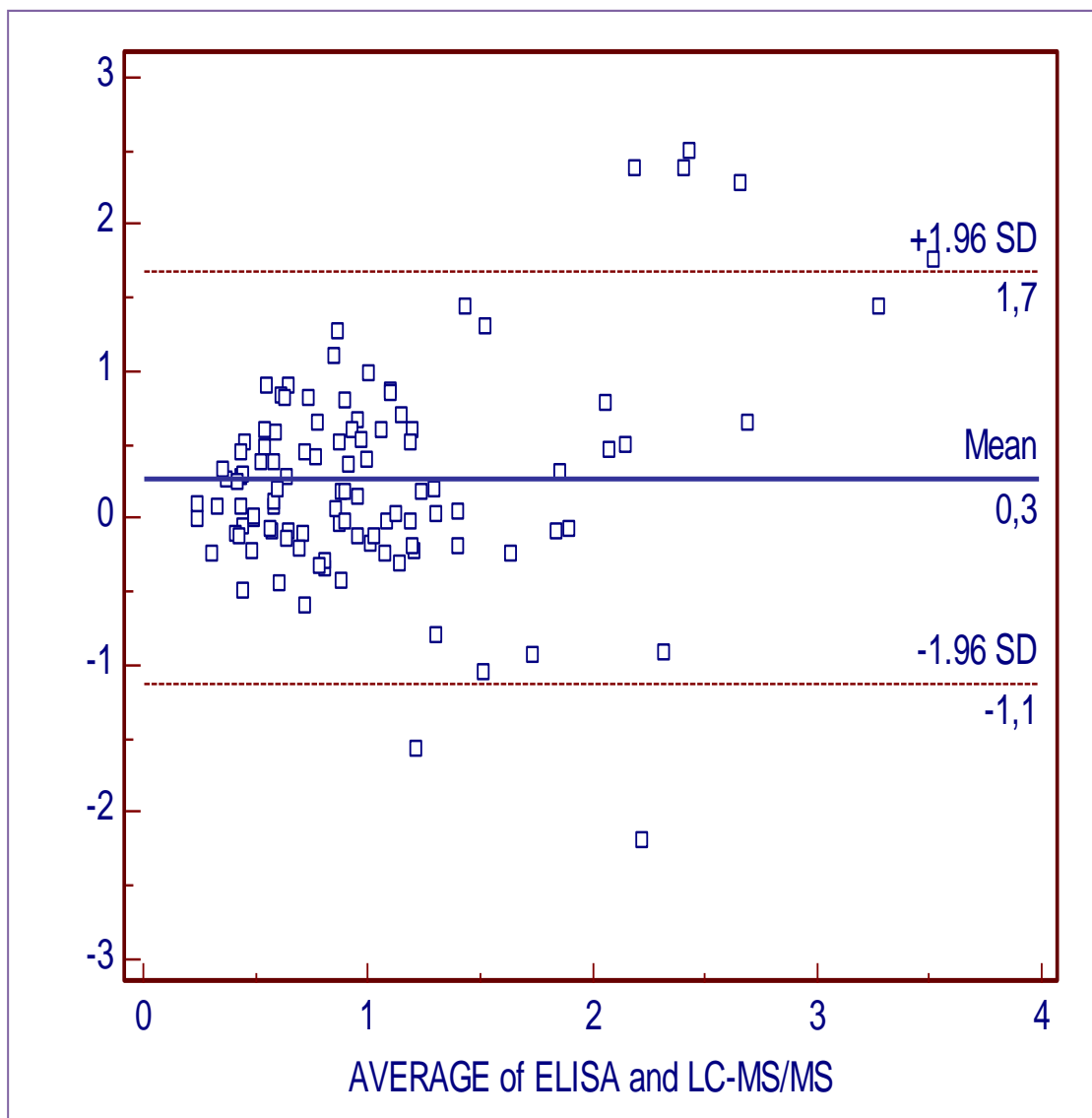
İki yöntemle elde edilen 17-OHP ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Aralarındaki ilişkiyi incelemek amacıyla regresyon analizi yapıldı ve bu ilişki korelasyon katsayısı olarak ifade edildi. Her iki ölçüm sisteminden elde edilen değerler EP Evaluator ve MedCalc analiz programları ile değerlendirildi ve iki yöntem (LC-MS/MS ve ELISA) arasındaki korelasyon hesaplandı. Her iki yöntem arasındaki korelasyon katsayısı 0.55 olarak bulundu. Korelasyonun 0.4 ile 1.5 ng/mL arasındaki değerlerde daha güçlü olduğu gözlenirken ($r=0.66$) daha yüksek değerlerde korelasyon oranının düştüğü gözlenmiştir ($r=0.083$).



