

### Poskytují producenti laboratorních diagnostik dostatek dat o referenčních intervalech?

Friedecký B.<sup>1, 2</sup>, Vávrová J.<sup>1</sup>, Kratochvíla J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

#### SOUHRN

Smyslem sdělení je vyhodnotit úroveň dat o referenčních intervalech u dvou vybraných skupin analytů srovnáním s kritérii plynoucími z teorie referenčních intervalů. U vybraných základních analytů krevního séra (glukóza, cholesterol, kreatinin, ALT, celkový protein, albumin) byla konstatována obecně přílišná šíře intervalů dolních a horních referenčních limitů neslučitelná s existencí návaznosti u těchto analytů, nedostatečné respektování pohlavního dimorfismu (ALT a kreatinin), nerespektování evropských diagnostických doporučení (cholesterol) a přenos dat, pocházejících z výběru nevhodné referenční populace do českých podmínek (ALT). U devíti imunochemických stanovení byla posouzena úroveň specifikace referenčních populací. Ve většině případů nebylo poskytnuto dostatek demografických a geografických údajů. Pracovní návody producentů běžně pracují s různými jednotkami měření, a poskytují tak možnost vydávání zcela různých numerických výsledků totožných analýz. To zvyšuje riziko chyb při diagnóze a léčbě pacientů.

*Klíčová slova:* referenční intervaly, data producentů.

#### SUMMARY

**Friedecký B., Vávrová J., Kratochvíla J.: Is the information on reference intervals provided by manufacturers sufficient?**

We assessed level of information on reference intervals provided by manufacturers for clinical laboratories. Theory of reference intervals based on IFCC approach served as criterion to this assessment. In case of selected routine analyte of blood serum (cholesterol, glucose, creatinine, ALT, total protein, albumin) different manufacturers appear to provide too broad interval of lower and upper reference limits for these analytes as compared with established metrological traceability of results. Partitioning according to sex is not introduced in three manufacturers for creatinine and two for ALT. The data provided for ALT correspond to Scandinavian reference population but not to Czech healthy persons. Values derived from American diagnostic recommendations were used for cholesterol instead of European recommended values. Data on reference population were assessed for nine immunochemical analytes, produced by two manufacturers. Especially the lack of demographic and geographic information was found.

Working protocols of manufacturers use in most cases more different measurement units and even provided more numerical values for the same analyses. This fact strongly increases the risk in the health care.

Providing the reference intervals including information on reference population is obligation of manufacturers given by Directive IVD 98/79. Despite this fact many manufacturers require establishment of their own reference intervals in users' laboratories.

*Key words:* reference intervals, data of manufacturers.

### Koncepce referenčních intervalů IFCC (Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny)

Tato koncepce je známa více než 20 let. Tehdy (1986) byla publikována její první část Solbergem et al. [1], poté následovaly další části podrobně popisující tvorbu referenčních intervalů – od jejich definice, přes tvorbu referenční populace až k statistickému zpracování výsledků referenční populace do podoby referenčních intervalů [2].

Koncepce referenčních intervalů IFCC a její dopad v praxi činnosti klinických laboratoří jsou stručně, jasně a srozumitelně popsány v příručce CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) C 28-A2 publikované v roce 2000 [3].

Z jejího obsahu lze vyčíst minimum podmínek bezpodmínečně potřebných pro určení referenčních intervalů:

- Minimální počet jedinců referenční populace je 120 v každé její podskupině.

- Základními faktory pro dělení referenčních intervalů do podskupin jsou věk a pohlaví.
- Jsou popsány základní demografické a geografické faktory referenční populace.
- Jsou známy a popsány základní analytické faktory měření vzorků referenční populace, zejména pak návaznost výsledků.
- Jsou známy a popsány preanalytické podmínky (odběr, příprava pacienta, materiál a další).
- Jsou uvedeny statistické metody vyhodnocování výsledků měření referenční populace, přičemž se dává přednost neparametrickým metodám hodnocení.

