



INTERVALOS DE REFERÊNCIA EM ANÁLISES CLÍNICAS

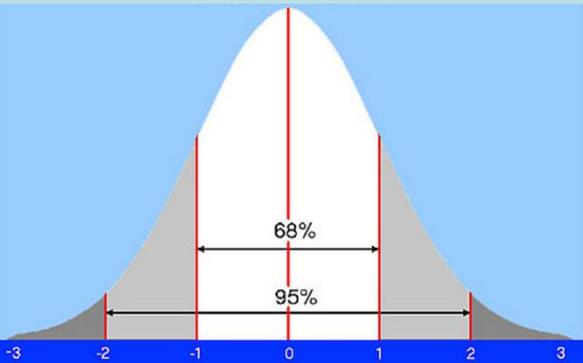
Professora: Flávia Martinello
Universidade Federal de Santa Catarina

GESTÃO DA QUALIDADE DA FASE PÓS-ANALÍTICA



Fase pós-analítica: fase que se inicia após a obtenção de resultados válidos das análises e finda com a emissão do laudo e providências de comunicação, para a interpretação pelo solicitante;

Introdução



Os termos valor, intervalo ou faixa de normalidade estão em desuso, pois na área médica é difícil definir o que é normal.

Valor de referência

Intervalo entre e inclui dois limites de referência (IR)

Introdução

Os resultados de exames laboratoriais são interpretados por comparação com valores ou intervalos de referência obtidos de uma população cujo estado de saúde é conhecido.

Essas comparações podem ser transversais ou longitudinais.

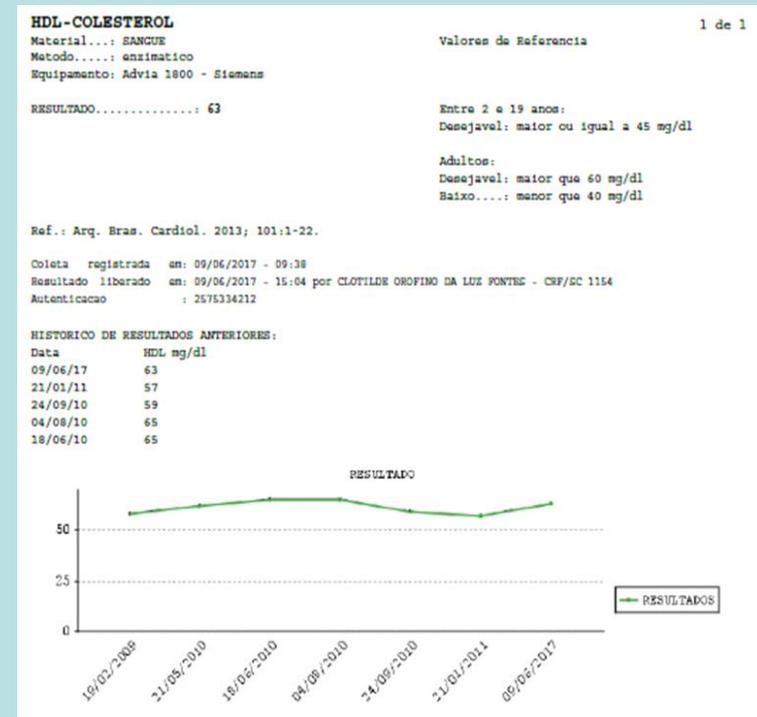
A comparação transversal é a comparação do resultado de um analito de um paciente com os valores desse analito obtidos em um grupo de indivíduos aparentemente saudáveis. Esse tipo é conhecido como valores de referência “baseados na população”.

São usados para diagnóstico ou rastreamento.

Introdução

As comparações longitudinais são aquelas em que um valor recente de um paciente é comparado aos valores anteriores para o mesmo analito. Essa comparação pode ajudar a detectar uma alteração do estado de saúde.

São usados para monitoramento de pacientes.



Introdução

Existem dois tipos de valores de referência com base na população.

- O tipo mais comum é derivado de uma amostra de referência de pessoas em boas condições de saúde (associado à saúde).
- O outro tipo de valores de referência foi denominado “baseado em decisão” e define limites de decisão específicos usados por médicos no diagnóstico ou no tratamento dos pacientes.

Intervalos de Referência

1. Método direto - definição dos próprios intervalos,
2. Validação dos dados constantes das bulas de reagentes, ou das informações disponíveis na literatura (método abreviado)
3. Método indireto

Pode-se utilizar as 3 formas em um laboratório!

Intervalos de Referência

1. Método direto

Amostragem direta.

Seleção de resultados de uma população de referência por critérios pré-determinados, que são independentes do mensurando de interesse

A priori é a aplicação de critérios antes da coleta das amostras

A posteriori é a aplicação de critérios após a coleta das amostras

Intervalos de Referência

1. Método direto

Deve considerar a **variação biológica, gênero, idade, etnia e fatores extrínsecos** como postura; realização de exercícios físicos; dieta; tempo de jejum, uso de cafeína e bebidas alcoólicas; utilização de drogas com fins terapêuticos ou não e gravidez.

Intervalos de Referência

1. Método direto

Nº de indivíduos: 30-700 amostras.

