

Referans Kavramı, Ulusal Referans Politikası ve Hasta Verilerinin Kullanımı

[Determination of Reference Interval]

Yahya Laleli

Y.Enli ve Arkadaşlarının “Denizli’de Yaşayan 18-40 Yaş Arası Bireylerde Farklı Yöntemlerle Referans Aralıkların Saptanması” makalesi Üzerine Düşünceler.

Referans aralığı tanımı; “Klinik Tanı Laboratuvarları”nın, mukayeseye dayanan testleri için, sağlıklı toplumdan elde edilen “Sağlıklı olmakla ilişkili” değer aralığının, gerekli en az düzeydeki şartları sağlayacak tarzda güvenli ve kullanışlı olacak şekilde belirlenmesi olarak yapılabilir. Referans aralığı yalnızca sağlıklı bireyleri belirlemek için değil, belirli fizyolojik ve patofizyolojik durumları temsil etmek üzere de yapılabilir. Preanalitik şartların değişkenliği, kullanılan metot ve ürünlerin çeşitliliği, laboratuvar uzmanlarının eğitim ve uygulama farklılıkları, tatbikatta laboratuvarlar arası farklılıkların oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle Sn. Enli ve arkadaşlarının laboratuvar testlerinin standardizasyonu için ulusal referans aralık saptama politikasının belirlenmesi talebi, üzerinde çalışılması gereken bir konudur. Sn. Doç. Dr. S. Koçtürk’ün 13-15 Şubat 2004 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi’nde yapılan “Klinik laboratuvarlarda standardizasyon ve kalite güvencesi eğitimi” toplantısında bulunduğu *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* ve *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)*’nin referans aralığı belirleme dökümanlarını esas alarak hazırladığı ve sunduğu güzel prezentasyon hazır veri kaynağı olarak web sitemizde sunulacaktır (1, 2).

Bu ve bundan sonra referans aralığı belirlemesiyle ilgili yayınlanacak makaleler Sn.Koçtürk’ün uygulama özeti ve bu editoryal çerçevesinde daha iyi değerlendirileceklerdir. Değişen teknoloji ve klinik ihtiyaçlar nedeniyle uygulama ve değerlendirmede değişiklikler olabilirse de her laboratuvarın kendi normal referans aralığını belirlemesine veya en azından kullandığı kitin tavsiye ettiği referans aralığının geçerliliğini teyit etmesine ihtiyaç vardır. NCCLS ve IFCC dökümanlarına ilave olarak International Council for Standardization in Hematology (ICSH)’nin dökümanlarının farklı gaye ve faydaları olsa da, müşterek tarafı aşağıda belirtilen gereksinimlere cevap vermesidir.

Referans değer belirlenmesinin gereklilikleri:

- Yeni bir analitik ölçümün yapılmaya başlanması,
- Daha önce referans veya fizyolojik değerleri bilinen bir analitin farklı veya yeni bir metotla ölçülmemeye başlanması,
- Referans değeri başka laboratuvarlarca (üretici de olabilir) belirlenmiş bir analitin aynı veya mukayese edilebilir başka metotlarla ölçülmesi durumunda mevcut verinin transferi.

Y.Enli ve arkadaşları makalelerinde NCCLS’nin tanımına göre seçtikleri preanalitik riskleri olmayan referans toplumundan, sağlıklı referans aralıklarını parametrik ve non-parametrik yöntemlerle belirlemişler, elde ettikleri bu neticelerin birbirinden farklı olmayıp ayrıca literatürle uyumlu olduğunu teyit etmişler ve referans aralığı hesaplanmasında non-parametrik yöntemi kullanmayı tercih ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada benim için en önemli husus, sağlıklı şahısların veri dağılımının, hastadan elde edilen ve hastalığa bağlı verileri yansıtan dağılımdan matematiksel ve istatistiksel olarak ayrılabilmesinin kabulüyle, laboratuvara başvuran hastaların verilerinin referans aralığı

