Лабораторная служба
2019, Т. 8, № 2, с. 36–44
https://doi.org/10.17116/labs2019802136

Laboratory Service=Laboratornaya sluzhba
2019, vol. 8, no2, pp. 36–44
https://doi.org/10.17116/labs2019802136

Современные теория и практика референтных интервалов

© С.А. ЕВГИНА[1], Л.И. САВЕЛЬЕВ[2]

[1]Ассоциация «Федерация лабораторной медицины», Москва, Россия;
[2]ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург, Россия

РЕЗЮМЕ

Референтный интервал (РИ) — статистический показатель, двумя пределами ограничивающий центральный 95% диапазон референтных значений. Отражает межиндивидуальную вариацию в популяции, обладает ограничениями в интерпретации результатов для аналитов с низким уровнем индивидуальности. Приведено сравнение РИ с пороговыми значениями. Описан протокол по установлению РИ прямым методом, обсуждены проблемы определения критериев включения/исключения. Приведены условия применения различных статистических методов для расчета пределов РИ и их доверительных интервалов. Отдельно рассмотрена проблема выделения подгрупп при расчетах РИ. Дана краткая характеристика непрямому методу определения РИ. Это бурно развивающийся подход расчета РИ на основе госпитальных баз данных с использованием фильтров для отбора условно здоровых индивидуумов с последующей специальной математической обработкой.

В обзоре представлена схема переноса РИ в случае разных аналитических систем. Подробно описана процедура верификации РИ, имеющихся в научной литературе или документации производителя, для принятия решения об их возможном применении в лаборатории с идентичной аналитической системой. Приведены специальные подходы к верификации РИ с использованием сравнения медиан данных и частоты результатов, выходящих за пределы РИ.

Ключевые слова: *референтный интервал, пороговые значения, статистические методы, непрямой метод, перенос, верификация.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Евгина С.А. — https://orcid.org/0000-0002-4945-7269
Савельев Л.И. — https://orcid.org/0000-0002-5180-6560

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов. *Лабораторная служба*. 2019;8(2):36-44. https://doi.org/10.17116/labs2019802136

Current theory and practice of reference interval

© S.A. EVGINA[1], L.I. SAVELIEV[2]

[1]Association «Federation of Laboratory Medicine», Moscow, Russia;
[2]Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

RESUME

Reference interval (RI) is a central 95% range of reference values (RV) set by 2 limits. Being a statistical parameter RI reflects between-individual variation in population. It has limitations in test result interpretation for analytes with low individuality index. Comparison RI with decision limits is presented in the review. Authors described the protocol for establishment of RI by direct methods including discussion of inclusion/exclusion criteria. The review contains requirements and limitations of different statistical methods applications to calculate RI and their confidence intervals. Several methods recommended to partition RI are considered. Upcoming indirect approach in establishing RI (data mining) is presented. It based on the statistical handing of data from hospital information systems to select RV from healthy individuals.

The procedure to transfer RI in case of different analytical system is described. Authors also presented scheme of RI verification by the lab with identical analytical systems but serving the population different from the original RI study published. Alternative methods of verification used comparison of RV midpoint and flag rates are considered.

Keywords*: reference interval, decision limit, statistical methods, transfer, verification, data mining.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Evgina S.A. — https://orcid.org/0000-0002-4945-7269
Saveliev L.I. — https://orcid.org/0000-0002-5180-6560

TO CITE THIS ARTICLE:
Evgina SA, Saveliev LI. Current theory and practice of reference interval. *Laboratory Service = Laboratornaya sluzhba*. 2019;8(2):36-44. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/labs2019802136

Автор, ответственный за переписку: Евгина Светлана Александровна — e-mail: s.evgina@fedlab.ru; тел.: +7(910)422-0078; https://orcid.org/0000-0002-4945-7269

Corresponding author: Evgina S.A. — e-mail: s.evgina@fedlab.ru; tel.: +7(910)422-0078; https://orcid.org/0000-0002-4945-7269

В поиске ответа на вопрос, является ли результат лабораторного исследования, полученный у пациента, нормальным, врач проводит его сравнение с другими величинами. Долгое время в качестве базы сравнения использовались так называемые нормы, или нормальные значения, полученные эмпирическим путем, сформировавшиеся в результате устоявшейся практики. При этом дать четкое определение термину «норма» не удавалось. 1969 г. на смену расплывчатому понятию нормы R. Gräsbeck и N. Saris предложили термины «референтное значение» (РЗ) и «референтный интервал» (РИ), развившиеся в последующие 10 лет в теорию референтных значений. Наиболее полно история данного вопроса, включая основные этапы развития теории, а также перечень нерешенных проблем представлены в работе J. Siest и соавт. «Теория референтных значений: незаконченная симфония» [1]. Цель данного обзора — изложить основные рекомендуемые мировыми экспертами подходы и методы определения РИ, включая алгоритмы для переноса и верификации РИ, обозначить текущие проблемы в современной теории и практике РИ.