CLSI e a IFCC: mínimo 120 indivíduos (90%)

158 indivíduos (95%)

198 indivíduos (99%)

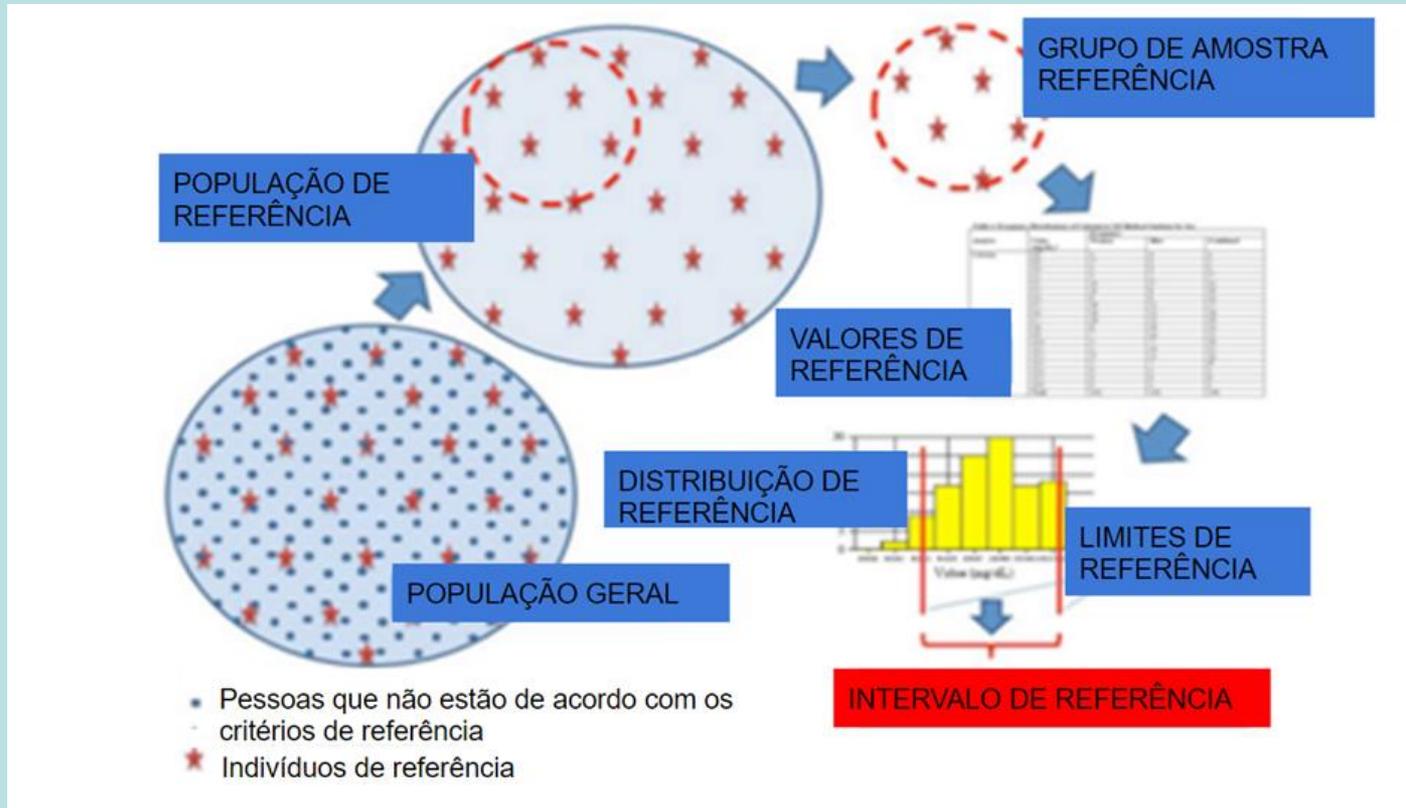
700 indivíduos para distribuição de resultados altamente distorcida

Table 2. Examples of Possible Partitioning Factors

Age	Geographic location
Blood group	Posture when sampled
Circadian variation	Race
Diet	Sex
Ethnic background	Stage of menstrual cycle
Exercise	Stage of pregnancy
Fasting or nonfasting	Tobacco use

Intervalos de Referência

É difícil definir os participantes saudáveis.



Intervalos de Referência

1. N^o de indivíduos: 30-700 amostras.

CLSI e a IFCC: mínimo 120 indivíduos.

Table 3. Preanalytical Factors for Consideration

Subject Preparation	Specimen Collection	Specimen Handling
<ul style="list-style-type: none">• Prior diet• Fasting vs nonfasting• Abstinence from pharmacologic agents• Drug regimen• Sampling time in relation to biological rhythms• Physical activity• Rest period before collection• Stress	<ul style="list-style-type: none">• Environmental conditions during collection• Time• Body posture• Specimen type• Collection site• Site preparation• Blood flow• Equipment• Technique• Tourniquet time	<ul style="list-style-type: none">• Transport• Clotting• Separation of serum/plasma• Storage• Preparation for analysis

Intervalos de Referência

1. N° de indivíduos: 30-700 amostras.

CLSI e a IFCC: mínimo 120 indivíduos.

