

# SEED Hematologie

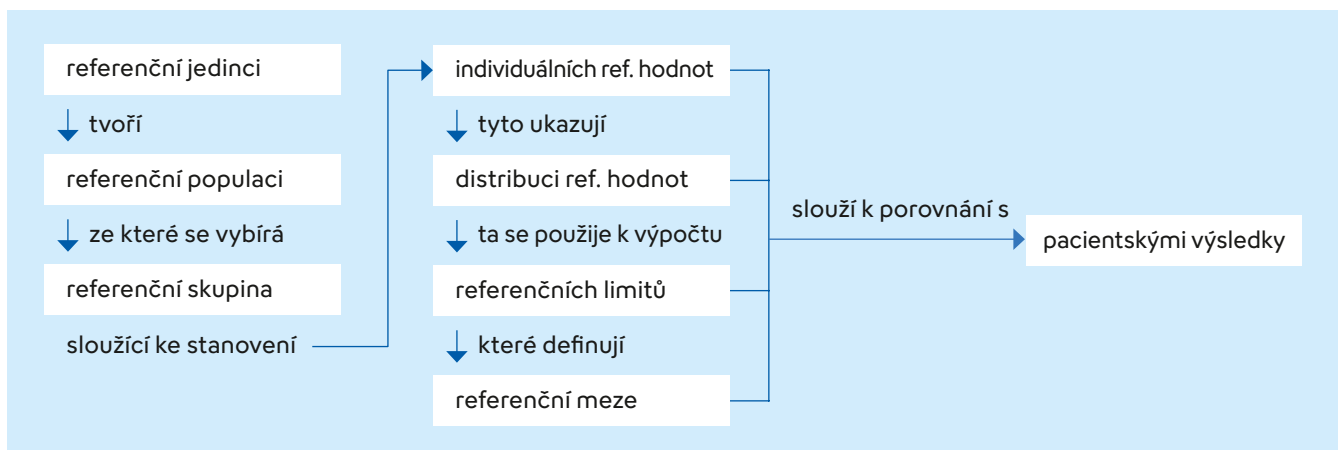


## Referenční meze a co může nabídnout Sysmex

### Význam referenčních mezí

Je potřeba si uvědomit, že samostatný výsledek nemá sám o sobě velkou výpovědní hodnotu; závěry lze vyvodit až po jeho porovnání s dalšími souvisejícími výsledky. Porovnání s předchozími výsledky stejného pacienta ukáže, zda hodnota stagnuje, stoupá, nebo klesá. Porovnání s hodnotami naměřenými u zdravých osob umožní posoudit, zda je výsledek ve fyziologickém rozmezí nebo ne. Porovnání s rozhodovacími limity pomůže stanovit případná další lékařská opatření.

Referenčními mezemi se označuje rozsah hodnot, které se vyskytují u zdravých jedinců. Někdy se můžeme setkat s termínem *normální meze*. A co lze považovat za *normální*? Laboratorní hodnoty ovlivňuje řada faktorů, např. věk, pohlaví nebo stravovací návyky (viz dále). Pokud mluvíme o *referenčních mezích*, musíme vědět, k jaké populaci se vztahují.



Grafika 1 Definice

Referenční populace se skládá ze všech referenčních jedinců. Ve zvláštním případě může obsahovat pouze jednoho pacienta a jeho předchozí výsledky. Většinou se však jedná o velký počet jedinců, ze kterého je potřeba vybrat reprezentativní vzorek. Ke správnému sestavení reprezentativního vzorku je třeba jasně definovat kritéria výběru (věk, pohlaví, etnický původ atd.). Pokud je známo, že výsledky měření se liší například v závislosti na věku nebo pohlaví, je potřeba odpovídajícím způsobem definovat podskupiny referenčních osob. Skupiny pacientů s určitým onemocněním mohou sloužit jako referenční populace pro jednotlivé pacienty se stejným onemocněním. Tyto speciální referenční meze jsou užitečné například při stanovení remise u akutních leukémií, po transplantaci kostní dřeně nebo během těhotenství. Jak lze očekávat, nejčastěji používané referenční meze jsou odvozeny od zdravé populace. To však vyvolává otázku, jak definovat zdravé, protože kritéria, na základě kterých by se jasně vyloučily nemocné osoby z referenční populace, neexistují.