Определение и предназначение референтного интервала

Наиболее полно терминология и методические указания, рекомендуемые консенсусом экспертов, даны в документе Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [2]. РИ определяется на референтной выборке условно здоровых людей, соответствующих оговоренным критериям, т.е. на группе референтных индивидуумов, представляющих референтную популяцию. Референтное значение (РЗ) — это величина аналита у референтного индивидуума. Совокупность референтных значений формирует референтное распределение. РИ представляет собой 95% центральный диапазон РЗ, ограниченный верхним и нижним референтными пределами.

РИ является статистическим показателем и отражает биологические свойства референтной популяции, на которой был определен, — межиндивидуальную биологическую вариацию. Важно помнить, что по своему определению РИ предназначен быть зеркалом популяции и не может служить критерием суждения о здоровье или патологии. Для принятия решения об отнесении пациента к здоровым или больным, группе риска или для других клинических задач используются пороговые значения (ПЗ) (пороги клинического решения в терминологии ГОСТа [3]). Различиям между РИ и ПЗ посвящен недавний обзор комитета IFCC по РЗ и ПЗ (IFCC C-RIDL) [4], основные из которых представлены в **табл. 1**.

Непрямой метод определения РИ

В зависимости от способа получения данных по РЗ выделяют прямой и непрямой методы определения РИ. В первом случае для решения этой задачи проводится целенаправленный рекрутинг референтных индивидуумов, тогда как при непрямом подходе источником РЗ служит массив данных, уже накопленный в медицинской или лабораторной информационной системе.

В действующем руководстве CLSI рекомендуется прямой метод определения РИ [2]. Вместе с тем в последнее время отмечается возрастающий интерес к непрямому методу, часто называемому теперь «дата майнинг». Несмотря на такие его недостатки, как неполная информация о референтных индивидуумах, исключение нездоровых лиц с помощью статистиче-

Таблица 1. **Различие между РИ и ПЗ**

Показатель	РИ	ПЗ
Количество значений	Два значения — верхний и нижний предел	Одно значение для конкретной клинической ситуации
Предназначение	Биологическая характеристика популяции	Принятие клинического решения
Применимо	Общая популяция	Клиническая популяция
Влияющие факторы	Популяция, пол, возраст и др. источники вариации	Клиническая задача Категория пациентов
Происхождение	95% центральный диапазон референтного распределения, определяемый статистическими методами	Консенсус экспертов на основе исследований клинических исходов с определением распространенности патологии, ROC-кривых и предсказательной ценности
Кто определяет	Специалисты лабораторной службы	Клиницисты и лабораторные эксперты в клинических рекомендациях
Ведущие эксперты	Специалисты лабораторной службы	Клиницисты
Согласованный стандарт	Хорошо сформулирован, документ CLSI	Предстоит разработать

Примечание. Применение РИ имеет свои ограничения, в частности при интерпретации результатов аналитов с низким индексом индивидуальности. У таких аналитов внутрииндивидуальная вариация ниже межиндивидуальной вариации, значения пациента могут не выходить за пределы РИ, но значительно отличаться от значений, типичных для данного пациента. В этом случае целесообразнее использовать мониторинг уровня аналита и для интерпретации динамики сравнивать получаемый результат не с РИ, а с критической разницей значений RCV (Reference Change Value, в ГОСТе — референтное различие значения [3]).

ских упражнений, недостаточность контроля преаналитического этапа и аналитических условий, члены комитета IFCC считают возможным использование непрямого метода в ряде случаев [5]. Это относится к ситуациям, когда сложно рекрутировать требуемое количество референтных индивидуумов для проведения исследования прямым методом, в частности при определении РИ для детей, пожилых лиц, беременных. К достоинствам непрямого метода относятся отсутствие больших затрат на рекрутинг референтных индивидуумов, взятие и тестирование биоматериала; использование РЗ, непосредственно относящихся к обслуживаемой популяции; получение РЗ в пре- и аналитических условиях, соответствующих реальной рутинной практике действующей лаборатории.

При непрямом методе предпочтение отдается использованию данных обследуемых амбулаторно пациентов. В случае госпитальных баз необходима идентификация заболеваний по кодировке с исключением определенных подгрупп в зависимости от исследуемого аналита. Также для исключения могут использоваться другие доступные в системе данные о состоянии здоровья пациента. С целью снижения вероятности наличия патологического результата используются только РЗ пациентов с единственным результатом или в серии измерений выбирается последний результат.