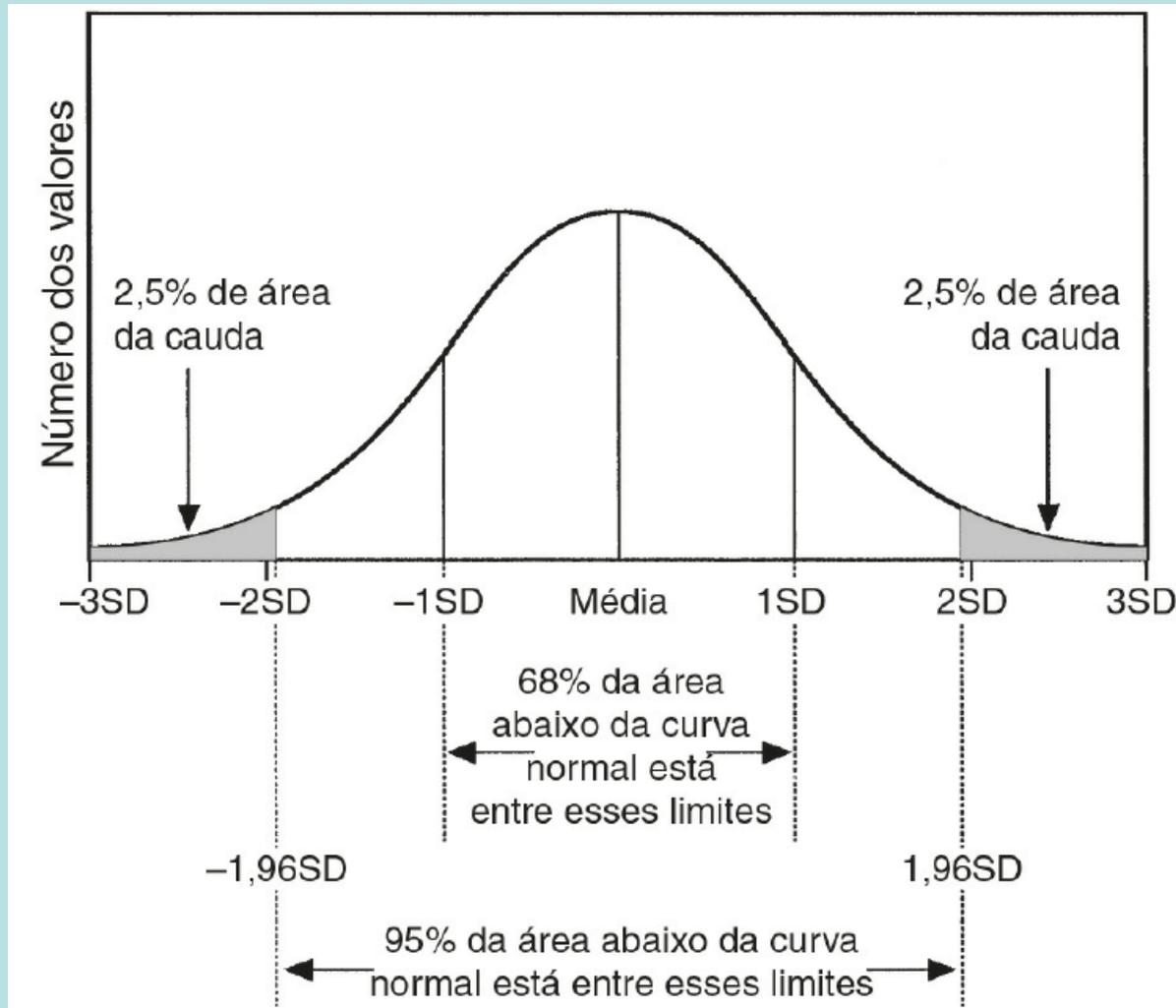
até 10% da amostragem pode ser desprezado como *outliers*.

Software MedCalc® (Reed, Tukey)

Teste de Dixon, se $D/R > 0,33 = \textit{outlier}$.

- D é a diferença entre o maior valor e o segundo maior valor ou o menor valor do segundo menor valor;
- R é a diferença entre o maior valor e o menor valor, também identificado como amplitude;

Conceito de valor Normal a partir da Curva de Gauss (ou curva normal de sino):



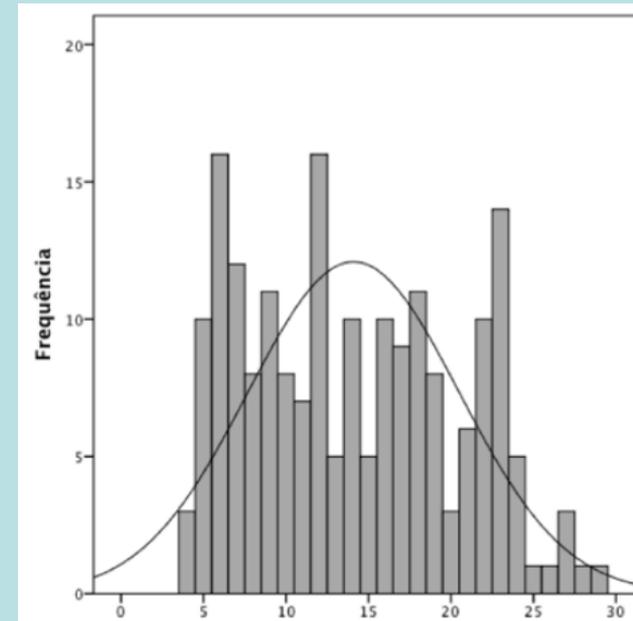
Intervalos de Referência

1. N^o de indivíduos: 30-700 amostras.

CLSI e a IFCC: mínimo 120 indivíduos.