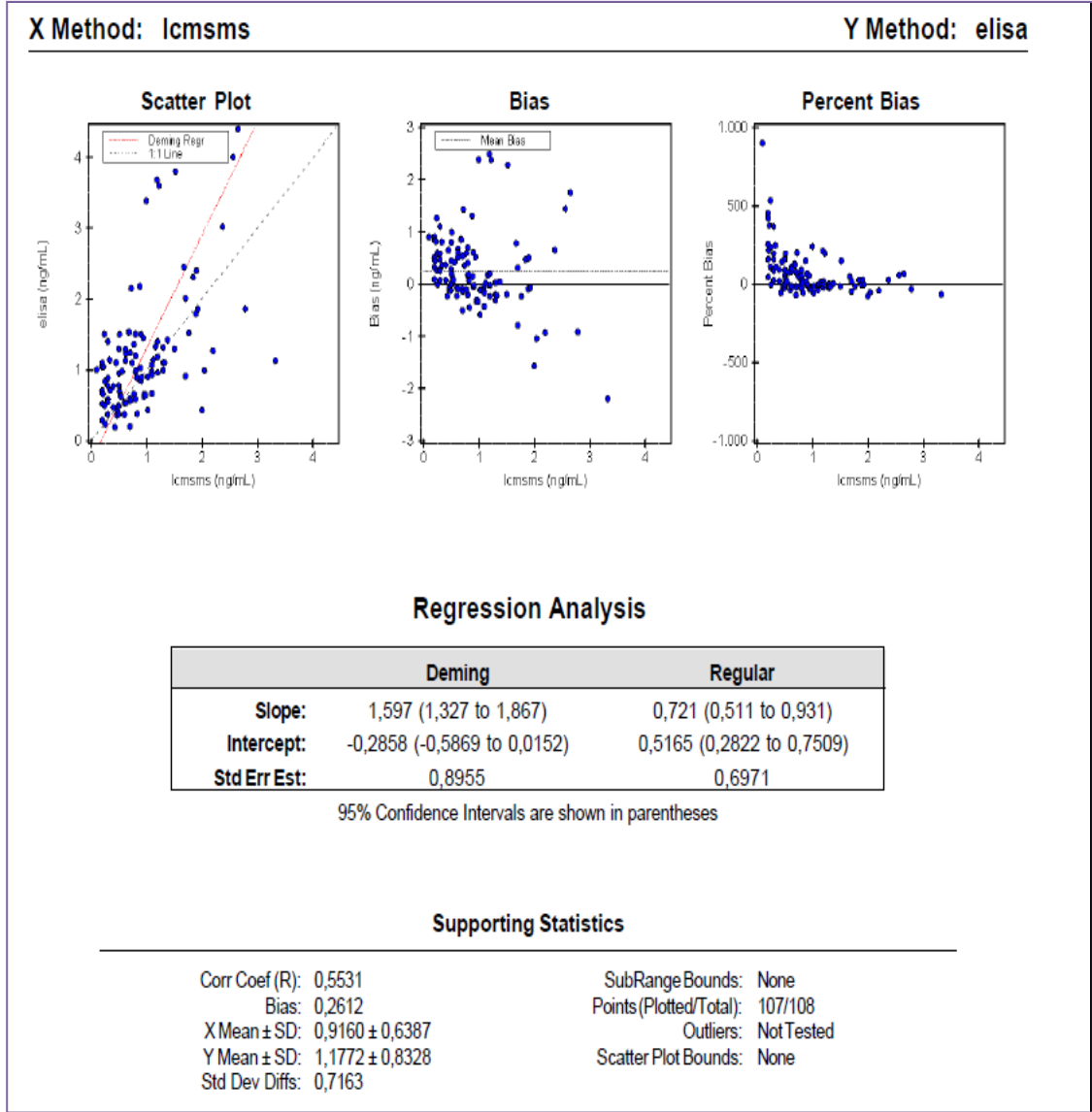
Grafik 4.11. LC-MS/MS ve ELISA yöntemleriyle çalışılan serum örneklerine ait Deming Regresyon grafiği ve verileri



Grafik 4.12. LC-MS/MS ve ELISA yöntemleriyle çalışılan serum örneklerine ait Passing-Bablok grafiği ve verileri.



Grafik 4.13. Bland-Altman Grafiği



Grafik 4.14. LC-MS/MS ve ELISA yöntemleriyle çalışılan serum örneklerine ait EP Evaluator Programında yapılan regresyon analizi ve verileri

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması bir yöntem değerlendirme çalışmasıdır. Bu çalışmada kliniklerin laboratuvarımızdan rutin olarak istem yaptıkları 17-OHP testi 2 yöntem karşılaştırılarak kıyaslanmıştır. 17-OHP steroidogenez metabolik yolunun önemli bir bileşeni olup steroidogenez yolunun gerçekleştiği adrenal korteks, over ve testislerde sentezlenebilmektedir. Klinik olarak sıklıkla polikistik over sendromu, hirsütizm ve konjenital adrenal hiperplazi ile ilgili olarak adrenal korteks fonksiyonlarını araştırmakta kullanılmaktadır. Sıklıkla 21 hidroksilaz azda olsa 11 beta hidroksilaz enziminin eksikliği sonucu ortaya çıkan KAH tablosunda azalan kortizol ve aldosteron sentezi yanı sıra 17-OHP düzeyinde anlamlı artışlar gözlenmektedir. KAH sıklığı homozigot geçişte 10000 de 1 gözlenirken 21 hidroksilaz enzim defektinin kısmı gerçekleştiği heterozigot geçişte sıklığın 50 de 1 olduğu literatürde belirtilmektedir (Milunsky 2010). Bu nedendir ki hirsütizm vakalarında gerek gonadal gerekse de adrenal kortekste defektif enzimin bulunması ve biriken androjenlere bağlı olarak artan tüylenme taramasında serbest testosteron ile birlikte 17 OHP testi sıklıkla istenmektedir. 17-OHP rutin laboratuvarlarda sıklıkla antikor temelli yöntemler ile ölçülmektedir. RIA en sık olarak kullanılan yöntem iken ELISA yönteminin de rutin laboratuvarlarda kullanıldığı görülmektedir.

Kemiluminesans metodlar ise rutin laboratuvarlarda kullanılmamaktadır. Immunassayler, analitik olarak sensitif olup ölçümler sıklıkla ön işlem yapılmadan gerçekleştirilir. Fakat immunassayler bazı durumlarda yeterli spesifite ve doğruluğu sağlamayabilirler. Bir immunassayin spesifitesi sadece antikorun bağlanma özelliğine bağlı olmayıp antijenin bileşimine ve antijenin bulunduğu matrikse göre değişebilir. Spesifite reaktif bileşiminden ve immunoassayin formatından etkilenebilir. Örnekte bulunan analitin ölçülebilir konsantrasyonunu değiştiren veya antikor bağlanmasını etkileyen maddeler interferansa yol açar. İnterferans analit bağımlı olabileceği gibi analitten bağımsız olabilir. Sonucun yüksek bulunmasına yol açabileceği gibi (pozitif interferans) düşük çıkmasına (negatif interferans) yol açabilir. En yaygın görülen interferanslar olan hemoliz, lipemi, ikter, antikoagülanların etkisi ve örnek saklama koşulları analit konsantrasyonundan bağımsızdır. Immunassaylerdeki analit bağımlı interferanslar örnekteki maddelerin reaktif içerisindeki antikorlar ile etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Bu interferanslar arasında heterofilik antikorlar, otoantikorlar, romatoid faktör ve diğer proteinler yer

alır. İnterferan antikorun doğasına bağlı olarak yalancı yüksek veya düşük sonuçlar elde edilebilir. Etkinin büyüklüğü interferan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ancak oransal etki olması şart değildir. Bir bireyde bağlayıcı proteinler analit ile immunassay antikoru arasında girişime yol açabilir (Rauh ve ark).