РИ при непрямом методе рассчитываются с помощью специальных математических инструментов, в частности с использованием анализа Blattacharya и его модификаций [2], метода Hoffman [6], F. Arzideh и соавт. [7], которые менее чувствительны к присутствию патологических результатов по сравнению с классическими параметрическим или непараметрическим методами. В Интернете доступны следующие приложения: на базе excel Bellview Bhattacharya analysis (Doug Chesher) https://sourceforge.net/projects/bellview/; на базе excel от Graham Jones http://www.sydpath.stvincents.com.au/; https://www.r-bloggers.com/mining-your-routine-data-for-reference-intervals-hoffman-bhattacharya-and-maximum-likelihood/. В бурно развивающемся мире «биг дата» исследователи активно ищут решения для нивелирования недостатков непрямого метода, определения механизмов исключения выпадающих значений, согласования минимального размера данных и возможных статистических допущений.

Определения РИ прямым методом

Основные этапы определения РИ прямым методом подробно описаны в руководстве CLSI, которое также рекомендовано IFCC [2]. Хорошим примером могут служить протокол, а также стандартные операционные процедуры и примеры анкет, опубликованные комитетом IFCC C-RIDL для многоцентровых исследований [8]. Ниже приведена краткая выдержка из руководства [2] и рекомендаций рабочей группы по аккредитации и стандартам ISO/CEN Европейской федерации лабораторной медицины [9]. Это адаптированный перечень основных шагов при прямом методе:

1. На основе данных литературы проанализируйте возможные факторы биологической и аналитической вариации для исследуемого аналита.

2. С учетом этих данных определите критерии включения/исключения и отразите это в анкете для участников исследования.

3. Установите для данного аналита требуемое количество референтных индивидуумов в зависимости от предполагаемого статистического метода расчета пределов РИ, в том числе для каждой из подгрупп в случае возможного деления РИ по подгруппам.

4. Подпишите у предполагаемых участников информированное согласие на участие в исследовании и соберите заполненные анкеты.

5. Проверьте отобранных потенциальных референтных индивидуумов по данным анкеты на предмет соответствия заранее определенным критериям включения/исключения. Исключите, если необходимо.

6. В случае ожидаемого деления РИ на подгруппы сформируйте подгруппы референтных индивидуумов на основе данных анкеты.

7. Подготовьте отобранных участников к взятию биоматериала в соответствии с процедурой, обычно используемой в лаборатории.

8. Соберите и обработайте образцы.

9. Определите РЗ: анализируйте образцы с использованием хорошо проверенных и контролируемых методов.

10. Постройте гистрограмму РЗ и оцените распределение данных.

11. Идентифицируйте возможные ошибки и/или выпадающие значения.

12. Проанализируйте РЗ: выберите статистический метод и рассчитайте референтные пределы и доверительные интервалы.

13. Документируйте все шаги и процедуры.

Важно помнить, что необходимо, помимо обеспечения качества, на аналитическом этапе стандартизовать и строго контролировать различные преаналитические процедуры.

Описанный выше алгоритм прямого метода относится к так называемому подходу a priori, когда исключение по заданным критериям выполняется до взятия биоматериала. В случае a posteriori критерии исключения применяются после сбора образцов, и в такой ситуации придется рекрутировать заведомо большее число потенциальных референтных индивидуумов, чтобы в конечном итоге иметь достаточное их количество в референтной выборке с точки зрения статистики.

В **табл. 2** приведен перечень характеристик индивидуумов, которые, согласно руководству [2], потенциально могут рассматриваться в качестве крите-

Таблица 2. **Примеры возможных критериев исключения согласно стандарту CLSI [2]**

Аномальное артериальное давление	Наркотическая зависимость
Беременность	Недавняя болезнь, операция
Вид деятельности, профессия	Недавняя трансфузия
Генетические факторы	Ожирение
Госпитализация, текущая/недавняя	Окружающая среда
Донорство	Оральные контрацептивы
Злоупотребление витаминами	Прием лекарств
Курение	Состояния натощак или после приема пищи
Лактация	Употребление алкоголя

риев исключения. В уже упомянутом протоколе IFCC для многоцентровых исследований были приняты следующие критерии исключения: наличие диабета, хронических заболеваний печени или почек, стационарное лечение за последние 4 нед, донорство крови за последние 3 мес, известное носительство гепатита B, C или ВИЧ, беременные, кормящие или рожавшие менее 1 года назад, участие в другом исследовательском проекте, содержащем экспериментальный препарат, за последние 12 нед [10]. Остальные факторы, потенциально способные оказать влияние на результат, например прием медикаментов, интенсивность курения и приема алкоголя, частота физических упражнений, фиксировали в анкете участника. Данный подход был относительно мягким, в связи с чем для аналитов, связанных с широко распространенными латентными патологиями, при последующем анализе дополнительно применяли вторичные критерии исключения. В частности, использовали метод LAVE, разработанный K. Ichihara. Метод заключается в нескольких итерациях расчета РИ, при которых исключаются РЗ индивидуумов с одним аномальным результатом или более по другим заранее оговоренным «тестам оценки здоровья» [10].