Paramétrica: média \pm 2DP

Não paramétrica: mediana e percentil 2,5 e 97,5

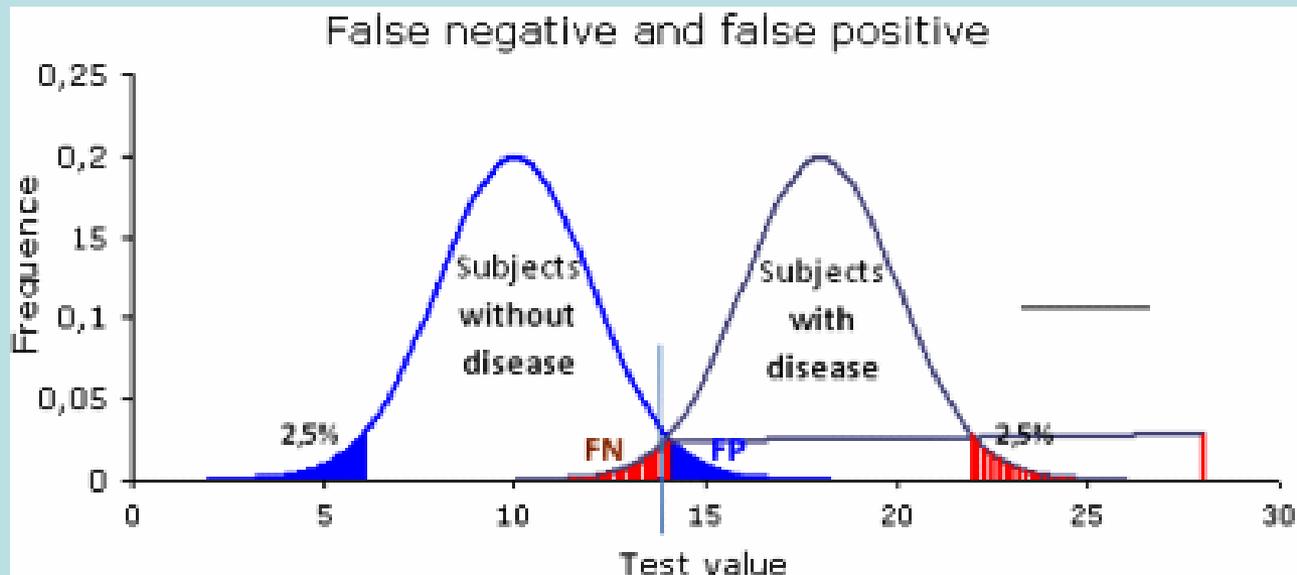


Intervalos de Referência (IR)

Os IR são estatísticos, isoladamente não possuem significado clínico.

Os IR correspondem a 95% dos resultados obtidos de uma amostra de exames.

Perceba que um “valor normal” significa tão somente que esse resultado é comum a 95% dos que fizeram os exames, não diz respeito se isso é bom ou ruim para a saúde.



Marcadores bioquímicos podem estar no limite (inferior ou superior) do intervalo de valores de referência sem significar, por si só, que é bom ou ruim.

Intervalos de Referência

2. Verificação ou validação de intervalos especificados no manual (bula) do conjunto diagnóstico (kit) ou da literatura.

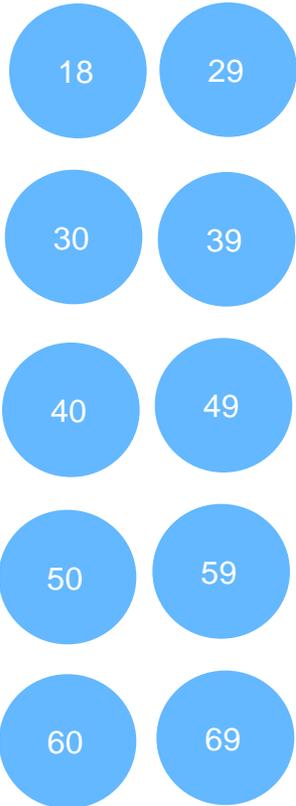
O CLSI preconiza testar 20 indivíduos considerados saudáveis. Apenas dois (10%) podem fornecer resultados fora do intervalo referido pela bula reagente. Caso contrário, as dosagens devem ser repetidas e, se o erro se repetir, os valores da bula não poderão ser utilizados.

Os valores deverão ser revistos a cada mudança de metodologia!

