



Referenzintervalle Teil I: Die Kunst Referenzintervalle zu definieren

Die eigentliche Bedeutung von "Referenzintervallen" und ihre Aufgabe

Ein isoliertes Ergebnis ist für sich betrachtet nicht sehr aussagekräftig. Erst im Vergleich mit anderen Werten können Schlussfolgerungen gezogen werden. Ein Vergleich mit den früheren Ergebnissen desselben Patienten zeigt, ob der Wert stagniert, steigt oder fällt. Ein Vergleich mit Werten gesunder Personen erlaubt eine Einschätzung, ob der Wert im typischen Bereich für gesunde Personen liegt oder nicht. Ein Vergleich mit Entscheidungsgrenzen ermöglicht eine Beurteilung, ob weitere medizinische Maßnahmen indiziert sind.

Der für Gesunde typische Bereich wird als Referenzintervall bezeichnet. Er wird oft auch "Normalbereich" genannt. Aber was ist "normal"? Laboregebnisse können durch eine Reihe von Parametern beeinflusst werden, von Alter und Geschlecht bis hin zu Ernährungsgewohnheiten (mehr dazu weiter unten). Wenn man über das Referenzintervall spricht, ist es wichtig zu wissen, worauf es sich bezieht. Ist die Referenzpopulation tatsächlich vergleichbar? Nur wenn dies der Fall ist, ist ein Referenzintervall auf eine bestimmte Person anwendbar.

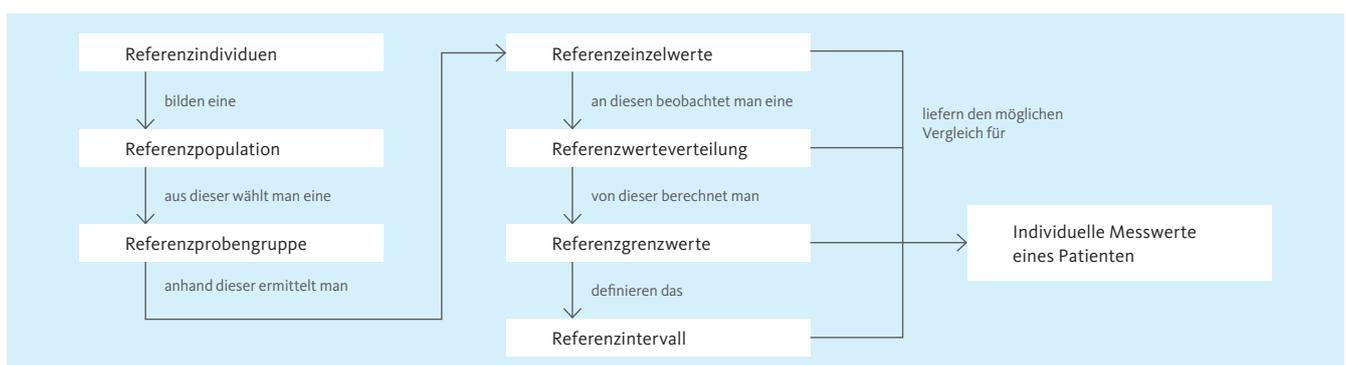


Abb. 1 Definitionen

Voraussetzungen für die Bestimmung von Referenzintervallen

Per Definition besteht die Referenzpopulation aus allen Referenzindividuen. Im besonderen Falle kann dies ausschließlich die Patientin/der Patient selbst mit seinen Vorwerten sein. Oftmals handelt es sich jedoch um große Populationen, bei denen das repräsentative Probenkontingent leicht zum Hindernis werden kann. Es können viele Kriterien (Alter, Geschlecht, Ethnie, Gesundheitszustand ...) herangezogen werden, um eine Referenzpopulation weiter zu definieren. Wenn bekannt ist, dass Messwerte z. B. in Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht unterschiedlich sind, werden Untergruppen aus Referenzindividuen erforderlich; auch können z. B. Patientengruppen, die an einem bestimmten Krankheitsbild leiden, als sinnvolle Referenzpopulation für einzelne Patientinnen und Patienten mit dieser Krankheit dienen. Diese speziellen Referenzwerte sind z. B. hilfreich bei der Remission einer akuten Leukämie, nach einer Knochenmarktransplantation oder während einer Schwangerschaft. Die am häufigsten verwendeten Referenzwerte stammen erwartungsgemäß aus einer gesunden Population. Hierbei stellt sich jedoch die Schwierigkeit, "gesund" zu definieren. Es gibt keine klaren Kriterien, "kranke" Personen aus einer Referenzpopulation zu eliminieren. Gern wird auf vermeintlich "gesunde" Referenzgruppen wie Blutspendende, junge Ärztinnen und Ärzte, Krankenschwestern und Pfleger, MTLs, MTRs und Medizinstudentinnen und Studenten zurückgegriffen. Für solche leicht zugänglichen Referenzgruppen hat sich jedoch gezeigt, dass deren Ergebnisse von der Gesamtpopulation signifikant verschieden und damit nicht repräsentativ sind. Eine klare Beschreibung der Prozedur für die Bestimmung der Referenzpopulation ist nötig, damit die Referenzwerte brauchbar sind:

1. Die Messungen eines Erkrankten müssen mit den für ihn geltenden Referenzintervallen verglichen werden. Dieselben Referenzintervalle können nicht für unterschiedliche Zwecke verwendet werden (z. B. physiologische Studien bei Sportlerinnen und Sportlern oder Überwachung der Behandlung eines bestimmten Krankheitszustands), daher muss die Beschreibung den Zweck der Referenzintervalle enthalten.
2. Außerdem sind die Kriterien zu erläutern, nach denen Individuen in die Referenzpopulation aufgenommen oder aus ihr ausgeschlossen werden. Wenn die Population in Untergruppen unterteilt werden muss (z. B. nach Alter oder Geschlecht), müssen diese Merkmale für jede Referenzperson bekannt sein.
3. Die Referenzindividuen sollten immer so vergleichbar wie möglich mit dem Erkrankten sein, für den die Referenzintervalle verwendet werden sollen.

Die wichtigsten Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie die Referenzintervalle beeinflussen, und die möglicherweise berücksichtigt werden müssen, sind:

- Geschlecht, Alter, ethnische Zugehörigkeit, sozialer Status und Beruf, Umweltbedingungen
- Ernährungszustand
- Die Umstände der Probenentnahme

Zu den Faktoren, die zu unterschiedlichen Referenzintervallen in der Hämatologie führen können, gehören:

- Präanalytische Logistik, Alter der Probe
 - Transport
 - Exposition gegenüber Hitze
- Unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten
 - Eisenstatus
 - Dehydrierung
- Unterschiedliche körperliche Aktivität
- Starke Unterschiede in der Höhe über dem Meeresspiegel
- Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien aufgrund von Arbeit, Umweltverschmutzung, Rauchen usw.
- Andere

Abb. 2 Faktoren, die Referenzintervalle in der Hämatologie beeinflussen können.

Verfahren zur Bestimmung der anwendbaren Referenzintervalle

Angesichts dieser Vielzahl von Faktoren kann sich die Frage stellen, wie für bestimmte Erkrankte anwendbare Referenzintervalle sicher gestellt werden können. Die einfachste und von der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) [3, 8] empfohlene Methode ist eine unabhängige Erhebung der Referenzintervalle durch das Labor. Dazu werden geeignete Referenzgruppen (z. B. eine Gruppe von Männern und eine Gruppe von Frauen) aus einer geeigneten Referenzpopulation ausgewählt. Jede untersuchte Gruppe sollte nach Ausschluss von Probanden, die die Einschlusskriterien nicht erfüllen, mindestens 120 Probanden umfassen.

Um Proben von Personen auszuschließen, die für die Referenzgruppe nicht geeignet sind – z. B., weil sie Medikamente einnehmen, die die zu untersuchenden Messergebnisse beeinflussen, oder weil sie eine ungewöhnliche Diät einhalten –, ist ein entsprechender Fragebogen nützlich, wie er in der Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI/IFCC Empfehlung C28-A3, Seite 10–11, zu finden ist. Das Referenzintervall wird dann als der Bereich definiert, in dem sich 95% der von den Probanden ermittelten Ergebnisse befinden.

Wenn ein Parameter sowohl pathologisch erhöhte als auch erniedrigte Werte aufweisen kann, wie dies bei den meisten hämatologischen Parametern der Fall ist [6–8], werden sowohl die oberen 2,5% als auch die unteren 2,5% der Werte verworfen und der verbleibende Bereich wird als Referenzintervall verwendet. Wenn das Messergebnis nur pathologisch erhöht sein kann, aber keine zu niedrigen Werte annehmen kann, werden die oberen 5% der Werte verworfen, um das Referenzintervall zu erhalten. Es gibt auch eine Methode zur Berechnung auf der Grundlage von nur 80 Probanden, die jedoch mathematisch komplexer ist (siehe Abb. 4). Werden verschiedene Untergruppen betrachtet, z. B. Männer und Frauen, können die erhaltenen Werte daraufhin untersucht werden, ob ein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Wenn dies nicht der Fall ist, können die Werte zu gemeinsamen Referenzintervallen zusammengefasst werden.