Надо отметить, что критерии включения/исключения являются одним из самых дискуссионных моментов в исследованиях по определению РИ. Прежде всего, не существует единого понятия условно здорового человека. С практической точки зрения очень жесткие ограничения приведут к низкой реализуемости задачи рекрутинга требуемого количества референтных индивидуумов, а также существенно повысят стоимость предварительного обследования и отбора. При определении критериев включения/исключения важно помнить об основном предназначении РИ — служить отражением исследуемой популяции. Необходимо приводить четкое описание отобранной референтной популяции для ясного понимания ограничений применимости РИ, полученных в исследовании.

Статистические методы расчета РИ

При определении РИ предполагается как визуальная оценка распределения РЗ, так и использование набора статистических инструментов. Анализ скатерограммы РЗ позволяет предположить наличие выбросов — значений аналита, существенно отличающихся от общего массива РЗ. Для принятия решения об их исключении часто используют правило Dixon/Reed: если отношение разницы значений между выпадающим значением и соседним к нему РЗ к разнице между крайними значениями всего полученного диапазона РЗ $\geqslant 0{,}3$, то данное выпадающее значение подлежит исключению из референтной выборки. Если присутствуют 2—3 выброса с одной стороны распределения, то данное правило применяется к наименьшему выпадающему значению. В случае, если оно подлежит исключению, то остальные также исключаются. Если нет, то тогда исследователь либо оставляет эти выпадающие значения, либо применяет процедуру блока Barnett и Lewis [2]. IFCC также рекомендует подход, изначально предложенный Turkey и доработанный Horn, согласно которому выбросы идентифицируются в квартилях. Рассчитываются значения нижнего Q1 и верхнего Q3 квартилей, межквартильный размах IQR=Q3—Q1. Исключаются РЗ, выходящие за нижнюю границу, определяемую как Q1—1,5IQR, или превышающие верхний порог Q3+1,5IQR. Заметим, что после удаления выброса подходящий тест необходимо применить к оставшимся РЗ на предмет выявления другого выпадающего значения.

Существует несколько методов для расчета пределов РИ: параметрический, непараметрический, робастный. Первый предполагает нормальное (или «гауссово») распределение РЗ, и пределы РИ рассчитываются как среднее РЗ$\pm$1,96 SD. Однако в случае биологических аналитов такое распределение встречается нечасто. Для расчета пределов РИ непараметрическим методом форма распределения РЗ не имеет значения. По этой причине он рекомендован IFCC [2]. Для определения РИ непараметрическим методом РЗ ранжируются от меньшего к большему. В случае выборки в 120 РЗ в качестве 2,5 перцентиля выбирается РЗ на третьей позиции и РЗ на 118-м месте для 97,5 перцентиля.

Если распределение ненормальное, то можно предпринять попытку трансформировать данные, используя наиболее подходящий метод трансформации, например логарифмический, и затем проверить полученные РЗ на нормальность распределения. Надо отметить, что в рамках глобального многоцентрового исследования РЗ по РИ удалось провести успешную трансформацию для подавляющего большинства исследованных аналитов [10]. Было показано, что два способа давали близкие значения, но в случае параметрического метода наблюдали более узкие доверительные интервалы (ДИ) для пределов РИ

по сравнению с непараметрическим. Для аналитов, ассоциированных с метаболическим синдромом, наблюдали более узкие РИ, рассчитанные с помощью параметрического метода, по сравнению с непараметрическим.

Пределы РИ должны представляться с 90% ДИ, описывающими диапазон значений истинного предела РИ с 90% вероятностью. Чем уже ДИ, тем надежнее РИ. Считается приемлемым, если ДИ не превышает 0,2 ширины РИ [9]. Наиболее сильно на ДИ влияет размер выборки. В связи с этим, согласно рекомендациям IFCC, для расчета РИ непараметрическим методом требуется как минимум 120 РЗ [2]. Для определения пределов РИ параметрическим методом необходимо более 200 РЗ, так как в районе 150 РЗ и ниже параметрический метод нестабилен [10]. Широко распространенным способом расчета ДИ является bootstrap-метод. В нем вероятность распределения пределов РИ оценивается в ходе 100 итераций расчета РИ для псевдовыборок и более, которые формируются на основе имеющейся базы РЗ специальным генератором повторных выборок.

Для случаев, когда доступно небольшое количество РЗ, IFCC допускает применение робастного метода, который не требует нормального распределения РЗ и устойчив к выбросам. Используется специальный робастный алгоритм, присваивающий РЗ различный вес в зависимости от удаленности РЗ от медианы. Робастный метод позволяет установить РИ в случае 20 референтных индивидумов, однако с неприемлемо широкими ДИ. В связи с этим IFCC рекомендует иметь как минимум 80 РЗ для использования робастного метода [2].