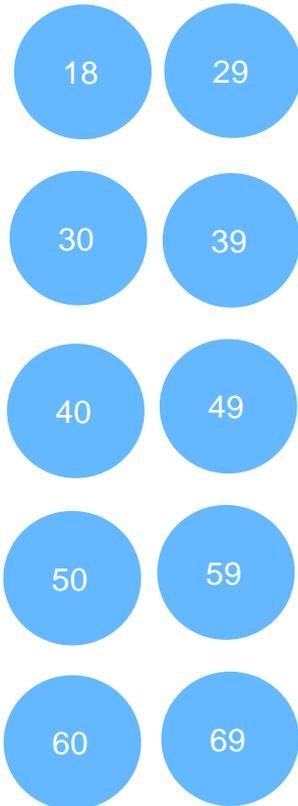
Metodologia



Idade (anos)



Idade (anos)



Idade (anos)



20

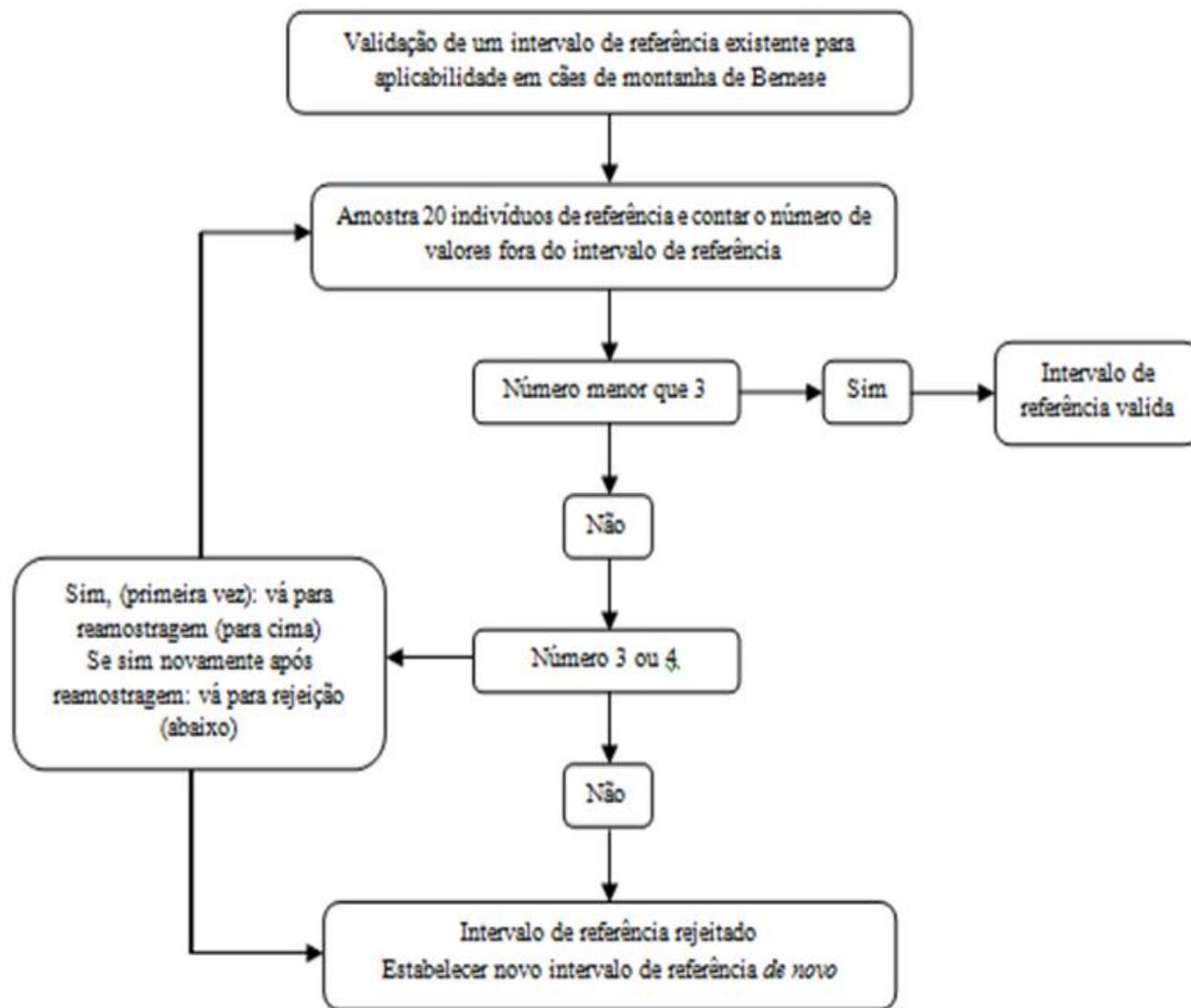


Idade (anos)



20





Validação dos IR

VALIDAÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA

Processo que garante, com razoável confiança, que o valor de referência estabelecido em outro lugar de estudo possa ser usado localmente (CLSI, 2008).

IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO

População brasileira é caracterizada por uma miscigenação de etnias, povos e segmentos tanto sociais quanto econômicos (ORTELAN; et al, 2019)

VANTAGENS E DESVANTAGENS

Mais econômica e necessita um número pequeno de indivíduos (no mínimo 20).

Método que não garante total segurança e sim de aproximadamente 95% (IFCC, 2011).

MÉTODO IDEAL

Criação de intervalos de referência próprios, visto que representam melhor a população local.