Hastaya dışarıdan tedavi maksatlı verilen ekzojen antikorlarda kitteki antikorlarla interferansa yol açabilir. Ekzojen interferanslar eksternal faktörlere bağlı oluşan normal olarak kişide bulunmayan uygun alınmamış veya saklanmamış örneklerde görülen girişimlerdir. Hemoliz, lipemi, ikter, örnek toplama tüpleri ve katkı maddeleri, radyoaktif veya floresan maddeler, ilaçlar, bitkisel takviyeler, gıda destek ürünleri, örnek depolanması ve taşınması bu tiptedir (Schiettecatte ve ark 2013).

Çapraz reaktivite özellikle yarışmalı ölçümlerde sıklıkla ortaya çıkan immunassaylerde görülen en yaygın interferanstır. Ölçümü yapılmak istenen analit ile benzer yapıda aynı epitoplara taşıyan yapısal olarak analite benzeyen maddelerin yaptığı nonspesifik girişimdir. Antikoru bağlanma bölgesi için yarışmalar ve sonucun yüksek veya düşük çıkmasına neden olurlar. Örneğin kortizol ölçümünde fludrokortizon kullanan hastada bu ilacın metabolitlerine karşı çapraz reaksiyon oluşması sonucu yalancı yüksek sonuçlar elde edilmektedir. Yine vitamin D nin aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D ölçümünde 25-OH vitamin D'nin çapraz reaksiyonu söz konusudur (Schiettecatte ve ark 2013).

Immunoassayler genellikle spektral veya kimyasal ölçüm temeline dayalı olmadığından hemoliz ve ikterden etkilenmezler. Fakat özellikle eritrositlerden proteolitik enzimlerin salınımına bağlı olarak labil olan moleküllerin ölçümünde (insülin, glukagon, kalsitonin, PTH, ACTH ve gastrin) hemoliz immunoassayler için kabul edilemez. Lipemi özellikle türbidimetri ve nefelometri gibi yöntemleri kullanan sistemler için interferans kaynağıdır. Örneğin esterleşmemiş yağ asitleri, serbest T4 ile yarışarak sonuçları değiştirebilir. Yine steroidlerin antikora bağlanmasında esterleşmemiş yağ asitleri tarafından bloke edilebilir. İnterferans etkilerine ilişkin yapılan çok merkezli bir çalışmada RF pozitifliği olan 72 yaşında bir postmenapozal bayanda 11 metodun 9 tanesi yüksek olan FSH'yı birbiri ile uyumlu olarak düşük bulmuşlardır. Eğer imkan varsa LC-MS/MS ile tekrarlanması önerilmektedir (Schiettecatte ve ark 2013).

Steroid analizlerinde son zamanlarda artan bir şekilde kütle spektrofotometrelerine bir yöneliş olduğu görülmektedir. Steroid moleküllerinin analizinde kullanılan antikorların spesifite sorunu immünassay temelli çalışmaların en büyük problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Radyoaktivite ise ilgili çalışmalarda son derece sıkı kontrol gerekmekte ve radyoaktiviteye maruz kalma riskini doğurmaktadır. Yine kullanılan radyoaktif iyot 125 çalışmalarında radyoizotopun ömrünün kısalığı rutin işlemlerde sorunlara yol açmaktadır. Ülkemizde herhangi bir nükleer santral bulunmadığından radyoaktif izotoplar sürekli bir şekilde yurt dışından ithal edilmek zorundadır. Radyoaktif izotopun yarılanma ömründen dolayı analizler her hafta çalışılan analizlerde farklı radyoaktivite ölçümleri de testin analizinde problem yapabilmektedir. Radyoizotopun stabilitesindeki sorun nedeni ile örnek sayısının az olduğu laboratuvarlarda RIA yönteminin tercih edilmemesini sağlamaktadır.

ELISA yöntemleri ise analitik belirsizliğinin yüksek olması nedeni ile pek tercih edilmemektedir. Her 2 immunoassay metodunda da gerek primer antikorun gerekse de işaretlenmiş ikinci antikorun spesifite düşüklüğü lotlar arası farklılık immunoassaylerin ciddi bir problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Yine steroidlerin çözünürlük probleminden dolayı sıklıkla proteine bağlı halde bulunmaları proteine bağlanma kinetikleri antikorun epitopunu tanımada problem yaratabilmektedir. Yine vücutta karaciğer tarafından metabolize edilen steroidlerin ne kadar bu antikorlar tarafından tanınıp tanınmadıkları konusunda herhangi bir bilgi literatürde bulunmamaktadır. Oldukça küçük modifikasyonlar ile oluşan yeni steroid molekülünde inaktif bir molekül olabilmesi farklı bir steroid olarak adlandırılması ve farklı fonksiyon gösterebilmesi açısından cross reaktivitenin ne kadar intereferansa yol açacağı belirlenemeyen bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kütle spektrofotometreleri molekülü olduğu gibi ölçen analitik sistemler olduğu için aktif metaboliti daha büyük hassasiyetle ölçebilmekte ve klinik durum konusunda daha net karar verilebilir hale gelmesini sağlamaktadır. Nitekim Mayo klinik laboratuvarları steroid analizlerinde neredeyse %70 analizini kütle spektrofotometrelerine yönelmiş durumdadır. Immunoassaylar konusundaki kısıtlılık açısından biz laboratuvarımızda 17-OHP için LC-MS/MS yöntemi kurmayı hedefledik.