Краткое описание статистических подходов для исследований по РИ представлено в обзоре Y. Ozarda [11], включая перечень инструментов для принятия решения о выделении РИ для подгрупп. В него вошли:

1) метод Harris и Boyd, рекомендующий разделение РИ для двух подгрупп численностью n_1 и n_2, если отношение стандартных отклонений для подгрупп (большего к меньшему) превысит 1,5, или если рассчитанный z*-критерий по формуле

$$z^*=3[(n_1+n_2)/240]^{1/2}$$

превысит 3;

2) метод Lahti и соавт. с оценкой доли индивидуумов за пределами РИ для двух подгрупп в «хвосте» общего распределения всех РЗ;

3) метод, разработанный K. Ichihara и J.C. Boyd, оценивающий значимость различия средних в подгруппах и предлагающий рассмотреть возможность разделения РИ, если SDR — отношение стандартного отклонения среднего в подгруппах к межиндивидуальному отклонению — выше 0,3 [10].

Однако приведенные методы обладают ограничениями, и для принятия решения, помимо статистики, исследователю необходим вдумчивый визуальный анализ распределения РЗ, сопоставления с физиологией и другими данными по возможным источникам вариации РЗ. Наиболее частыми критериями для разделения РИ по подгруппам являются пол и возраст. Опыт глобального многоцентрового исследования IFCC по РЗ свидетельствует о целесообразности проведения отдельно статистического анализа для мужчин и женщин при выяснении необходимости установить РИ для разных подгрупп. Повышенное внимание необходимо уделять анализу возможного разбиения на возрастные подгруппы у аналитов, зависимых от индекса массы тела. Эти два источника вариации могут усиливать влияние друг друга на распределение РЗ, симулировать или маскировать эффект на РЗ в зависимости от аналита и возрастной динамики индекса массы тела в популяции. Следует отметить, что при расчете РИ для различных подгрупп требуется соблюдение рекомендованного минимального количества референтных индивидуумов в каждой из подгрупп.

Перенос и верификация РИ

В последние годы проведено несколько многоцентровых исследований по установлению РИ с большими выборками референтных индивидуумов в северных странах, Азии, Австралии, Канаде, 12 странах, вошедших в глобальный проект комитета IFCC, включая Россию [10—12]. С целью практического использования полученных результатов комитет IFCC C-RIDL призывает лаборатории к активному проведению процедуры переноса и верификации РИ, установленных в ходе исследований. Это также соответствует требованиям стандарта ISO15189, согласно которому каждая лаборатория периодически должна оценивать используемые ею РИ. По сравнению с самостоятельной разработкой РИ верификация является более реалистичной задачей и не требует привлечения больших ресурсов.

Детальные инструкции содержатся в руководствах CLSI [2, 13]. Несмотря на то что в документе [2] «валидация» и «верификация» используются как синонимы, хотелось бы обратить внимание на различие, прокомментированное в обзоре [12]. По сути оба термина обозначают получение доказательств соответствия определенным требованиям. Вместе с тем исторически термин «валидация» применяется в отношении процедуры объективного подтверждения применимости аналитической системы для указанной цели и соответствия аналитических характеристик системы, внедряемой в работу лаборатории, заявленным требованиям в заранее установленных пределах. Она предусматривает тестирование большего количества образцов и сбора данных. Процедура валидации подразумевает, что лаборатория должна установить РИ прямым методом. Однако если лаборатория переносит в свою практику РИ из литературы, инструкций к реагенту или

от другой лаборатории, то соответствующий процесс подтверждения приемлемости использования переносимых РИ определяется как верификация.

Возможны два основных сценария при переносе РИ — сравнение аналитических систем или популяций. Если лаборатория решила сменить метод (или анализатор), т.е. обслуживаемая популяция осталась прежней, то перенос РИ внутри лаборатории превращается в «сравнение аналитических систем». Данная задача решается в соответствии с документом CLSI, рекомендованным IFCC [13]. Следует помнить, что перенос РИ с одной аналитической платформы на другую, основанный на математической коррекции результатов измерений, невозможен, если имеются существенные различия между аналитическими процессами на каждой платформе. Это, например, характерно для многих иммунохимических методов ввиду использования разных антител к разным эпитопам аналита, перекрестной реактивности антител с множеством циркулирующих форм определяемого аналита и существенных отличий в калибровке. Решение о проведении исследования по сравнению методов с целью переноса РИ рекомендуется принять после изучения публикаций по сопоставлению метода лаборатории и метода, использованного для установления РИ, результатов ранее проведенных исследований о возможности переноса РИ между методами, данных производителей об аналитических характеристиках методов и результатов программ внешнего контроля качества.