### Mezi referenčními intervaly poskytnutými výrobci a zjištěnými experimentálními studii jsou významné rozdíly

Významné diference mezi daty producentů a daty experimentálních studií byly zjištěny u hodnot základních analytů krevního séra/plazmy a proteinů rozsáhlými asijskými studii [4, 5]. Němečtí autoři

zjistili u některých analytů krevního séra dokonce signifikantní diference mezi laboratořemi mnohem menšího regionu, než je asijský kontinent [6]. Diference zjištěné na rozlehlém asijském území lze připsat regionálním populačním příčinám (etnikum, životní styl a podobně), německé diference pak zejména rozdílnému složení populací pacientů a také rozdílné úrovni analytických nejistot sledovaných laboratoří. Rozsáhlé studie italských a tureckých autorů [7, 8] konstatovaly u řady analytů výskyt podstatných rozdílů mezi hodnotami poskytnutými výrobcí a experimentálně zjištěnými, nikoliv podle koncepce IFCC, ale zpětným zpracováním archivních laboratorních dat, tedy metodami stanovení označovanými jako nepřímé (na rozdíl od „přímých“ metod, pracujících na základě koncepce IFCC s daty referenčních populací).

### Povinnosti producentů laboratorních diagnostik při poskytování referenčních intervalů

Výrobci jsou podle textu Směrnice IVD ES 98/79, přepsané do formy vládního nařízení – NV č. 453/2004 Sb. (odstavec 1. 7. 12) povinni poskytovat uživatelům (klinickým laboratořím) data týkající se hodnot referenčních intervalů a popisu příslušných referenčních populací [9]. Rozsah popisu referenční populace není v této Směrnici specifikován. V řadě případů jsou však hodnoty producenty poskytovaných referenčních intervalů označovány jako orientační a laboratoře jsou vyzývány k vytvoření vlastních referenčních intervalů bez uvedení, jak je mají získat. Obecná (personální a finanční) situace naprosté většině laboratoří takový postup nedovoluje [10, 11]. Laboratoře jsou tedy odkázané na data poskytnutá producenty. Ta by neměla být přijímána bez náležité kritičnosti, tedy bez validace. Příručka CLSI C28-A2 uvádí tři možnosti validace externě poskytnutých referenčních intervalů:

- (1) subjektivní vyhodnocení poskytnutých dat bez použití experimentálních postupů odpovědnými pracovníky laboratoří;
- (2) analýza dvaceti referenčních jedinců, z nichž výsledek aspoň 18 musí být uvnitř producentem udaných hodnot, v opačném případě se uvádí nezbytnost opakovat celý postup po prověření analytického postupu;
- (3) v případě potřeby použití soubor šedesáti referenčních jedinců.

V dalším textu našeho sdělení demonstrujeme příklad nejjednodušší možnosti. Nejprve porovnáme a okomentujeme číselné hodnoty referenčních intervalů několika základních analytů krevního séra tak, jak nám byly sděleny producenty. Potom se budeme stručně věnovat rozsahu poskytnutých dat o referenčních populacích devíti vybraných imunochemicky stanovených parametrů tak, jak jsou uváděny v pracovní dokumentaci dvou předních výrobců.

### Číselné hodnoty výsledků měření analytů krevního séra s metrologickou návazností

Na konci roku 2007 poskytli hlavní producenti laboratorních diagnostik na požádání data o referenčních intervalech. Šlo o producenty Abbott, Bayer-Siemens,

Beckman Coulter, Dade Behring Siemens, Olympus, Ortho-Diagnostics, Roche a o hodnoty platné pro dospělou populaci ve věku nad 18 let. V tabulce 1 uvádíme intervaly sdělených dolních a horních referenčních limitů. Hodnoty uvedených intervalů jsou příliš široké na to, že se jedná o analyty, jejichž výsledky jsou návazné na referenční materiály/metody. Neúměrná šíře hodnot je zřejmá z porovnání s hodnotami bias, odvozenými z celkových biologických variací (<http://www.westgard.com>), uvedenými v tabulce 1 v posledním sloupci.

**Table 1.** Intervals of lower and upper reference limits, reported by asked manufacturers

Analyte	Lower reference limit	Upper reference limit	Bias % (max)
Total protein	57–66 g/l	79–83 g/l	1.2
Cholesterol		5.2 mmol/l	4.0
Glucose	3.9–4.4 mmol/l	5.8–6.4 mmol/l	2.2
Albumin	32–35 g/l	48–52 g/l	1.3
Creatinine men	35–80 µmol/l	104–115 µmol/l	3.8
Creatinine women	44–58 µmol/l	80–97 µmol/l	
ALT men	0.17–0.5 µkat/l	0.75–1.2 µkat/l	12.0
ALT women	0.17–0.24 µkat/l	0.57–0.92 µkat/l	

Bias % (max) is stated as 0,25 . total biological variation.

Hodnoty kreatininu a ALT vykazují jasný pohlavní dimorfismus, takže by měly být poskytnuty zvlášť pro podskupiny mužů a žen. Ve skutečnosti dodrželo tuto podmínku jen 5 producentů ze sedmi u kreatininu a jen čtyři u ALT.