Resultados

Valores de referência - Adultos

Idade (anos)	Amilase (U/L)	BT (md/dL)	BD (mg/dL)	Ca (mg/dL)	K (mmol/L)	Lipase (U/L)	Mg (mg/dL)	Na (mmol/L)	P (mg/dL)	PT (g/dL)	Ureia (mg/dL)
18	48	0,4	0,1	9,8	3,8	128	1,8	134	4,2	7,9	33
19	70	0,3	0,1	9,4	3,9	206	2,1	138	4,4	7,2	28
20	39	1,7	0,3	10,5	3,7	101	2,2	137	4,0	7,9	25
22	57	1,5	0,2	9,4	4,1	442	2,1	135	4,0	7,0	22
24	81	0,6	0,2	10,1	4,1	75	2,4	140	4,0	7,7	32
28	34	0,3	0,1	10,2	4,2	166	2,3	137	4,0	7,2	43
29	49	0,6	0,1	9,6	4,1	120	2,0	136	3,7	7,3	36
30	58	0,7	0,2	9,7	4,0	285	2,1	140	4,5	7,7	38
32	73	0,5	0,1	10,1	4,2	119	2,2	138	2,7	7,3	29
34	43	0,9	0,2	10	3,8	132	2,0	137	3,6	7,4	33
35	78	0,1	0,1	9,6	4,5	235	2,2	139	4,0	7,5	36
37	72	1,0	0,2	9,6	4,0	151	2,2	137	4,6	7,6	36
38	63	0,5	0,1	10,3	3,7	157	2,2	136	3,3	7,8	28
41	46	1,2	0,2	9,5	4,1	185	2,4	138	3,8	7,5	25
42	212	0,6	0,1	9,2	4,4	88	2,0	140	3,8	7,7	22
48	51	0,3	0,1	9,7	4,4	86	2,2	139	3,5	7,3	53
49	38	0,5	0,1	9,8	4,4	115	2,2	138	3,7	6,9	20
54	73	0,4	0,1	10,1	4,3	157	2,1	140	3,4	6,7	29
58	73	0,4	0,1	9,7	4,2	344	2,2	138	3,7	7,8	46
59	45	1,5	0,3	10,1	4,1	151	2,3	139	2,4	6,8	31
VR	25-115	0,2-0,1	0-0,2	8,5-10,1	3,5-5,1	73-393	1,8-2,4	136-145	2,6-4,7	6,4-8,2	15-39

Resultados

Valores de referência – Sexo feminino

Idade (anos)	FAL (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Fe (µg/dL)	GGT (U/L)	Ácido úrico (mg/dL)
24	52	23	0,74	144	19	3,7
24	58	31	0,83	96	20	4,2
22	66	13	0,7	120	23	4,2
30	79	15	0,8	91	18	3,7
34	48	16	0,84	116	30	2,1
34	61	14	0,93	62	27	4,1
51	46	8	0,59	59	32	3
18	41	17	0,63	82	18	4,8
39	68	16	0,69	76	21	2,2
32	69	18	0,83	50	63	4,1
21	53	17	1,02	103	4	3,8
41	52	17	0,72	66	26	2,4
49	79	22	0,68	130	52	4,2
19	91	20	0,79	85	30	2,3
36	52	13	0,51	75	6	3,1
38	67	15	0,66	110	27	2,4
25	65	35	0,81	138	53	3,5
37	63	15	0,73	69	21	6,1
34	42	20	0,84	112	27	3,7
28	126	24	0,64	85	26	3,8
VR	46-116	15-37	0,55-1,02	50-170	5-55	2,6-6,0

Resultados

Valores de referência – Sexo masculino

Idade (anos)	FAL (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Fe (µg/dL)	GGT (U/L)	Ácido úrico (mg/dL)
34	50	16	1,06	117	24	4,7
21	83	18	0,83	78	28	4,5
22	88	23	1,13	93	52	3,9
21	88	24	0,81	142	27	6,6
25	103	21	0,84	111	41	5,7
20	101	23	0,71	67	59	3,1
24	88	19	0,89	99	24	4,8
32	58	26	1,4	85	41	5,1
26	90	23	1,16	66	26	4,4
32	72	19	1,08	114	29	4,7
30	83	26	1,2	101	35	4,6
31	62	22	0,83	114	48	4,5
29	104	15	1,11	97	25	5,4
35	59	15	1,03	56	31	4,8
58	80	18	1,06	76	106	5,7
54	82	26	1,03	93	47	7
59	84	22	0,9	93	50	7,3
24	66	37	1,06	83	27	5,7
48	87	18	0,93	56	52	5,5
42	93	18	1,21	91	33	6,4
VR	46-116	15-37	0,7-1,3	65-175	15-85	3,5-7,2

Discussão

ÁCIDO ÚRICO

Estudo Europeu de Hipertensão e Proteção Cardiovascular mostrou que 9156 (7%) pacientes saudáveis apresentavam níveis séricos de ácido úrico igual ou inferiores a 3 mg/dL, principalmente mulheres .

METABOLISMO DO CÁLCIO

Doenças que afetam o metabolismo do cálcio estão geralmente associadas a alterações na fosfatase alcalina e no fósforo.

CÁLCIO

Avaliar se os indivíduos com cálcio elevado apresentam hiperparatireoidismo.

LITERATURA

VR validado segundo Burtis et al. (2008) e Naoum et al. (2007).

FOSFATASE ALCALINA

VR validado para o sexo feminino segundo Burtis et al. (2008) e University Of Rochester Medical Center (2019).

Intervalos de Referência

2. Dados da literatura: IR pediátricos e geriátricos

Estratificação dos IR.