Для получения статистически надежных результатов сравнительных измерений исследуемых проб биоматериала должно быть не менее 40. Концентрация аналита в пуле биоматериала должна охватывать весь аналитический диапазон измерений — от низких до высоких значений с равномерным распределением по концентрациям. Нет необходимости брать образцы биоматериала у специально отобранных лиц, достаточно использовать биоматериал, оставшийся в лаборатории после проведения заказанных анализов. Лучше избегать хранения образцов и проводить измерения обоими методами в течение 2 ч или быстрее, если известно, что аналит нестабилен (например, лактат, аммиак). Если есть необходимость в хранении образцов до исследования, то важно строго соблюдать условия хранения — температуру, время, стабилизатор и другие, необходимые для обеспечения стабильности исследуемого аналита. Условия хранения должны быть описаны в надежных источниках литературы и рекомендациях производителей исследуемых методов. Измерения в пробах должны быть равномерно распределены по времени и выполнены в течение 3—5 рабочих дней (всего 40 проб, 8 проб в день в течение 5 дней).

По результатам сравнительных измерений проводят графический и статистический анализы. Строят графики рассеяния исходных результатов с последующим расчетом коэффициента корреляции (или коэффициента детерминации — r^2) и коэффициентов линейной регрессии, графики отличий (Бланд—Альтмана) и график остатков. Выявляют и удаляют выбросы и единичные экстремально высокие или низкие значения концентраций. Для корректного переноса референтных пределов по уравнению простой линейной регрессии необходимо, чтобы $r^2 \geqslant 0{,}95$. Если $r^2 \leqslant 0{,}7$, перенос невозможен. При промежуточных значениях коэффициента детерминации возможен расчет по уравнению регрессии Deming. При визуальной оценке графиков определяются равномерность распределения отличий в зависимости от концентрации, отсутствие кластеризации результатов, близость к нормальному распределения остатков в зависимости от концентрации. Нормальный характер распределения остатков должен быть подтвержден графически (график Q—Q). Кроме того, по мнению экспертов, смещение по оси Y не должно быть большим по сравнению с шириной РИ. При соблюдении всех вышеперечисленных условий можно использовать уравнение линейной регрессии для расчета пределов РИ для новой аналитической системы. Подробно алгоритм переноса РИ с одной аналитической системы на другую описан в статье об исследовании CALIPER, предлагаемой читателям в переводе в данном номере журнала [14]. В случае узкого РИ, например у натрия, возможна ситуация, когда для перерасчета РИ предпочтительнее оценка смещения средних двух методов [2]. Независимо от использованного способа переноса, будь то принятие изначальных РИ или их перерасчет тем или иным образом, IFCC рекомендует провести далее процедуру верификации новых РИ, о чем пойдет речь ниже.

При переносе РИ от аналогичной аналитической системы на другую популяцию стандарт CLSI допускает применение двух подходов: субъективную оценку и верификацию с использованием образцов от условно здоровых лиц, соответствующих критериям включения/исключения и представляющих популяцию, обслуживаемую лабораторией. В первом случае лаборатория должна сопоставить свои характеристики с параметрами лаборатории, в которой были разработаны РИ, с целью убедиться в их схожести. Основные пункты для анализа: географические и демографические критерии, преаналитические процедуры, аналитический метод, референтная популяция, использованный протокол и статистические методы для расчета РИ. При задокументированном совпадении допускается применение переносимых РИ [2].

Схема применения второго подхода с использованием небольшой референтной выборки представлена на **рисунке 1**. На первом этапе проверяются РЗ от 20 референтных индивидуумов на предмет наличия выбросов. Если потребовалось исключение, то для замены привлекаются новые референтные индивидуумы. Далее проводится сопоставление РЗ от 20 индивидуумов