Yöntem değerlendirme ve metot validasyon çalışmasında da laboratuvarlarda uygulanması düşünülen yeni bir yöntemde mevcut olabilecek analitik hataların oranını belirledik. Bir yöntem kurarken dikkat edilecek noktalardan rastgele hata, sistematik hata ve toplam hata analizlerini gerçekleştirdik. Bu amaçla rastgele hata için tekrarlanabilirlik deneyleri, sistematik hata için interferans, geri kazanım ve yöntem karşılaştırma deneyleri yaptık. Deneysel olarak hesaplanan hata o konsantrasyonda izin verilebilen hata düzeyinden küçük bulunduğu takdirde yeni yöntemin performansının yeterli olduğuna karar verdik.

Yaptığımız bu metot geliştirme çalışmasında linearite, kesinlik, interferans geri elde, deteksiyon limitlerini belirledik. Daha sonra geliştirdiğimiz bu metodun hasta tanısında kullanılabilirliğini test etmek amacı ile referans aralık doğrulama çalışması, sensitivite, spesifite ve metod kıyaslama çalışması gerçekleştirdik.

Yaptığımız çalışmada geliştirdiğimiz metodun linearite aralığı olarak 0.195-100 ng/mL düzeyini belirledik. Daha düşük dozlarda linearitenin bozulduğu ve analitik hata oranının arttığını gözlemledik. Ama bu düşük konsantrasyonların klinik karar verme aşamasında herhangi bir öneminin olmaması nedeni ile daha alt deteksiyon limitlerini geliştirmek için uğraşmadık. Daha yüksek konsantrasyonlarda linearite probleminin kromatografik ya da kromatografik kütle analizlerde pek olmadığı bilinmektedir. İmmünassaylarda hook effect olarak karşımıza çıkan analit fazlalığı problemi kromatografik temelli metodlarda çok sıkıntı yaratmamaktadır. İmmünassaylarda her bir analiz için kullanılan ortalama antikor miktarının sabitliği ortamdaki analitin fazlalığı durumunda hook etki olarak karşımıza çıkabilmekte ve doğru sonuca ulaşabilmek açısından birkaç kez yeniden analiz gerekmekte buda hem kit hemde zaman açısından hiçde ekonomik olmamaktadır. Linearite üst sınırımızın daha üst düzeylerinin de klinikte sık olarak karşımıza çıkmayacağından daha üst derişimler de linearite çalışması yapmadık. Ama en üst düzey olan 100ng/mL konsantrasyon da %97'lik bir uygunluğun olması bize daha üst konsantrasyona sahip bir hastanın numune ölçümünde de doğru sonuç verebileceğini göstermektedir. Geliştirdiğimiz yöntemin linearite aralığı ELISA yöntemine göre çok daha fazladır. ELISA yönteminde prospektüsde en yüksek aralık 19,2mg/ml olarak belirtilirken daha yüksek konsantrasyonlar için dilüsyon ve analizin tekrarı gerekmektedir.

Yöntemimiz linearite aralığı çok daha geniş olması numune tekrarını çok daha azaltmaktadır.

Kesinlik çalışmalarımızda ise gerek gün içi aynı çalışma, gün içi farklı çalışma ve günler arası çalışmalarda tekrarlanabilirliğimizin oldukça iyi olduğunu gözlemledik. Her bir çalışma için rutin bir analiz için güvenle kullanılacak % CV değerlerine ulaştık. Her biri için % CV değerleri 1.5 ila 5.7 aralığında idi. Yine bu çalışmalarda ilgili analit için verilen analitik hatanın çok altında kaldığı ve rastgele hata oranının düşük olduğunu gözlemledik. Rastgele hata yönünden geliştirilen bu metodumuzun oldukça güvenli olduğunu söyleyebiliriz.

Sistematik hata değerlendirilmesi için yaptığımız interferans analizinde son derece düşük interferan etki olduğunu gözlemledik. Rutin laboratuvar analizlerinde sıklıkla karşımıza çıkan hemoliz, ikterik ve lipemik numunelerin herhangi bir şekilde analizimizi etkilemediğini gördük. Hemoliz % 3.5 lipemi % 6 ve ikterik numunelerin etkileşimini % 5.6 olarak belirledik. Analitik yöntemi gereği bu tür numunelerin interferansa neden olmayacağı aşikar olsa da biz metod validasyonu kriterlerine sadık kalarak bu interferansları da inceledik. Yine immünassaylarda kontrol edilmesi gereken benzer yapıdaki steroid interferanslarında oldukça düşük kaldığı ve analitimizin düzeyi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını gördük. Steroid interferansları için gerek plazmada daha fazla konsantrasyonda bulunan steroidleri gerekse de dışarıdan çeşitli amaçlarla ilaç olarak alınabilecek steroidleri test ettik. Bu çalışmada aldığımız etkileşimlerin östrojen için % 7.7, progesteron için % 2.8, testosteron % 8.2, kortizol % 7.7, kolesterol % 9.3, spiroteron asetat % 8.6 ve BSA-PBS % 2.2 olduğunu gördük. Aktarım (carryover) çalışmasında % 1.3' lük aktarım tesbit edildi. Bu düzeydeki aktarım önemsiz olduğu sonucuna varıldı. Sonuç olarak bu yöntemimizin herhangi bir ciddi etkileşime uğrmadığını gözlemledik. Bu çalışmada LOD 0.15ng/mL ve LOQ 0.4 ng/mL olarak bulundu. Çalışmamızda sensisitivite % 96, spesifite % 95 olarak bulundu.