U cholesterolu bylo ve všech případech použito namísto referenčních intervalů hodnot diagnostických rozhodovacích limitů. Šlo ovšem o limity z doporučení platných v USA (5,2 mmol/l), ačkoliv v České republice je ve shodě s ostatními evropskými zeměmi doporučena hodnota 5,0 mmol/l [12]. U ALT jsou referenční intervaly, uvedené některými producenty příliš vysoké, blízké hodnotám skandinávské populace ze studie NORIP 2000 [13]. Jde o nevhodný výběr referenční populace, neodpovídající referenční populaci v českých zemích.

Prezentace referenčních hodnot sérového kreatininu by měla být přepracována v soulase s recentně definovanými doporučeními IFCC a nefrologickými doporučeními NKDEP – National Kidney Disease Education Program [14]. Referenční intervaly, které jsou schopny zajistit srovnatelnost výpočtu hodnot eGFR (odhadu glomerulární filtrace), byly publikovány v roce 2008 [15]. K jejich stanovení bylo použito zpětné analýzy 34 databází referenčních hodnot, uveřejněných za posledních 20 let, a pouze pět z nich bylo nakonec možno použít. Výsledkem jsou jednotné referenční intervaly pro dospělé muže (64–104 µmol/l) a ženy (49–90 µmol/l) bez závislosti na použitém druhu laboratorního diagnostika, tedy z analytického hlediska striktní aplikace návaznosti výsledků měření (na metodu ID-MS). Jen za této podmínky je možné zajistit náležitou mezilaboratorní

srovnatelnost hodnot eGFR právem požadovanou nefrology. Příklad sérového kreatininu a eGFR ukazuje důslednou aplikaci návaznosti výsledků měření jako základní podmínky tvorby obecně platných referenčních intervalů (viz v názvu citovaného sdělení výraz „global application“).

### Údaje o referenčních populacích u některých imunochemických metod nejsou vždy dostatečné

V pracovních návodech dvou špičkových producentů diagnostik byly vyhodnoceny údaje o referenčních populacích a jednotkách měření pro stanovení prolaktinu, intaktního PTH, homocysteinu, kyseliny listové, kortizolu (Siemens DPC Immulite 2000) a testosteronu, 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub>, PSA, cTnT (Roche Cobas Elecsys 2010).

### Demografické údaje o složení referenční populace

U PSA byly uvedeny hodnoty pro věkové dekády a geografický původ dvou referenčních populací – jedné z Nizozemí a severního Německa, druhé z USA. U testosteronu byly uvedeny hodnoty podskupin dospělých mužů a tří skupin chlapců podle věku bez uvedení geografických údajů. Jeden analyt neměl definovanou žádnou referenční populaci a referenční interval byl uveden jako konsenzus expertů (bez náležité literární citace). U prolaktinu byl jako referenční populace použit soubor žen bez dalších demografických a geografických údajů. U ostatních analytů byly poskytnuty počty referenčních probandů bez rozlišení počtu mužů, žen a bez specifikace jejich geografického původu. U dvou analytů byl celkový počet referenční populace menší než 120 jedinců.

### Jednotky měření

V tabulce 2 uvádíme jednotky měření použité v dokumentaci výrobců u sledovaných analytů. Pouze ve dvou případech z devíti sledovaných poskytují uváděné jednotky měření možnost udávat stejné číselné hodnoty v různých laboratořích bez použití přepočtových faktorů. Přitom každý přepočet z hodnot v jedné jednotkách na hodnoty v druhé může být velkým zdrojem rizika pro pacienty [16]. Zejména to platí pro případný přenos dat pacientů mezi různými laboratořemi, klinikami, ambulancemi. Myslíme si, že s tímto rizikem mají mnozí laboratorní a kliničtí pracovníci řadu nepříjemných osobních zkušeností. Pokud uznáváme nutnost snižovat riziko zdravotní péče na minimum, je zapotřebí zabývat se vážně i tímto problémem [16]. Ukázkou snadného řešení tohoto problému jsou programy externího hodnocení kvality, které používání předem určené společné jednotky měření vyžadují, a tak plní jednu ze svých předpokládaných a doporučovaných edukačních funkcí [17]. Jednotky měření, požadované pro hodnocení výsledků laboratoří v EHK, vycházejí důsledně z hierarchie metrologické návaznosti a bylo by optimální, kdyby producenti používali stejných jednotek ve své dokumentaci.