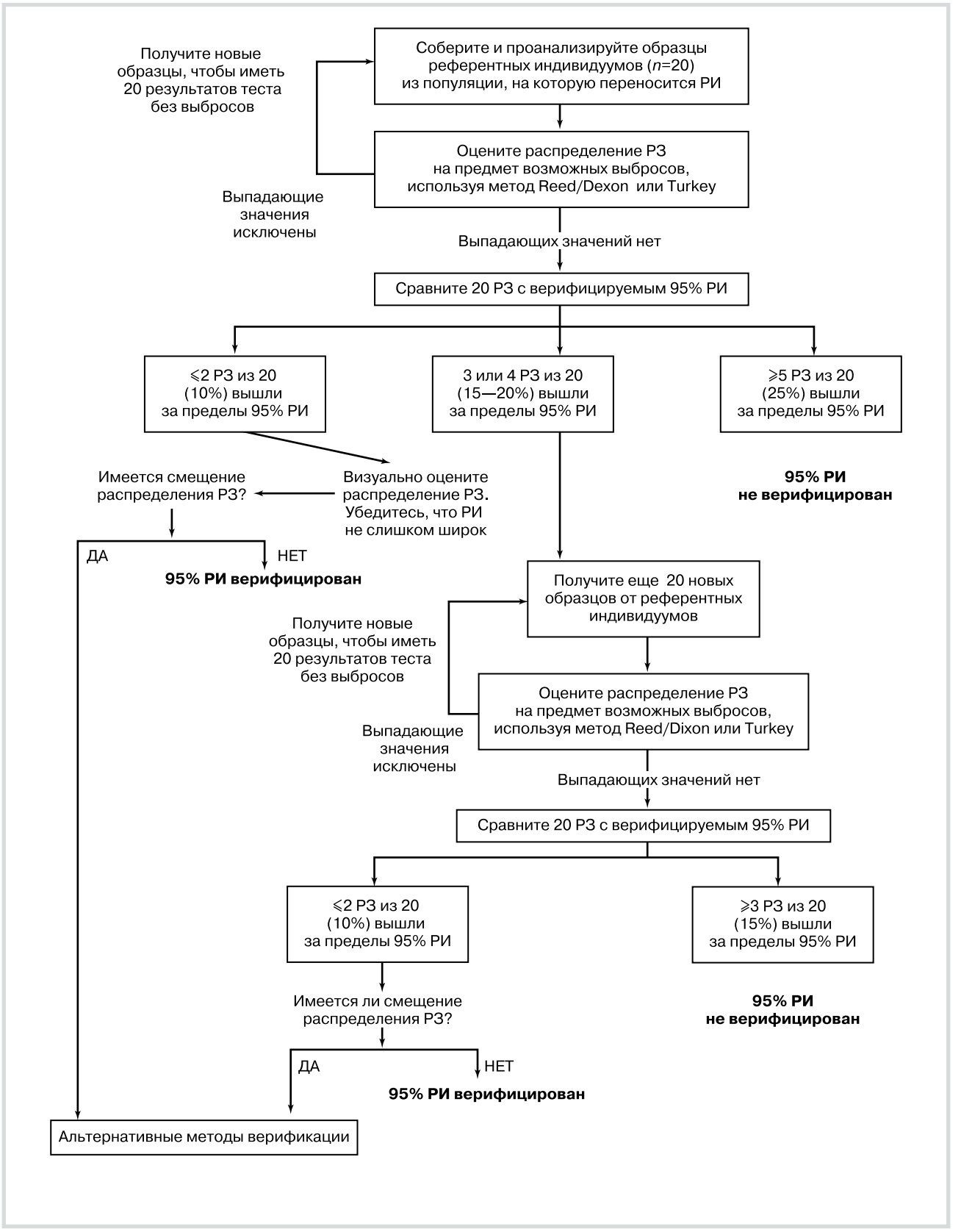

Рис.1. **Схема верификации РИ, переносимого в лабораторию, согласно стандарту CLSI с использованием ограниченной референтной выборки.**

с переносимым РИ. РИ считается верифицированным, если не более чем 2 образца из 20 вышли за пределы РИ. Если таковых было 3 или 4, то требуется привлечение дополнительно новых 20 референтных индивидуумов. Если в новой набранной группе 3 выхода за границы РИ или более или в первой двадцатке РЗ от 5 индивидуумов выходили за пределы РИ, то перенос РИ невозможен. Требуется проверка аналитической процедуры на предмет исключения возможных ошибок и предполагается возможная разница в составе референтных популяций. В этих случаях лаборатория должна разработать собственные РИ. Обязательным также является анализ равномерности распределения РЗ, используемых для верификации. Если при наличии двух РЗ, выходящих за пределы верифицируемого РИ, также имеется смещение РЗ в сторону вышедших значений, то верификация РИ вызывает сомнение. В таком случае целесообразно применять другие методы верификации. Когда более 90% РЗ попадают в верифицируемый РИ, автоматическое принятие такого РИ не рекомендуется в связи с тем, что, возможно, принимаемый РИ слишком широк для обслуживаемой популяции.

При верификации РИ, установленных для подгрупп, стандарт CLSI допускает проверку РИ для одной из подгрупп: в случае ее успешной верификации возможно сделать заключение о верификации РИ для всех подгрупп. Однако такое решение может вызывать сомнения, и желательно проводить верификацию для каждой из подгрупп.

Стандарт CLSI предусматривает дополнительный вариант переноса РИ для аналитов с высокой клинической значимостью, правильная интерпретация которых критична для лаборатории. Это предполагает расчет РИ робастным методом на референтной выборке из 60 условно здоровых лиц. Полученные РИ сравниваются с РИ из полноценного исследования, включавшего не менее 120 РЗ. Для выявления значимых различий между двумя референтными выборками применяются упомянутые ранее правила выделения РИ для подгрупп (метод Harris/Boyd и др.) [2]. В этом варианте лаборатории также необходимо самостоятельно принять решение для каждого аналита о приемлемости ширины ДИ РИ, рассчитанных таким образом.