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Düzen Laboratuvarı, Atatürk Bulvarı No: 237/39,
Kavaklıdere, 06680, Ankara, Türkiye
E-mail: laleli@duzen.com.tr

belirlemede kullanılmış olmasıdır. Yazarlar, laboratuvara başvuran hastaların verilerini kullanarak elde ettikleri referans aralıklarının genelde fikir sağlaması yanında, laboratuvar performansının değerlendirilmesi yönünden yararlı olacağını belirtmektedirler. Bu "indirekt" uygulamada yazarlar, SPSS programının "explore" ve belki de "confidence interval" basamağını kullanarak, hasta toplumunun aşırı uç değerlerini, hiç aşırı uç kalmayınca kadar atıp, elde edilen toplumun verisini parametrik veya non-parametrik yöntemlerle incelediklerini belirtmektedirler. Ferrer-Masferrer ve arkadaşları da hasta verilerinin. *skewness* ve *kurtosis*'e bağlı aşırı karışık, geniş dağılım göstermediği taktirde, belirli kısıtlamalarla referans aralığı belirlemede kullanılabileceğini göstermişlerdir (3). Biz de rutin pratiğimizde, normal şahıslardan veri elde edemediğimiz durumlarda, peşinen kullandığımız üretici veya metod referans aralıklarını teyit etmek için birikmiş verilerimizi kullandık ve bu uygulamamızı 2000 yılında yapılan "Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Toplantısı"nda sunduk (4). Sn.Koçtürk de notlarında, klinik anlamı olan alt grupların ortalamalar arası ve grup içi varyasyon farklılığına dayanarak ayrılabilceğini belirtmektedir. Bu da, hastane popülasyonuna bağımlı olmakla beraber, laboratuvar verileri kullanılarak referans aralığının indirekt yöntemle nasıl belirlenebileceğini göstermektedir.

Peki yazarlar veya benzer çalışmalar yapanlar, kendi buldukları referans aralıklarıyla literatür ve prospektüslerin verdiği referans aralıklarının örtüştüğünü göstermekle ne elde ediyorlar? Biz de prospektüs veya metod benzerliği gösteren literatür referanslarını kullanamaz mıyız? Belki dünyada birçok laboratuvar pratikte bunu yapmaktadır! Fakat bu düşünce doğru değildir. Prospektüslerde yer alan referans aralıklarını kullanabilmek için dahi, sizin referans toplum değerlerini veya birikmiş verilerinizi kullanarak belirlediğiniz referans aralığı değerlerinizin, prospektüs değerleriyle örtüştüğünü teyit etmeniz veya aralarındaki korelasyonu göstermeniz gereklidir. Pratikte bu ihtiyaca bağlı olarak da birçok laboratuvar, biriken klinik korelasyon tecrübesine dayalı olarak uç değerlerde ufak oynamalar yapar. Bu pratik uygulamanın bir disiplin içinde veriye dayanması için uygulamanın sağlıklı referans toplumuna, bu imkanı olmayan laboratuvarlarda ise yeteri kadar birikmiş kendi verilerine (indirekt yöntem) dayandırılması lazımdır. Sağlıklı toplumda referans aralığı belirleme çalışmasını yapacak potansiyeli olmayan laboratuvarlar da, YETERİ KADAR BİRİKMİŞ kendi verileri ile indirek referans aralığı belirleme yöntemini kullanabilirler. Bununla beraber, referans aralığı belirlenirken hasta verileri kullanıldığında, bu verilerin dağılımının belirli istatistiksel kriterlere uyması, çok geniş ve karışık bir dağılım göstermemesi, iyi laboratuvar uygulamaları çerçevesinde olsa dahi örnekleme ve uygulamada herhangi bir farklılığın olmadığı belirli bir dönemi kapsamaması ve hasta grubunu temsil eden veriler istatistiksel ve matematiksel olarak atıldıktan sonra kalan ve normal toplumu temsil ettiği kabul edilen bu grubun hakim grubu olduğunun gösterilmesi gerekmektedir.

İyi laboratuvar pratiği kullanan her laboratuvar, herhangi bir teste ait elde edilmiş tüm verileri kullanarak indirekt ve non-parametrik yöntemle kendi referans aralığını belirleyebilir veya daha önce belirlenmiş değerlerle uyumunun mevcudiyetini gösterebilir. Bu işlemi yapmakla, elde edilen

neticeye göre, laboratuvarın neler kazanabileceğini aşağıda özetlemek istiyorum:

1. Elde ettiğiniz veriler, literatür ve prospektüsteki referans aralık verileri ile uyum gösterdiği zaman; sizin laboratuvarınızın, dışarıdaki laboratuvarlarla paralel netice verdiğini, doğru çalıştığınızı ve sizin toplumunuzun referans aralığının, diğer toplumların referans aralıklarıyla biyolojik farklılık dışında benzer olduğunu söyleyebilirsiniz.
2. İyi laboratuvar pratiği uygulamanıza ve enternasyonal kalibratörler veya değeri bilinen kontrol örneklerinden beklenen neticeleri almanıza rağmen, örtüşen neticeler elde edememişseniz, o zaman toplumunuzun referans aralığının farklı olduğunu söyleme şansınız ve bu farklı neticeyi yoruma taşıma imkanınız doğar.
3. Referans aralığı çalışmasıyla bir laboratuvarın sağlayacağı en önemli veri, referans hududunun güvensizliği hakkında başka hiçbir yerden elde edemeyeceği kendi sistemine özgü belirsizlik bilgisini elde etmesidir. Örnek:Troponin T referans aralığının üst limiti 0,8 ng/mL ve elinizde hastanıza ait tek netice var: 0,75 ng/mL. Hastanızın iskemik kalp hastalığı olup olmadığını söyleyeceksiniz, hangi katiyette? Eğer etkilenmemiş toplumun %95'ini temsil eden referans aralığında, üst hudut değerinin kararsızlığının da %5 olduğunu biliyorsanız, hastanızın 0,75 ng/mL değerinin iskemisi olmayan toplumun %95'inin içinde olduğunu ve büyük bir ihtimalle hastanın iskemisinin olmadığını söyleyebilirsiniz. Ama kararsızlığınız hudut değerin %10'u ise o zaman bu değerin iskemisi olmayan grubun dışında kalma şansının da mevcut olduğunu, yani bu değerin size iskemiyi reddetme şansı vermediğini söyleyip tercihen bir örnek daha istediğinizi söylemeniz doğru olacaktır. Bu referans aralığı belirsizliği kavramı, sizin elinizdeki testi iyi tanımanızı, dolayısıyla elde ettiğiniz değeri doğru yorumlamanızı sağlayacaktır.
4. Genelde normal toplumu temsil eden neticelerin dağılımı simetrik bir dağılım olmayıp, pozitif *skewness* gösterir. Histogram veya ortalama (mean) ve ağırlıklı değer (median) farkından böyle bir dağılımla karşı karşıya olduğunuzu gördüğünüzde, toplumunuzun önemli bir kısmının ortalamanın altında olduğunu biliyorsunuz demektir. Mesela 20-50 yaş arası kadınlarda ALT için referans aralığı 5-65 U/L değerleri arasında olsa da, dağılımda vakaların 2/3'den fazlasının, median değer olan 20-24 U/L aralığının altında kaldığını görürüz. Dolayısıyla referans aralığı içinde bile ortalama veya üstündeki değerlerin toplumu temsil etme oranlarının düşük olduğunu ve ileriye doğru farklı bir risk grubunda olduğunu söyleme imkanını kazanmış oluruz. Örnek olarak Lp(a) çalışmasını incelemenizi öneririm (5).
5. Her ne kadar bu çalışmaların kapsamında belirlenen referans aralıkları şahıslardaki zamana bağlı değişiklikleri ve biyolojik varyasyonu göstermekten uzaksa da, referans aralığının kararsızlığı bizi bu kavramları da düşünmeye itecektir. Acaba biyolojik değişikliklerin etkisi, hudut değerlerin güvensizliğinden daha dar mı? Böyle bir durumda daha yüksek tekrarlanabilirliği olan testleri seçmemiz gerekecektir. Referans aralığı ve güvensizliği bize irdelediğimiz testin gayemize uygun olup olmadığı hakkında da bilgi verecektir.

NCCLS ve IFCC'nin referans aralığı belirleme prosedürlerine hepimiz kolayca ulaşabiliriz. Bu bilgiler özetlenmiş halde Sn.Koçtürk'ün sunumunda mevcuttur. Buna rağmen bu prosedürlerde belirlenmiş bize göre önemli bazı ön koşullar ve uygulama etaplarından da burada bahsetmek istiyorum:

- A. Kullandığımız metotlar referans metotlarla paralel netice vermeli, kalibrasyon standartları referans materyaline karşı kalibre edilmiş olmalı ve mutlak değeri belirli olan serum bazı kontrol materyaliyle elde edilen neticeler, o kalibratör için belirlenen değer hudutları içinde olmalıdır.
- B. Belirli aralıklarla tekrarlanan ve standart eğrisinin karakterine göre en az iki seviyeden oluşan dahili standardımızın mükerrer çalışılmasıyla elde edilen neticelerin standart deviasyonu, o test için beklenen laboratuvarlararası farklılığın 1/3'ünden az ise, deneyimizin belirlenen farklılık içinde stabil olduğunu söylemek mümkündür.
- C. Deneyimizin stabil ve internasyonal standartlara paralel netice verdiği yukarıdaki şekilde belirlendikten sonra, elde ettiğimiz neticelerin diğer laboratuvarlarla uyum içinde olduğu, dış kaynaklı kalite güvencesi örneklerinden elde ettiğimiz neticelerin, diğer iştirakçilerin elde ettiği ve belirli kriterlere göre kabul edilmiş değerler içinde olduğunun kanıtlanmasıyla mümkün olacaktır.