Allerdings werden sowohl 80 als auch 120 Probanden oft als nicht vertretbarer Arbeitsaufwand erachtet, insbesondere wenn mehrere Untergruppen betrachtet werden, für die dann jeweils 80 oder 120 Probanden erforderlich sind.

Die oben beschriebene Methode zur Bestimmung von Referenzintervallen wird als "nicht-parametrische Methode" bezeichnet. Es werden auch parametrische Methoden verwendet. Diese bestimmen ein Referenzintervall durch eine Berechnung des Mittelwertes \pm doppelte Standardabweichung. Diese Methoden setzen jedoch voraus, dass der untersuchte Parameter einer Normal- oder Gaußverteilung folgt, was bei vielen Parametern nicht der Fall ist. In einigen wenigen Fällen kann eine Logarithmentransformation, d. h. eine Transformation der Werte in ihren Logarithmus, einen nicht normalverteilten Parameter in eine Normalverteilung umwandeln. Dies erhöht jedoch, zusammen mit der Rücktransformation, den mathematischen Aufwand. Der theoretische Vorteil dieser Methoden ist, dass sie mit weniger Probanden arbeiten. Die Tatsache, dass sie für viele Parameter nicht anwendbar sind und die zusätzliche Notwendigkeit, auf eine Normalverteilung zu untersuchen, erhöht den mathematischen Aufwand jedoch erheblich.

Abb. 3 Parametrische versus nicht-parametrische Methoden zur Berechnung von Referenzintervallen.

Prüfung der Eignung von anderweitig ermittelten Referenzintervallen

Da die einfache Übernahme eines anderweitig publizierten Referenzintervalls aus den oben genannten Gründen nicht zulässig ist und für den Erkrankten sogar gefährlich sein kann, muss dessen Eignung als Referenz in jedem Fall geprüft werden. Dazu schlägt die IFCC folgendes Verfahren vor [9]:

Es werden 20 lokale Referenzproben entnommen und mit dem anderweitig publizierten Referenzintervall verglichen. Wenn nicht mehr als zwei der 20 Proben außerhalb dieses Intervalls liegen, kann es verwendet werden. Wenn 3–4 Proben außerhalb des Referenzintervalls liegen, müssen weitere 20 neue Proben entnommen werden. Wenn nicht mehr als zwei dieser 20 Proben außerhalb des Intervalls liegen, kann es verwendet werden. Wenn bei der ersten Überprüfung fünf oder mehr Proben oder mehr als zwei einer wiederholten Reihe von Proben außerhalb des veröffentlichten Referenzintervalls liegen, ist es nicht geeignet, als Referenz für lokale Patienten verwendet zu werden. Als Alternative bleiben dann die Neuerhebung (siehe oben) oder die Validierung eines anderen Referenzintervalls.

Die unterschiedlichen Bedeutungen von Referenzintervallen und Entscheidungsgrenzen

Liegt ein Patientenwert außerhalb des Referenzintervalls, so deckt er sich zwar nicht mit der Mehrheit der Referenzpopulation – aber daraus resultiert nicht notwendigerweise, dass medizinische Schritte angezeigt sind. Zum einen liegen ja ohnehin 5% der Referenzpopulation außerhalb des Referenzintervalls – die Patientin/der Patient könnte somit zu diesem Anteil gehören (5% = 1 Patient von 20!).

Zum anderen ist bei vielen Krankheiten bei einer milden Form gar kein Einschreiten notwendig. Stattdessen vergleicht man hier mit Entscheidungsgrenzen, sogenannten "Cut-off-Werten". Diese können z. B. durch Analyse einer Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve festgelegt werden. Auch in vielen anderen Bereichen ist nicht entscheidend, ab wann ein Wert nicht mehr als "normal" betrachtet werden kann, sondern ab wann eine Diagnose sicher gestellt werden kann. Bei chronischen Krankheiten können Entscheidungsgrenzen auch z. B. nach therapeutisch-medizinischen Gesichtspunkten festgelegt werden. Hierbei ist dann entscheidend, in welchem Bereich man die Situation der Patienten als stabil ansieht und wann eine Änderung der Therapie indiziert ist.

Grundsätzlich können hier auch – wie oben beschrieben – analog Methoden für die Ermittlung eines Referenzintervalls auf eine Referenzgruppe stabiler Patienten angewendet werden. Vielfach beruhen aber solche Entscheidungsgrenzen auch schlicht auf medizinischer Erfahrung und Konsensfindung des entsprechenden Fachgebietes.