Помимо способов верификации, рекомендованных в стандарте CLSI, существуют и другие подходы, в частности data mining — использование локальных информационных баз данных, позволяющее отобрать сотни и тысячи результатов лабораторных исследований условно здоровых индивидуумов. В этом случае применяется оценка меры центральной тенденции распределения данных (медианы или моды), которая более устойчива к присутствию патологических результатов, чем пределы РИ. Для оценки аналитического или популяционного смещения сравниваются медиана данных, извлеченных из информационной системы, с медианой выборки РЗ, использованных для установления РИ. Помимо этого, необходимо мониторировать процент аномальных результатов и оценить долю флагов, т.е. значений, попадающих за пределы используемого РИ, — текущую и ожидаемую при переходе к верифицированному РИ. Если изменение доли флагов не превысит допустимые пределы, то РИ считается приемлемым. Согласно концепции минимального, оптимального и желаемого предела смещения, доля флагов может варьировать в диапазоне от 1,0 до 1,8% для флагов о выходе за нижний предел РИ и от 5,7 до 3,3% для флагов превышения верхней границы РИ. Авторы работы [15] не рекомендуют использовать data mining, если нет четкого различия между распределениями РЗ здоровых и нездоровых лиц или существует значительное смещение между методами, приводящее к ложному завышению или занижению доли флагов. Альтернативный стандарту CLSI подход — мониторинг медианных значений и частоты результатов за пределами РИ может с успехом применяться не только для первичной верификации, но и при проведении периодических подтверждений корректности использующихся РИ. При проведении верификации полезно дополнительно рассчитать РИ непрямым методом на основе данных информационной системы. В дальнейшем периодически проводить аналогичные расчеты и сравнивать получаемый РИ с первоначально рассчитанным непрямым методом РИ для подтверждения стабильности используемого РИ и отсутствия аналитического или популяционного смещения.

Сегодня лаборатория обладает современным арсеналом средств для установления адекватных РИ. Доступны протоколы и результаты многоцентровых исследований для большого перечня аналитов и множества платформ, разработаны процедуры переноса и верификации РИ. Возрастает значимость технологий data mining, создающих новые возможности по установлению и верификации РИ для разных популяций и сложных для рекрутинга групп — детей, пожилых, беременных. По мере накопления данных молекулярно-биологических исследований могут возникать новые задачи, в частности разработки РИ для подгрупп с различным генотипом.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, Queraltó J, Petersen P. The theory of reference values: an unfinished symphony. *CCLM*. 2013;51(1):47-64. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0682
2. CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline — third edition. Wayne, Pa., USA: CLSI; 2010.
3. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.
GOST R 53022.3-2008 Tekhnology laboratornye klinicheskye. Trebovaniya k kachestvu klinicheskikch laboratornykh issledovaniy. Chast 3. Pravila otsenky klicheskoy informativnosti laboratornykh testov. (In Russ.).
4. Ozarda Y, Sikaris K, Streichert T, Macri J. Distinguishing reference intervals and clinical decision limits — A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2018;55(6):420-431. https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1482256
5. Jones G, Haeckel R, Loh T, Sikaris K, Streichert T, Katayev A, et al. Indirect methods for reference interval determination — review and recommendations. *CCLM*. 2018;57(1):20-29 https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0073
6. Hoffmann R. Statistics in the Practice of Medicine. *JAMA*. 1963;185(11):864-873. https://doi.org/10.1001/jama.1963.03060110068020
7. Arzideh F, Wosniok W, Gurr E, Hinsch W, Schumann G, Weinstock N, Haeckel R. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *CCLM*. 2007;45(8):1033-1042. https://doi.org/10.1515/cclm.2007.250
8. Ozarda Y, Ichihara K, Barth J, Klee G. Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *CCLM*. 2013;51(5):1027-1040. https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0249
9. Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Mesko Brguljan P, Lohmander M, et al. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *CCLM*. 2016;54(12):1893-1900. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0793
10. Ichihara K, Ozarda Y, Barth J, Klee G, Qiu L, Erasmus R, et al. A global multicenter study on reference values: 1. Assessment of methods for derivation and comparison of reference intervals. *Clin Chim Acta*. 2017;467:70-82. https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.09.016
11. Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia Medica*. 2016;26(1):5-16. https://doi.org/10.11613/bm.2016.001
12. Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *CCLM*. 2018;57(1):30-37. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0059
13. CLSI document EP09-A3. Method procedure comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline — third edition. Wayne (PA): CLSI; 2013.
14. Araújo P, Thomas D, Sadeghieh T, Bevilacqua V, Chan M, Chen Y, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals to Beckman Coulter DxC biochemical assays. *Clin Biochem*. 2015;48(13-14):870-880. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.002
15. Tate J, Yen T, Jones G. Transference and Validation of Reference Intervals. *Clin Chem*. 2015;61(8):1012-1015. https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.243055

Поступила 25.12.18
Received 25.12.18
Принята к печати 26.02.19
Accepted 26.02.19