Buraya kadar iyi laboratuvar uygulaması kriterlerini gördük. Bu uygulamayla laboratuvara başvuran bireylerden veya preanalitik riskleri olmayan normal ve referans toplumdan elde edilen veriler non-parametrik uç değerler atıldıktan sonra (NCCLS ve Ferre-Masferrer), dağılım incelendiğinde laboratuvarımızın o test için referans aralığını elde etmiş ve bu sayede de neticelerimizi etkin bir şekilde değerlendirip başka merkezlerden gelen değerlerle mukayese etme şansını elde etmiş oluruz. **Bu da testlerin her merkezde "bir de biz yapalım da görelim" diye tekrarını önleyecek, maddi tasarruf sağlayacak, hastaya zaman kazandıracak ve sağlık sistemi hakkında güven verecektir. Bu nedenle de ulusal referans aralığı saptama politikasının yerleştirilmesini desteklemek için referans aralığı belirleme yayınlarına dergimizde öncelikli olarak yer vereceğimizi ve yazılarımızı beklediğimizi belirtmek isteriz.**

Determination of Reference Interval

A measured or observed laboratory test result of a person (usually a patient) is compared with a reference interval for the purpose of making a medical diagnosis, therapeutic management decision, or other physiological assessment.

Kaynaklar/References

1. C28-A How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. NCCLS , Vol.17. No:18.
2. Solberg HE. Document with a proposal for an IFCC recommendation. The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. J Clin Chem Clin Biochem 1983; 21:749-760.

For this decision making process; reference values are needed for all tests in the clinical laboratory and the provision of reliable reference intervals is an important task for clinical laboratories. Therefore the definition of reference intervals could be expressed as determination of the reference values derived from a reference sample group of persons who are in good health, which meet the minimum requirements for reliability and usefulness. However, other types of reference values for other physiological and pathological conditions could also be established in a similar manner. The changes in preanalytical considerations, lack of uniformity in data collection and in the methodology currently used for establishing reference intervals by clinical laboratory specialists and the reflection of the different educational and applicational experiences of the specialists on the evaluation, creates regional differences in application. Therefore, the proposal presented within the content of this article about forming regional reference interval subcommittees is an important issue, which shall be studied upon.

It might be an effective start to establish a standardization and reference interval committee within the structure of our association. Before translating the related documents of NCCLS and IFCC and transferring them to the branches to start the activities in their region; review of the presentation given by Dr. S. Koçtürk at the "Clinical Laboratory Standardization and Quality Assurance Training" course held between 13 – 15 February 2004 at Hacettepe University; which can also be viewed at our association's web site (www.biyokimya.org); could be very useful.

Although the documents mentioned above and ICSH (International Council for Standardization in Haematology) have additional different uses and purposes; in order to fulfill the needs and requirements mentioned below each laboratory has to determine its own reference interval. There might be new variations in application and evaluation due to the changes in technology and clinical needs.

The various needs and requirements of reference value studies for different situations are as follows:

- *Measurement of a new analyte.*
- *Measurement by a new or different analytical method of a previously known and measured analyte for which physiological data and other reference values may be available.*
- *Measurement of the same analyte by the same or comparable analytical method for which reference value studies from another laboratory or the manufacturer are available (transference).*

3. Masferrer MF, Arderiu XF, Ane RP. Indirect reference limits estimated from patients results by three mathematical procedures. Clinica Chimica Acta. 1999;279, 97-105.
4. Laleli Y, Akbay A. Referans aralık analizi. Tıbbi laboratuvarlarda standardizasyon ve kalite yönetimi (Derleyenler: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ.), 2000;124-137, Mars Matbaacılık, Ankara.
5. Abraham A. Ariyo et al. Lp(a) lipoprotein, vascular disease and mortality in the elderly. N Engl J Med 2003;349:2108-15