## Podmínky pro stanovení referenčních mezí

Referenční meze zpravidla vycházejí ze *zdravých* referenčních skupin, jako jsou dárci krve, mladí lékaři, zdravotní sestry, zdravotničtí záchranáři a studenti medicíny. Výsledky takových skupin jsou sice snadno dostupné, ale ukazuje se, že se výrazně liší od výsledků běžné populace, a tedy nemohou být považovány za reprezentativní. Stručně řečeno, ať už provedeme jakékoliv výběry, vždy získáme různé referenční rozsahy, i když rozdíly mohou být nepatrné [2–4]. Následující jasně stanovený pracovní postup zajistí aplikovatelnost referenčních mezí:

1. Výsledky měření pacienta je nutné porovnávat s referenčními hodnotami, které se k němu vztahují. Stejně referenční hodnoty nelze použít pro různé účely (např. fyziologické studie u sportovců nebo sledování léčby konkrétního onemocnění), proto musí být účel referenčních hodnot předem definovaný.
2. Musejí být nastavena kritéria, podle kterých jsou jednotlivci zařazeni nebo vyloučeni z referenční populace. Pokud je nutné populaci rozdělit do podskupin (např. věk, pohlaví), musejí být tyto charakteristiky známy pro každého referenčního jedince.
3. Referenční jedinci by měli být vždy co nejvíce srovnatelní s pacienty, u kterých se referenční meze použijí.

Hlavní známé faktory, které ovlivňují referenční hodnoty a je třeba je zvážit, jsou:

- pohlaví, věk, etnický původ, sociální postavení a povolání, podmínky prostředí
- nutriční stav
- okolnosti odběru vzorků

### Faktory způsobující odchylky referenčních mezí v hematologii:

- preanalytika, stáří vzorku
  - transport
  - expozice teple
- stravovací návyky
  - množství železa
  - dehydratace
- fyzická aktivita
- nadmořská výška
- vystavení chemikáliím na pracovišti, znečištění životního prostředí, kouření, ...
- a další...

Grafika 2 Faktory ovlivňující referenční meze v hematologii

### Faktory způsobující odchylky referenčních mezí v močové analýze:

- preanalytika, stáří vzorku
  - transport
  - konzervační činidla
  - expozice světlu a teple
- stravovací návyky
- fyzická aktivita
- způsob odběru vzorků
  - první vs. druhá ranní moč
  - střední proud moči, katetrizace, ...
  - hygiena oblasti genitálií
- vystavení chemikáliím na pracovišti, znečištění životního prostředí, kouření, ...
- a další...

Grafika 3 Faktory ovlivňující referenční meze v močové analýze

## Postup stanovení referenčních mezí

Nejjednodušší metodou, která je zároveň doporučenou metodou Mezinárodní federací klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC) [3, 8], je nezávislé stanovení referenčních mezí laboratoří. Základem je zvolit vhodné referenční skupiny (např. skupina mužů a skupina žen) vybrané z vhodné referenční populace. Každá sledovaná skupina by měla zahrnovat nejméně 120 subjektů splňujících předem stanovená kritéria.

Pomocí dotazníku (např. str. 10 a 11 doporučení Klinického a laboratorního standardu CLSI / IFCC C28–A3) lze vyloučit nevhodné subjekty (např. pacienti na medikaci, která ovlivňuje výsledky měření, nebo pacienti s nevhodnou dietou). Referenční mez je pak definována jako rozmezí, ve kterém se nachází 95 % výsledků. Pokud určitý parametr může nabývat jak patologicky zvýšených, tak snížených hodnot, jako je tomu u většiny hematologických parametrů [5–7], vyloučí se jak horních, tak spodních 2,5 % výsledků a zbývající rozmezí se použije jako referenční mez. Pokud může být výsledek měření pouze patologicky zvýšený, ale nelze předpokládat příliš nízké hodnoty, jako tomu bývá v případě počtu buněk při analýze moči, získá se referenční mez vyřazením horních 5 % hodnot.

Další možností stanovení referenčních mezí je použití matematicky složitější metody založené pouze na 80 subjektech (viz grafika 4). Pokud naměřené hodnoty u různých podskupin, např. muži a ženy, nevykazují statisticky významné rozdíly, lze výsledky sloučit do společné referenční meze. Nevýhodnou těchto postupů je značná náročnost daná vysokým počtem analyzovaných subjektů, zejména pokud má být daný počet subjektů (80 nebo 120) dodržen i při analýze jednotlivých podskupin.