Ein indirekter Ansatz zur Bestimmung von Referenzintervallen

Ein neuartiger Ansatz zur Bestimmung von Referenzintervallen wurde kürzlich in einem Positionspapier des IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL) veröffentlicht [9]. Dieser "indirekte" Ansatz zur Bestimmung von Referenzintervallen bezieht sich auf eine statistische Analyse bereits vorhandener

Ergebnisse von Proben, die für Routinezwecke entnommen wurden (z. B. Proben, die für Screening-, Diagnose- oder Überwachungszwecke gesammelt wurden). Dieser Ansatz ist nicht nur eine nützliche Ergänzung zu den herkömmlichen direkten Methoden, sondern bietet auch eine Reihe von Vorteilen, wie z. B. die Tatsache, dass die Ergebnisse auf den verwendeten analytischen und präanalytischen Verfahren beruhen, die Möglichkeit, ein breites Spektrum von Populationen, insbesondere die vom Labor bediente Population, zu berücksichtigen, und, was besonders wichtig ist, die relative Einfachheit der Anwendung und die weitaus geringeren Kosten. In diesem Positionspapier ermutigt das IFCC C-RIDL die Laboratorien, "indirekte Methoden zu verwenden, um ihre verwendeten Referenzintervalle zu bewerten, neue Referenzintervalle zu schätzen und ihre Ergebnisse in angemessener Ausführlichkeit zu veröffentlichen und weiterzugeben sowie die Suche nach neuen und verbesserten Techniken für diesen Prozess fortzusetzen".

Referenzintervalle der XN-Serie aus der niederländischen Lifelines-Kohorte

In einer multidisziplinären prospektiven bevölkerungsbasierten Studie von L van Pelt *et al.* (2022) der niederländischen Lifelines-Kohorte wurden alle 105 Parameter für XN-Analysesysteme ausgewertet [10]. Die Referenzintervalle wurden in Übereinstimmung mit den von der IFCC empfohlenen statistischen Methoden berechnet.

Die Methoden und Referenzintervalle dieser Studie sind in dem Themenblatt-Artikel "Die Kunst, Referenzintervalle zu definieren" beschrieben.

Sysmex-Referenzintervalle

Auch wenn Sysmex als Hersteller für seine Hämatologie-Analysesysteme Referenzintervalle als Richtwert angeben muss und dies in verschiedenen Publikationen tut, können diese nicht ohne weiteres aus den oben erläuterten Gründen auf Patientinnen und Patienten angewendet werden. Sysmex stellt eine Liste von wissenschaftlichen Publikationen zur Verfügung, die Auskunft über die Referenzintervalle von Sysmex-Analysesystemen geben (siehe Tab. 1). Die Veröffentlichungen zeigen, dass sich die Referenzintervalle je nach den untersuchten Populationen ändern.

Veröffentlichte Referenzintervalle älterer Generationen von Analysesystemen können auf Analysesystemen neuerer Generationen verwendet werden, allerdings erst nach einer Validierung. Da es Unterschiede zwischen den hämatologischen Referenzintervallen verschiedener Populationen gibt, können die Informationen in der Tabelle die Auswahl eines geeigneten Referenzintervalls als Ausgangspunkt für die Validierung erleichtern.

Tabelle 1 Publierte Referenzintervalle, ermittelt mit Sysmex-Analysesystemen für die Hämatologie

Autor	Referenz	Analyser	Parameter	Population
L van Pelt <i>et al.</i> [10]	Clin Chem Lab Med	XN-Serie	CBC+DIFF+RET+PLT-F	Niederländisch
Mrosewski I <i>et al.</i> [11]	Clin Chem Lab Med	XN-9000	CBC	Deutsch, pädiatrisch
Florin L <i>et al.</i> [12]	Int J Lab Hematol	XN-Serie	CBC+DIFF+RET	Belgisch, erwachsen
Wilson S <i>et al.</i> [13]	Int J Lab Hematol	XN-3000	CBC+DIFF	Kanadisch, pädiatrisch
Bohn MK <i>et al.</i> [14]	Int J Lab Hematol	XN-3000	CBC+DIFF	Kanadisch, pädiatrisch
Ianni B <i>et al.</i> [15]	Arch Pathol Lab Med	XN-1000	CBC+DIFF+RET+PLT-F	US-Amerikanisch, Neugeborene
Arbiol-Roca A <i>et al.</i> [16]	EJIFCC	XN-Serie	CBC+DIFF+RET	Spanisch
Sysmex Corporation [17]		XN-Serie	CBC + DIFF + RET	Japanisch
Dockree S <i>et al.</i> [18]	EBioMedicine	XN-Serie	WBC+DIFF	Britisch, schwangere Frauen (prä- und postnatal)

Literatur

- [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.