Literatürde de benzer çalışmalarda steroidler için verilen interferans değerlerinin çalışmamız ile benzer olduğunu gözlemledik. Turpeinen ve ark (2005) çalışmada 5-250 nmol/L konsantrasyonlarda lineer sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca değişkenlik katsayıları (CV) leri de ortalama % 8.2-9.2 olarak bulmuşlar (Turpeinen ve ark 2005). Rauh ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada 250 ng/mL' ye kadar

lineer olarak bulurken LOD 0.1 ng/mL, LOQ 0.3 ng/mL, geri kazanım %100, çalışma içi ve çalışmalar arası % CV ler 2.1-20.4 olarak bulunmuştur (Rauh ve ark 2006). Lacey ve ark (2004) çalışmasında ise % CV ler çalışma içi ve çalışmalar arasında 3.9-20 arasında, linearite ise 160 ng/mL'ye kadar lineer tesbit edilmiştir (Lacey ve ark 2004). Sistemik hata yönünden yöntemimizin interferans açısından oldukça düşük olduğunu gördük.

Yine sistemik hata belirlemek için yaptığımız geri kazanım çalışmalarında ortalama %99 geri kazanım sonuçları elde ettik. Turpeinen ve ark. (2005) yaptığı çalışmada geri kazanımı %83 olarak bulmuşlardır (Turpeinen ve ark 2005). Geri kazanım oranlarımızın oldukça iyi olduğunu gözlemledik.

Metot kıyaslama yönteminde Dia-Metra firması tarafından üretilen ELISA kitini kullandık. İlgili kitin çalışma prospektüsünde yazılan değerler temel alınmıştır. Yaptığımız bu çalışmada biz kullanılan ELISA kitinin metot validasyonunu irdelemedik. Sadece geliştirdiğimiz yöntem ve bu ELISA metodu ile hasta ve kontrol kıyaslaması yaptık. Çalışma sonucunda 0.57 gibi bir korelasyon katsayısına ulaştık. Ama gerek yüksek gerekse düşük konsantrasyonlarda bu regresyon katsayısının oldukça düşük olduğunu gözlemledik. Lacey ve ark (2004) yaptığı çalışmada 17-OHP için immunoassaylarda yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçların fazla olduğu ve bu hataların LC-MS/MS sistemleri ile azaltılabileceği belirtilmiştir (Lacey ve ark 2004). Yine Turpeinen ve ark (2005)'nin yaptığı çalışmada LC-MS/MS ve RIA metodlarının karşılaştırılmasında 10 nmol/L üzerindeki konsantrasyonlarında korelasyon gayet iyi iken 5 nmol/L 'nin altında korelasyon sonuçlarının iyi olmadığı görülmektedir (Turpeinen 2005). Bizim yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarından ELISA kitinin doğru ölçüm aralığının dar olduğu kanaati bizde oluşmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İmmunolojik analiz yöntemleri antijen-antikor birleşme reaksiyonlarına göre çalışırlar. İmmunolojik analiz teknikleri antijen antikor esasına dayanan analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde bilinen bir antikora karşı antijen ya da antijene karşı antikor vardır. Antijen ve antikor miktarlarına göre nicel ölçümler yapılabilir.

Antijen antikor birleşmesi spesifik bir olaydır. Ancak birbirine benzeyen gruplar arasında reaksiyonlar olabilir. Bu reaksiyonlara çapraz reaksiyon denir. Antijen antikor birleşmeleri kimyasal ve nonkovalent bir olaydır. Antijen ve antikor multivalan olduklarından değişik oranlarda bağlanabilirler. Bu birleşmeyi pH, sıcaklık gibi çevresel faktörler etkiler. Çapraz reaksiyonlar, interfeanslar ve çevresel faktörlere bağlı olarak immunolojik yöntemlerin linearitesinde, tekrarlanabilirliğinde, sensitivite ve spesifitesinde sorunların olabileceğini düşünmekteyiz. Yukarıda bahsedilen sorunların ya daha az görüldüğü ya hiç görülmediği yöntem olan kütle spektrometrelerinin bu tür analizler için iyi bir alternatif olduğunu düşünmekteyiz.

Hastanemizde steroid analizlerinin kütle spektrometreleri ile analizleri için ilk adım olarak başladığımız 17- α hidrosiprogesteron (17-OHP)'un (LC-MS/MS yöntemi ile analiz metot validasyonunu yaptık. Metot validasyonu konusunda CLIA'nın belirlemiş olduğu prosedürler uygulanarak çalışma tamamlandı. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz linearite, doğruluk, tekrarlanabilirlik (gün içi ve günler arası), geri kazanım, numune aktarımı ve interferans deneyleri sonuçları CLIA ve Westgard kurallarına göre başarılı bulundu. Ayrıca sonuçlarımız literatürlerle de uyumlu bulundu. Literatürlerdeki veriler çalışma sonuçlarımızın olumlu olduğunu göstermektedir.

Metod karşılaştırma çalışmasında ise kendi geliştirdiğimiz metod ile ELISA arasındaki korelasyonun iyi olmadığı görüldü. Biz bu uyumsuzluğun ELISA yönteminin analitik performansındaki düşüklüğe bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Zira ELISA'da hasta tekrarlanabilirlikleri ve klinik uyumsuzlukları gözlemledik.

LC-MS/MS sisteminin bulunmadığı merkezlerde klinikle uyumsuz sonuçları doğrulama amacı ile bu sistemin ve çalışan metodun olduğu laboratuvarlara örnek transferinin yapılmasının uygun olacağını düşünüyoruz.

Biz geliştirmiş olduğumuz 17-OHP'nin LC-MS/MS analiz yönteminin, 17-OHP'nin klinik analizlerinde rutin olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Kısaca bu çalışma klinik pratikte yer alabilecek performansı ile planlanan hedefe ulaşmıştır.