Popsaná metoda stanovení referenčních mezí je neparametrickou metodou. Použitelné jsou i parametrické metody, u kterých se referenční meze stanoví výpočtem střední hodnoty  $\pm$  dvojnásobek směrodatné odchylky. Parametrické metody nejsou použitelné pro všechny parametry, protože předpokládají, že zkoumaný parametr vykazuje normální neboli gaussovské rozložení. Soubory bez normálního rozložení lze normalizovat logaritmickou transformací. Výhodou je, že je možné pracovat s malými soubory dat, nevýhodou je matematická náročnost metody.

**Grafika 4** Parametrické versus neparametrické metody, jak vypočítat referenční meze

## Ověření vhodnosti referenčních mezí pocházejících z jiných zdrojů

Z výše uvedených důvodů je zřejmé, že referenční meze stanovené jinde než ve vaší laboratoři mohou být použity až po jejich ověření. V opačném případě může dojít k ohrožení pacienta. IFCC navrhuje následující postup ověření [8]:

Referenční meze porovnejte s 20 referenčními vzorky z vaší laboratoře. Pokud jsou maximálně 2 z 20 vzorků mimo rozsah, meze můžete použít. Pokud jsou 3–4 vzorky mimo rozsah referenčních mezí, rozšířte analyzovanou skupinu o dalších 20 nových vzorků z vaší laboratoře. Pokud jsou maximálně 2 z těchto 20 vzorků mimo rozsah, meze můžete použít. Pokud je na začátku procesu ověřování 5 vzorků mimo publikované referenční meze nebo v druhém kroku ověřování více než 2 vzorky mimo publikované meze, nejsou referenční meze pro vaše pacienty vhodné. Alternativou je pak stanovení vlastních referenčních mezí (viz výše), nebo ověření jiných referenčních mezí.

## Významy referenčních mezí a rozhodovacích limitů

Pacient, jehož výsledky jsou mimo referenční meze, nemusí nutně vyžadovat lékařskou péči:

Vezmeme-li v úvahu metodu výpočtu referenčních mezí, 5 % hodnot referenční populace stojí mimo referenční rozmezí a takový pacient může být jednoduše součástí této skupiny (mějte na paměti, že 5 % znamená 1 pacient z 20). Další možností jsou mírné formy nemocí, které mnohdy nevyžadují lékařskou intervenci. Takový výsledek je vhodné porovnat s rozhodovacími limity známými jako *mezí hodnoty*. Ty se stanoví například pomocí ROC křivky (Receiver Operating Characteristic, operační charakteristika přijímače).

Rozhodovací limity se stanovují i u chronických onemocnění, např. aby bylo možné určit, zda je pacient stabilní, nebo vyžaduje zahájení či změnu terapie. Referenční meze chronicky nemocných pacientů se stanovují stejně, jak je popsáno výše, pouze s využitím kohorty pacientů se stabilizovaným onemocněním. Takové rozhodovací limity často vycházejí pouze z lékařských zkušeností a konsensu v rámci příslušné specializace.

## Nepřímé stanovení referenčních mezí

Výbor IFCC C-RIDL (Committee on Reference Intervals and Decision Limits) publikoval nový přístup jak stanovit referenční meze [9]. Tato nepřímá metoda se odkazuje na statistickou analýzu již existujících výsledků měření vzorků, které byly odebrány pro rutinní účely. Jedná se o užitečný doplněk k běžné přímé metodě, který přináší mnoho výhod: opírá se používané analytické a preanalytické postupy, umožňuje zachytit široké spektrum populace (především populace, která je analyzována laboratorně) a jedná se jednoduchý a ekonomicky nenáročný proces. Výbor IFCC C-RIDL ve svém stanovisku podporuje laboratoře, aby využívaly nepřímý přístup k ověření používaných a ke stanovení nových referenčních mezí a aby publikovaly a sdílely své výsledky s patřičnými detaily a pokračovaly v hledání nových vylepšených technik daného procesu.