**Table 2.** Measurement units provided in producers working documentation

Analyte	Kind of introduced units			Number of different numerical results
Homocystein	μmol/l			1
iPTH	pg/l		pmol/l	2
Prolaktin	ng/ml		mU/l	2
PSA	ng/ml		μg/l	1
25 (OH)vitamin D <sub>3</sub>	mg/ml		mmol/l	2
Testosteron	nmol/l	mg/dl	mg/ml	3
Kortisol	μg/dl		nmol/l	2
Folium acid	ng/ml		nmol/l	2
cTnT	μg/l		pg/ml	2

### Vlastní hodnoty referenčních intervalů

Vytvoření vlastních hodnot je požadováno v pracovní dokumentaci producentů pro všech 9 analytů. Způsoby jejich získání nejsou uváděny. Tento požadavek je kontroverzní a nijak nepomáhá uživatelům při realizaci jejich postanalytické fáze. Spíše by měl být aplikován ve shodě s normami certifikace, akreditace a pojetím IFCC doporučení k tomu, jak uváděné referenční intervaly validovat a v případě potřeby modifikovat.

### Závěr

Poznatky, publikované řadou odborníků (a uvedené v literatuře tohoto sdělení), jsou příliš závažné, aby je bylo možno nebrat velmi vážně. Navzdory tomu, že bez diagnostik producentů si nelze analytickou činnost klinických laboratoří vůbec představit, je podložena kritičnost k jejich nedostatkům namísto. Referenční intervaly jsou nesmírně důležitým faktorem postanalytické fáze laboratorních procesů a snižování rizika zdravotní péče. Jejich stav není možné mít za uzavřenou a vyřešenou záležitost, ale je nutné je chápat jako jeden z podstatných objektů kontinuálního zlepšování kvality.

### Literatura

1. Solberg, H. E., Petitclerc, G., Stamm, D., Dybkaer, R. Approved recommendation (1986) on the theory of reference intervals. Part 1. *Clin. Chim. Acta*, 1987, 165, p. 111–118.
2. Dybkaer, R., Solberg, H. E. Approved recommendation (1987) on the theory of reference intervals. Part 6. *Clin. Chim. Acta*, 1987, 170, S33–S421.
3. C28-A2. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory. NCCLS 2000. Second edition.
4. Ichihara, K., Itoh, V., Miu, W. K., Yaap, S. F., Lam, G. W. K. et al. Diagnostic and epidemiological implications of regional differences in serum concentrations of proteins observed in six Asian cities. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 7, p. 801–816.
5. Ichiharahara, K., Itoh, V., Lam, G. H. K. et al. Sources of variation of commonly measured serum analytes in 6 asian cities

- and consideration of common reference intervals. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 356–365.
6. **Haecckel, R., Wosniok, W., Arzidel, F.** A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 47, p. 1033–1014.
  7. **Grossi, E., Colombo, R., Cavuto, S., Franzini, C.** The REALAB project. A new method for formulation of reference intervals based on current data. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 1232–1240.
  8. **Ilcol, Y. O., Arslan, D.** Use of total patients data for indirect estimation of reference intervals for 40 clinical chemical analytes in Turkey. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 867–876.
  9. *Directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices.* Official. J. Eur. Commun., 1998.
  10. **Henny, J.** Interpretation of laboratory results: the reference intervals. A necessary evil? (Editorial). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45, p. 939–941
  11. **Barth, J. H.** Who is responsible for reference intervals? *Ann. Clin. Biochem.*, 2004, 41, p. 429.
  12. **Vaverková, H., Novotný, D.** Co přinášejí nová doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií. *Interní Med.*, 2008, 10, (3, p. 117–120.
  13. **Rustad, P., Felding, P., Lahti, A.** Proposal for guidelines to establish common biological reference values in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 7, p. 783–791.
  14. **Levey, A. S., Coresh, J., Greene, T., Marsh, J., Stevens, L. A. et al.** Expressing the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 766–772.
  15. **Cerriotti, F., Boyd, J. C., Klein, G., Queraltó, J., Kairisto, V., Panthegini, M.** Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 559–566.
  16. **Boone, J. D.** How can we make laboratory testing safer? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45, 6, p. 708–711.
  17. **Sciacovelli, L., Sechchiero, S., Zardo, L. et al.** Risk management in laboratory medicine: quality assurance programs and professional competence. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45, 6, p. 756–765.

Adresa pro korespondenci:  
 RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.  
 ÚKBD LF UK a FN  
 Sokolská 581  
 500 05 Hradec Králové  
 e-mail: friedecky@sekk.cz