KAYNAKLAR

1. Alataş Ö, Çolak Ö, Köseoğlu M, Orçun A, Türkmen S. Laboratuvar Organizasyonu Yönetimi ve Kalite.2004:102-123.
2. Apter D, Jañne O, Karvonen P, Vihko R. Simultaneous determination of five sex hormones in human serum by radioimmunoassay after chromatography on Lipidex-5000. *Clin Chem* 1976,22:32–38.
3. Arakawa D, Read GF, Walker RF, Griffiths K. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr Rev.* 1982 Fall;3(4):367-395.
4. Arakawa H, Maeda M, Tsuji A. Chemiluminescence enzyme immunoassay of 17 alpha-hydroxyprogesterone using glucose oxidase and bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate - fluorescent dye system. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1982 Aug;30(8):3036-3039.
5. Barnett RN. Medical significance of laboratory result. *Am J Clin Pathol.* 1968,50:671-676.
6. Bookbinder MJ, Panosian KJ. Using the coefficient of correlation in method-comparasionstudies. *Clin. Chem.*1987,33/7:1170-1176.
7. Boudi A, Giton F, Galons H, Eurlly B, Villette JM, Soliman H, et al. Development of a plasma 17ahydroxyprogesterone time resolved-fluorescence immunoassay involving a new biotinylated tracer. *Steroids.* 2000,65:103–108.
8. Capponi AM. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450scc and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem.* 1997, 272(12):7899-7907.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. CLSI Document C28-A3c. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute,2010.
10. De Villa G.O, Roberts K, Wiest WG, Mikhail G, Flickinger GA. Specific radioimmunoassay of plasma progesterone. *J. Clin. Endocrinol Metab.*1972,35 458-460.
11. Deneux C, Tardy V, Dib A, Etienne M, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttenn F. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:207-213
12. Diczfalusy E, Mancuso S. Steroid biogenesis and metabolism in the fetoplacental unit. *Riv Anat Patol Oncol.* 1965;28(3):333-353
13. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 ;53(1):58-68.
14. Dunn JF. Nisula BC., Rodbard D. Transport of steroid hormones; Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globuline and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J.Clin. Endocrin. Metabol.* 1981,53(1): 58-68.
15. Emon JMV, Chuang JC, Trejo RM, Durnford J. Integrating bioanalytical capability in an environmental analytical laboratory. In: Emon JMV, editors. *Immunoassay and Other Bioanalytical Tekhniques.* CRS press. 2000, pp 6-9.
16. Etter ML, Eichhorst J, Lehotay DC. Clinical determination of 17 hydroxyprogesterone in serum by LC-MS/MS: comparison to Coat-A-Count RIAMethod. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006, 7;840(1):69-74.
17. Fraser CG, Petersen PH. Desirable standarts for laboratory test if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993, 39: 1447-1453.
18. Fraser CG. Biological variation in clinical chemistry an update collated data 1988-1991. *Arch Pathol Lab Med* 1992,116: 916-923.
19. Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, Brito VN, Mendonca BB, Bachege TA. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011 Nov;55(8):632-637.

20. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 2006, 116:2062-2072.
21. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004,80(6): 1678-1688.
22. Holick MF. Vitamin D. Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:362–371.
23. Houk CP, Hughes IA, Ahmed SF, Lee PA. Writing committee for the international intersex consensus conference participants. Summary of consensus statement on intersex disorders and their management. International Intersex Consensus Conference. *Pediatrics* 2006, 118: 753-757.
24. Hubl W, Fehér T, Rohde W, Dörner G, Taubert H, Freymann E. Enzyme immunoassay of 17-hydroxyprogesterone in plasma, microfilter paper blood and saliva of newborns, children and patients with congenital adrenal hyperplasia. *Endokrinologie.* 1982 Jun;79(2):165-172.
25. Janne O, Apter D, Vihko R. Assay of testosterone, progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone in human plasma by radioimmunoassay after separation on hydroxyalkoxypropyl sephadex. *J Steroid Biochem.*1974,5:155–162.
26. Kao PC, Machacek DA, Magera MJ, Lacey JM, Rinaldo P. Diagnosis of adrenal cortical dysfunction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Lab Sci.* 2001,31:199–204.
27. Kaplan LA., Pesce AJ., Kazmierczak SC. Fourth Edition, *Clinical Chemistry, Theory Analysis Correlation Evaluation of Methods*, Mosby Company.2003,pp402-438.
28. Kaplan NM. The Adrenal Glands. In: *Textbook of Endocrine Physiology*. Griffin JE, Ojeda SR. (eds).Second Edition. Oxford University New York. Pres, 1992,p247-275.
29. Katayama M, Nakane R, Matsuda Y, Kaneko S, Hara I, Sato H. Determination of progesterone and 17-hydroxyprogesterone by high performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3 propionohydrazide. *Analyst.* 1998,123:2339–2342.
30. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem.* 2011,44(1):77-88.
31. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M, Lymp J, Hahn SH, Rinaldo P, Matern D. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroidprofiling using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2004 Mar;50(3):621-5. Epub 2003 Dec 4.
32. Lai CC, Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, Lin WD, Lee CC. Monitoring of congenital adrenal hyperplasia by microbore HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry of dried blood spots. *Clin Chem.* 2002,48:354–356.
33. Maghribi HA. Congenital adrenal hyperplasia: Problems with developmental anomalies of the external genitalia and sex assignment. *Saudi J Kidney Dis Transplant*, 2007,18(3):405-413
34. Magnisali P, Chalioti MB, Livadara T, Mataragas M, Paliatsiou S, Malamitsi-Puchner A, Moutsatsou P. Simultaneous quantification of 17 α -OH progesterone, 11-deoxycortisol, Δ 4-androstenedione, cortisol and cortisone in newborn blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 1;879(19):1565-1572.
35. Merke D, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*,2005, 365:2125- 2136
36. Miller EI, Murray GJ, Rollins DE, Tiffany ST, Wilkins DG. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of nicotine biomarkers in hair and an evaluation of wash procedures for removal of environmental nicotine. *J Anal Toxicol.* 2011 Jul;35(6):321-332.
37. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*: 2013 Apr 28.doi: 10.1016/j.mce.2013.04.014.