Table 1. Age-specific and sex-specific pediatric reference intervals for 40 biochemical markers.^a

Analyte	Age	Chemistry									
		Female reference interval					Male reference interval				
		Lower limit	Upper limit	No. of samples	Lower limit confidence interval	Upper limit confidence interval	Lower limit	Upper limit	No. of samples	Lower limit confidence interval	Upper limit confidence interval
Bilirubin (direct), mg/dL	0 to 14 days	0.33	0.71	171	0.29–0.36	0.67–0.73	0.33	0.71	171	0.29–0.36	0.67–0.73
	15 days to <1 year	0.05	0.30	108	0.04–0.06	0.27–0.33	0.05	0.30	108	0.04–0.06	0.27–0.33
	1 to <9 years	0.05	0.20	281	0.05–0.05	0.18–0.20	0.05	0.20	281	0.05–0.05	0.18–0.20
	9 to <13 years	0.05	0.29	181	0.05–0.10	0.28–0.33	0.05	0.29	181	0.05–0.10	0.28–0.33
	13 to <19 years	<u>0.10</u>	<u>0.39</u>	<u>177</u>	<u>0.05–0.11</u>	<u>0.34–0.46</u>	<u>0.11</u>	<u>0.42</u>	<u>170</u>	<u>0.10–0.12</u>	<u>0.40–0.43</u>
Bilirubin (total), mg/dL	0 to 14 days	0.19	16.60	166	0.10–0.29	15.04–17.88	0.19	16.60	166	0.10–0.29	15.04–17.88
	15 days to <1 year	0.05	0.68	245	0.05–0.10	0.63–0.73	0.05	0.68	245	0.05–0.10	0.63–0.73
	1 to <9 years	0.05	0.40	270	0.05–0.05	0.36–0.42	0.05	0.40	270	0.05–0.05	0.36–0.42
	9 to <12 years	0.05	0.55	135	0.05–0.10	0.50–0.61	0.05	0.55	135	0.05–0.10	0.50–0.61
	12 to <15 years	0.10	0.70	161	0.05–0.10	0.64–0.81	0.10	0.70	161	0.05–0.10	0.64–0.81
Calcium, mg/dL	15 to <19 years	0.10	0.84	219	0.05–0.11	0.81–0.89	0.10	0.84	219	0.05–0.11	0.81–0.89
	0 to <1 year	8.5	11.0	259	8.4–8.7	10.8–11.1	8.5	11.0	259	8.4–8.7	10.8–11.1
	1 to <19 years	9.2	10.5	897	9.1–9.2	10.5–10.6	9.2	10.5	897	9.1–9.2	10.5–10.6
CO ₂ , mmol/L	0 to 14 days	5	20	178	5–5	19–25	5	20	178	5–5	19–25
	15 days to <1 year	10	24	147	9–11	22–25	10	24	147	9–11	22–25
	1 to <5 years	14	24	146	13–16	23–25	14	24	146	13–16	23–25
	5 to <15 years	17	26	488	17–17	26–27	17	26	488	17–17	26–27
	15 to <19 years	<u>17</u>	<u>26</u>	<u>122</u>	<u>16–18</u>	<u>25–27</u>	<u>18</u>	<u>28</u>	<u>121</u>	<u>17–19</u>	<u>27–29</u>
Creatinine (enzymatic), mg/dL	0 to 14 days	0.32	0.92	147	0.27–0.39	0.90–0.98	0.32	0.92	147	0.27–0.39	0.90–0.98
	15 days to <2 years	0.10	0.36	168	0.10–0.12	0.35–0.38	0.10	0.36	168	0.10–0.12	0.35–0.38
	2 to <5 years	0.20	0.43	155	0.18–0.22	0.41–0.45	0.20	0.43	155	0.18–0.22	0.41–0.45
	5 to <12 years	0.31	0.61	321	0.29–0.32	0.60–0.62	0.31	0.61	321	0.29–0.32	0.60–0.62
	12 to <15 years	0.45	0.81	183	0.38–0.46	0.76–0.85	0.45	0.81	183	0.38–0.46	0.76–0.85
	15 to <19 years	<u>0.49</u>	<u>0.84</u>	<u>161</u>	<u>0.47–0.51</u>	<u>0.81–0.88</u>	<u>0.62</u>	<u>1.08</u>	<u>151</u>	<u>0.53–0.65</u>	<u>1.06–1.11</u>

Continued on page 88

Intervalos de Referência

2. Dados da literatura:

Glicose, proteína C-reativa e lipídeos possuem IR provenientes de estudos clínicos que utilizam grande amostragem associados ao seguimento clínico dos indivíduos por variados períodos de tempo.

DIRETRIZES

Base CLÍNICA e não apenas distribuição dos valores obtidos!

Intervalos de Referência

3. Método Indireto

Data Mining ou Big Data é o processo de utilização de dados gerados anteriormente para identificar novas informações.

Os resultados das amostras coletadas para fins de rotina, triagem, diagnóstico ou monitoramento são usados para determinar os intervalos de referência.

Ou seja, a população de referência é aquela da qual um paciente está realmente sendo diferenciado, ou seja, uma pessoa que se apresenta em um serviço de saúde que não tem a condição em questão é comparada com a pessoa que procura atendimento médico para essa condição

Intervalos de Referência

3. Método Indireto - Data Mining

Vantagens potenciais importantes em comparação com os métodos diretos.