## Referenční meze z nizozemské studie Dutch Lifelines

L van Pelt *et al.* publikovali v roce 2022 multidisciplinární prospektivní populační studii, ve které hodnotili všech 105 parametrů analyzátorů řady XN [10]. Referenční meze byly vypočteny v souladu se statistickými metodami doporučenými IFCC.

Metody a referenční intervaly této studie jsou popsány v článku SEED *Jak definovat referenční meze*.

Tabulka 1 Přehled vybraných publikovaných referenčních mezí analyzátorů Sysmex

První autor	Analyzátor	Parametry	Populace
L van Pelt <i>et al.</i> [10]	XN-Series	KO + DIF + RET + PLT-F	Nizozemí
Mrosewski I <i>et al.</i> [11]	XN-9000	KO	Německo, děti
Florin L <i>et al.</i> [12]	XN-Series	KO + DIF + RET	Belgie, dospělí
Wilson S <i>et al.</i> [13]	XN-3000	KO + DIF	Kanada, děti
Bohn MK <i>et al.</i> [14]	XN-3000	KO + DIF	Kanada, děti
Ianni B <i>et al.</i> [15]	XN-1000	KO + DIF + RET + PLT-F	USA, novorozenci
Arbiol-Roca A <i>et al.</i> [16]	XN-Series	KO + DIF + RET	Španělsko
Sysmex Corporation [17]	XN-Series	KO+ DIF + RET + PLT-F	Japonsko
Dockree S <i>et al.</i> [16]	XN-Series	KO + DIF	Británie, gravidní

## Reference

- [1] **CLSI (2000):** C28-A2 How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Second Edition Vol. 29 No. 13.
- [2] **Haeckel R et al. (2007):** A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clin Chem Lab Med* 45: 1033–1042.
- [3] **Henny J et al. (2009):** The IFCC recommendations for determining reference intervals: strengths and limitations. *LaboratoriumsMedizin* 33: 45–51.
- [4] **Cerioti F et al. (2009):** Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 46: 8–17.
- [5] **Wakeman L et al. (2007):** Robust, routine haematology reference ranges for healthy adults. *Int J Lab Hematol* 29: 279–283.
- [6] **Heil W et al. (2008):** Reference ranges for adults and children. Pre-analytical considerations. Mannheim: Roche Diagnostics.
- [7] **Bain BJ et al. (1975):** Normal haematological values: sex difference in neutrophil count. *Br Med J*. 5953: 306–309.
- [8] **Solberg HE. et al. (2004):** The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med* 42: 710–714.
- [9] **Jones GRD et al. (2018):** Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *CCLM*, 57 (1), 20–29. Free online.
- [10] **L van Pelt J et al. (2022):** Reference intervals for Sysmex XN hematological parameters as assessed in the Dutch Lifelines cohort. *Clin Chem Lab Med*. 60(6): 907–920.
- [11] **Mrosewski I et al. (2021):** Indirectly determined hematology reference intervals for pediatric patients in Berlin and Brandenburg. *Clin Chem Lab Med*. 60(3): 408–432.
- [12] **Florin L et al. (2020):** Establishment of common reference intervals for hematology parameters in adults, measured in a multicenter study on the Sysmex XN-series analyzer. *Int J Lab Hem.* 42: 110–115.
- [13] **Wilson S et al. (2021):** Continuous reference curves for common hematology markers in the CALIPER cohort of healthy children and adolescents on the Sysmex XN-3000 system. *Int J Lab Hematol*. 43(6): 1394–1402.
- [14] **Bohn MK et al. (2020):** Complex biological patterns of hematology parameters in childhood necessitating age- and sex-specific reference intervals for evidence-based clinical interpretation. *Int J Lab Hematol*. 42(6): 750-760.
- [15] **Ianni B et al. (2021):** Defining Normal Healthy Term Newborn Automated Hematologic Reference Intervals at 24 Hours of Life. *Arch Pathol Lab Med*. 145(1): 66–74.
- [16] **Arbiol-Roca A et al. (2018):** Reference intervals for a complete blood count on an automated haematology analyser Sysmex XN in healthy adults from the southern metropolitan area of Barcelona. *EJIFCC*. 29(1): 48-54.
- [17] **Sysmex Corporation, Japan (2014):** Reference ranges analysis document for XN series.
- [18] **Dockree S et al. (2021):** White blood cells in pregnancy: reference intervals for before and after delivery. *EBioMedicine*: 74: 103715.