38. Milunsky A, Milunsky J. Genetic Disorders and the Fetus Diagnosis Prevention and Treatment, Wiley-Blackwell, Sixth Edition, Boston, 2010,p610-613
39. Molina PE. Endocrine Physiology, Third Edition, USA, McGraw Hill Professional,Boston 2009. pp143-237
40. Nahoul K. Plasma 17-hydroxyprogesterone determination with two commercial immunoassays. J Steroid Biochem Molec Biol 1994,50:197–203.
41. OSHA regulations on cadmium surveillance (29 CFR 1910.1027), Fed Regist 1968;58: 21778 ff, Appendix F
42. Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ITC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics.1988,81:866–74.
43. Penning TM. Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenase. Endocr Rev. 1997, 18(3):281-305.
44. Peretti E, Forest MG. Pitfalls in the etiological diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the early neonatal period. Horm Res ,1982,16:10–22.
45. Rauh M, Gröschl M, Rascher W, Dörr HG. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. Steroids. 2006 Jun;71(6):450-8. Epub 2006 Mar 29.
46. Rimoin DL, Connor JM, Emery AEH, Pyeritz RE. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, Fifth Edition, Elsevier Health Sciences, 2007,pp2911-2927
47. Saisho S, Shimozawa K, Yata J. Changes of several adrenal 4-steroids measured by HPLC-UV spectrometry in neonatal patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Horm Res. 1990,33:27–34.
48. Schiettecatte J, Anckaert E, Smits J. Interferences in Immunoassays in “Textbook Advances Immunoassay Technology”. 2013,06 P45-48 .
49. Simard J, Ricketts ML, Gingrads S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase D5-D4 isomerase gene family. Endocr Rev.2005, 26:525-582.
50. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest,1992, 90:584–595.
51. Speroff L, Fritz MA. Hormon Speroff L, Fritz MA. biyosentezi metabolizması ve etki mekanizmaları. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. Lipincott Williams and Wilkins.2007, 25-96.
52. Stanczyk FZ: Production, Clearance, and Measurement of Steroid Hormones. The global library of women’s medicine. 2009; DOI 10.3843/GLOWM.10278
53. Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay F.Z. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi içinde. 3.3 Tanısal Yeterlilik Testleri. İstanbul; 2000,s109.
54. Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi, Matr Matbaacılık Hizmetleri AŞ, 2000,pp 71-105.
55. Tonks DB. Study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadian Laboratories, Clin Chem 1963, 9: 217-233
56. Trakakis E, Loghis C, Kassanos D. Congenital adrenal hyperplasia because of 21-hydroxylase deficiency. A genetic disorder of interest to obstetricans and gynecologist. Obstet Gynecol Surv. 2009, 64(3):177-189.
57. Turpeinen U, Itkonen O, Ahola L, StenmanU.H. Determination of 17a hydroxyprogesterone in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and immunoassay. Scand J Clin Lab Invest. 2005; 65: 3–12.
58. Westgard JO, Hunt MR; Use and interpretation of common statistical test in method-comparasion studies. Clin. Chem.1973,19:49.
59. Westgard JO,Carey RN, Wold S.Criteria for judding precision and accuracy in method development and evaluation. Clin Chem. 1974, 20/7: 825-833.

60. Westgard JO. Points of care in using statistical in method comparison studies. *Clinical Chemistry*. 1998, 44: 2240-2242.
61. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*. 2000, 21(3):245-291.
62. Wisdom GB. Enzyme-immunoassay. *Clin Chem*. 1976 Aug;22(8):1243-1255.
63. Wong T, Shackleton CHL, Covey TR, Ellis G. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem*. 1992;38:1830-1837.
64. Wudy SA, Hartmann M, Svoboda M. Determination of 17-hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchtop liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Horm Res*. 2000;53:68-71.
65. Yılmaz T. *Canlıda Organik Yapı*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1. Basım. 2007. s.419-566.

ÖZET

TC
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

17-OH progesteron ölçümünde immunoassay ve sıvı kromatografi–kütle spektrometri (LC-MS/MS) metodlarının karşılaştırılması

Fikret Akyürek

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya, 2014

Klinik laboratuvarlar, hastaların tanı, tedavi ve takibinde çok önemli bir yer tutar. Bu nedenle tüm hastalar ve bunların bakımından sorumlu klinik personelin gereksinim ve beklentilerini yerine getiren tıbbi merkezlerdir. Klinik laboratuvar da yapılan hatalar, hasta sağlığını direkt olarak etkileme potansiyeline sahiptir. Laboratuvar sonuçlarının kesinlik ve doğruluğu hastalıkların ayırıcı tanısı, tedavisi ve takibi açısından son derece önemlidir. Laboratuvar test teknolojileri hızla gelişmekte, çok çeşitlilikte ve duyarlılıkta ölçüm metodları veya prosedürleri klinik laboratuvarların gündemine girmektedir. Yeni yöntemlerin rutin olarak kullanılabilmesi için performans testlerini başarı ile geçmesi gerekir.

Yeni analitik bir metod yaparken, o metodun uygulanacağı cihazlardan ve yapılan işlemde kaynaklanan zorlukların yanında analitin kimyasal özelliklerine bağlı olan zorluklar da vardır. İmmünojenik analiz yöntemlerinde en önemli sorun çapraz reaksiyonlar ve kit kalitesi iken, kütle spektrometrelerinde ise maliyet, teknik alt yapı, yetişmiş eleman ve ön işlemlerin fazlalığıdır. Ancak bu zorluklara rağmen kütle spektrometreleri steroidlerin analizinde kütle spektrometreleri altın standart olarak kabul edilmektedir.

Steroid yapısında olan ve böbrek üstü bezinde salgılanan 17-hidroksiprogesteron metabolizmasındaki bozukluklar, konjenital adrenal hiperplazi (KAH) gibi çok önemli hastalıkların sebebi olabilir. KAH'ın en sık sebebi 21 hidroksilaz enzim eksikliğidir. KAH, sekonder sex karakterlerinin oluşumunu, vücudun su ve tuz dengesinin sağlanması, glukoz metabolizması başta olmak üzere metabolik yollar ve immünite gibi hayati öneme sahip bir çok sistemi etkileyebilir. Ayrıca over kaynaklı sentez bozukluklarına bağlı olarak da klinik manifestasyonlar görülebilir.