- São mais rápidos, baratos e não envolvem transtornos, desconfortos ou riscos para o paciente.
- Utilizam as mesmas técnicas pré-analíticas e analíticas utilizadas para o manejo do paciente e podem fornecer números muito grandes para avaliação.

As limitações incluem possíveis efeitos de subpopulações doentes no intervalo derivado.

Intervalos de Referência

3. Método Indireto - Data Mining

A seleção dos indivíduos/resultados é realizada por ferramentas estatísticas que resolvem a distribuição de interesse da população mista.

- Fonte - paciente internado vs. paciente ambulatorial
- N^o - Quanto mais distorcida a distribuição maior o número de resultados necessários. Mínimo >400, ideal entre 1000 e 10000.
- Garantia de mesmo método com mesmo desempenho analítico durante todo o período de coleta de resultados.

Intervalos de Referência

3. Método Indireto - Data Mining

A seleção dos indivíduos/resultados é realizada por ferramentas estatísticas que resolvem a distribuição de interesse da população mista.

- A necessidade de particionamento pode ser avaliada se a proporção do desvio padrão (maior sobre menor) entre os subgrupos excede 1,5
- ou quando mais de 4,1% de um subgrupo estiver fora do IR.
- Limitar os resultados a um único resultado por paciente

Intervalos de Referência

3. Método Indireto - Data Mining

A seleção dos indivíduos/resultados é realizada por ferramentas estatísticas que resolvem a distribuição de interesse da população mista.

- Usualmente utiliza-se método gráfico (histograma) para identificar uma distribuição gaussiana no meio de outros dados ou considera-se que a parte “central” da distribuição de todos os dados representa a população não doente (“saudável”).

Intervalos de Referência

3. Método Indireto - Data Mining

A seleção dos indivíduos/resultados é realizada por ferramentas estatísticas que resolvem a distribuição de interesse da população mista.

- Muitos hormônios sanguíneos (por exemplo, TSH, LH, insulina) e enzimas sanguíneas (por exemplo, CK, ALP) são inerentemente distorcidos e a transformação logarítmica é frequentemente aplicada.
- De primordial importância é a compreensão da fisiopatologia do mensurando para estar ciente dos fatores de confusão e de como o intervalo de referência pode ser usado na prática.

Quality in post-analytical phase: Indirect reference intervals for erythrocyte parameters of neonates.

Greco DS, Paulescu E.

University of Medicine and Pharmacy "Victor Babes" Timisoara, Biochemistry and Pharmacology Department, 2, Eftimie Murgu Square, 300041 Timisoara, Romania.

Abstract

OBJECTIVES: This study aims to gain an estimation of the reference intervals for erythrocyte parameters of neonates in the venous blood, in their first day of life, aiming to achieve quality assurance in post-analytical phase according to the requirement of the ISO standard 15189:2007: Medical laboratories-particular requirements for quality and competence.

DESIGN AND METHODS: The study was performed on a group of 845 subjects selected from the laboratory database. The blood test was performed with the Nihon Celltac F automatic hematology analyzer. In order to find the reference interval, the Hoffmann indirect method was used to process the study group.

RESULTS: The results give the reference intervals for red blood cell (RBC= $3.45-5.26 \times 10^{(6)}/\mu\text{L}$), hemoglobin (HGB=12.5-19.48g/dL), hematocrit (HCT=37.18-55.65%), mean cell volume (MCV=99.63-111.92fL), mean corpuscular hemoglobin (MCH=33.55-39.28pg) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC=32.33-36.23g/dL), along with the corresponding confidence intervals.

CONCLUSIONS: Neonates are a special category of population to which the application of the direct method for determining the reference intervals is difficult and raises ethical issues. Thus, the indirect method is a reasonable alternative. The reported approach is easy to apply and accessible to any laboratory.

Conclusões

Referências

AARSAND AK; RORAAS T; BARTLETT WA; et al. Harmonization initiatives in the generation, reporting and application of biological variation data. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Biological Variation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** [S.l.], v. 56, n. 10, p.1629-1636, 25 set. 2018.

ARDERIU, XF. Intervalos de referencia biológicos: Estimación, adopción y validación de intervalos de referencia. **Noticonaquic**, San Pedro Cholula, p.1-10, 2011. Disponível em: <http://www.ifcc.org/media/215857/Intervalos%20de%20referencia%20biol%C3%B3gicos%20DIV.pdf>.

AYTEKIN, M; EMERK K. Accurate reference intervals are required for accurate diagnosis and monitoring of patients. **Electronic Journal of IFCC**, 2008, 19 (2).

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition CLSI document C28-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008

FERREIRA, CES; ANDRIOLO A. Intervalos de referência no laboratório clínico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, p.11-15, fev. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v44n1/a04v44n1.pdf>.

HOROWITZ, GL. Reference intervals: Practical aspects. **Electronic Journal of IFCC**. Boston, p. 95-105. set. 2008. Disponível em: <http://www.ifcc.org/media/476878/ejifcc2008vol19no2pp095-105.pdf>

OZARDA, Y; HIGGINS, V; ADELI, K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine**, [S.l.], p.30-37, 5 may 2018.