Çok geniş yelpazede klinik bulgu veren KAH gibi hastalıkların tanısını doğru koyabilmek için tanısal testlerinin doğru yapılması gerekir. Bizde bu bağlamda 17-OHP testi için tandem MS' de metod validasyonu yapmayı ve valide edilen metodun ELISA ile karşılaştırmasını yapmayı planladık. Metod validasyonunda CLIA kurallarına riayet edildi.

Metod validasyon basamakları tek tek çalışıldı. Linearite çalışması 0.19 ng/mL ile 100 ng/mL aralığında yapıldı ve bu aralıkta lineer bulundu. Tekrarlanabilirlik çalışmasında en yüksek CV % 5.7 bulundu. İnterferans çalışmasında % fark en yüksek, % 9.3 olarak bulundu. Geri elde çalışmalarında ortalama % 99 luk geri kazanım elde edildi. Kantitasyon limiti 0.4 ng/mL, deteksiyon limiti 0.2 ng/mL olarak bulundu. Numune aktarımı ortalama 0.013 ng/mL olarak bulundu. Sensitivite % 96, spesifite % 95 olarak bulundu. Bu sonuçlar CLIA kurallarına göre değerlendirildiğinde geliştirdiğimiz metodun performansı olumlu olarak değerlendirildi. Metod karşılaştırılmasında ise korelasyon katsayısı 0.57 olarak bulundu. Korelasyon katsayısındaki düşüklük ELISA ya kaynaklı olabilir.

Geliştirmiş olduğumuz metodun rutin hastalarda doğrulama testi olarak kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: 17-hidroksiprogesteron, LC-MS/MS, Kantitatif tayin, Metod validasyonu

SUMMARY

Comparison of immunoassay and liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS/MS) methods in the measurement of 17-OH progesterone

Clinical laboratories play an important role for diagnosis, treatment and follow-up of all patients. Therefore, clinical laboratories are medical centers that meet the requirements and expectations of clinical personnel responsible for the care of patients. Errors in the clinical laboratory have the potential to affect the health of the patient directly. Precision and accuracy of the test results are of great importance for laboratory diagnosis of diseases, treatment and follow-up. Laboratory testing technologies are rapidly evolving, multipanel and highly sensitive measurement methods and procedures come to the fore of clinical laboratories. New methods must successfully pass performance tests for routine use.

During a new analytical method application, in addition to the process and devices constraints, there are difficulties depending on the chemical nature of the analyte. Whereas, the most important problems of immunological methods are cross reactions and quality of the kit, this is cost, technical infrastructure, trained personnel requirement and sample pre-treatment for mass spectrometers. However, despite these difficulties, mass spectrometers are considered the gold standard for the analysis of steroids.

Disorders of 17-hydroxyprogesterone metabolism, a steroid secreted by the adrenal gland, may be responsible for such important diseases as congenital adrenal hyperplasia (CAH). The most common cause of CAH is the lack of the enzyme 21-hydroxylase. CAH affects the secondary sex characteristics formation, remaining the body's salt and water homeostasis and glucose metabolism, metabolic pathways and immunity that has vital importance for the body. Also, the clinical manifestations may be observed depending on ovarian synthesis disorders.

Diagnostic tests must be performed correctly for the diagnosis of wide clinical symptom range diseases such as CAH. For this reason, we planned to validate serum 17-OHP by tandem MS and compare with ELISA system. CLIA regulations were observed in method validation.

Method validation parameters were applied separately. Method was linear between 0.19-100 ng/mL. The highest CV was 5.7%. The difference between runs for interference was 9.3%. Recovery was 99%. Limit of quantitation and limit of detection were 0.4 and 0.2 ng/mL. Carryover was 0.013 ng/mL. Sensitivity and specificity were 96% and 95%, respectively. According to CLIA rules, the performance of our new method was comparable. The correlation coefficient was 0.57. The poor correlation might be due to ELISA method. In our opinion, our new method must be used as a confirmation test for routine patients.

Keywords: 17-hydroxyprogesterone, LC-MS/MS, Quantitative determination, Method validation

EKLER

EK. A: Etik Kurul Raporu

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2012/01

Toplantı Tarihi : 31.01.2012

Karar Sayısı 2012/38 Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ali ÜNLÜ'nün, "17-OH Progesteron Ölçümünde İmmunoassay ve Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometre Metodlarının Karşılaştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 25.01.2012 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr. Ali ÜNLÜ'nün, "17-OH Progesteron Ölçümünde İmmunoassay ve Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometre Metodlarının Karşılaştırılması" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekretaryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
31/01/2012

Mahmut KESİK
Sekreteryaya

ÖZGEÇMİŞ

15.02.1975 tarihinde Erzurum İli Tortum İlçesi Kaleboynu Köyünde doğan Fikret Akyürek, ilkokulu doğduğu köyde okuduktan sonra orta ve lise tahsilini Erzurum Merkezde yaptı. 1995 yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesine başladı ve 2001 yılında tıp fakültesinden mezun oldu. Tıp fakültesinden mezun olduktan sonra Erzurum İlinin Aşkale ilçesinde pratisyen hekim olarak göreve başladı. 2003 yılında askere gitti. Askerlik vazifesini Hava Tabip Asteğmen olarak İzmir’de yaptı. Daha sonra bir müddet Erzurumda Sağlık Bakanlığının değişik birimlerinde çalıştıktan sonra Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalında 1 yıl civarında asistanlık yaptı ve istifa etti. İstifa sonrası Erzurum Aziziye ilçesinde aile hekimi olarak görev yaptı. 03.10.2009 tarihinde Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak göreve başladı.