

Primjena biološke varijacije u laboratorijskoj hematologiji i koagulaciji

Ida Taradi, mag. med. biochem.

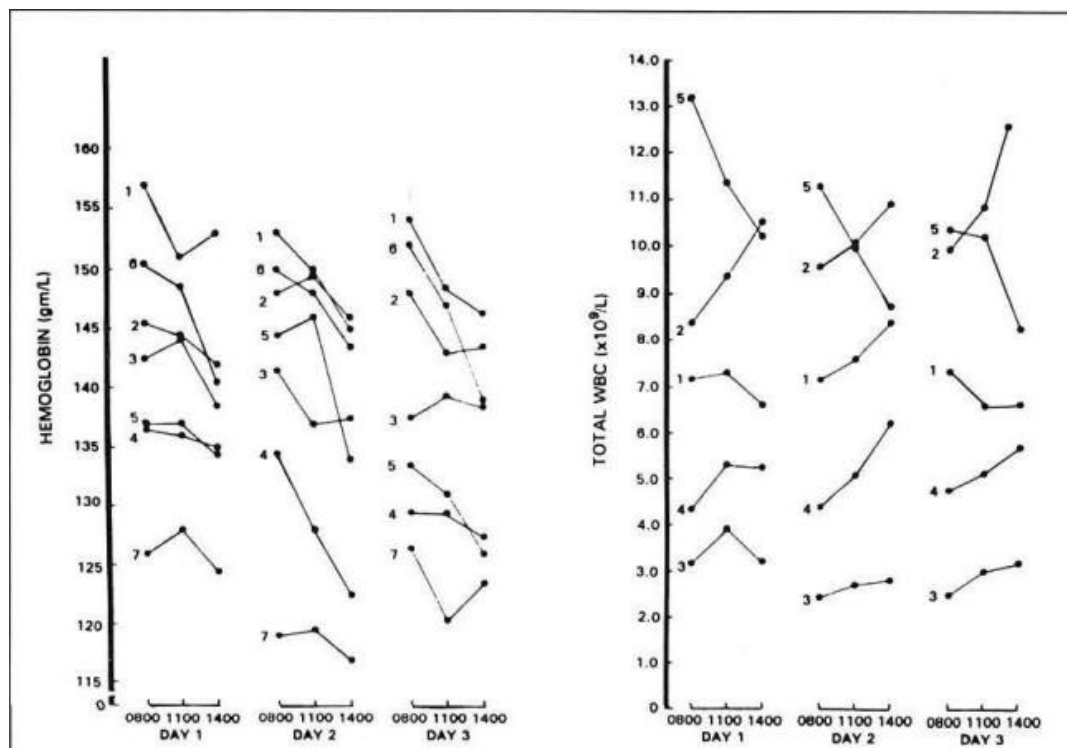
Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur

Referentni centar Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za izradu i primjenu bioloških referentnih intervala medicinskobiokemijskih pretraga



Biološka varijacija

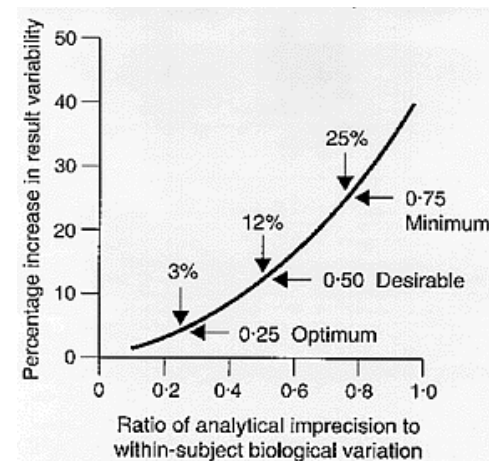
- * Intraindividualna i interindividualna
- * Najvažnija za:
 - * postavljanje **ciljeva analitičke kvalitete**
 - * **ispravnu interpretaciju** rezultata laboratorijskih pretraga



Preuzeto: Brigden et al. Discrepant laboratory results and intraindividual biologic variation. B. C. Med. J. 1992. Vol34. 295-299.

Postavljanje ciljeva analitičke kvalitete

- * **EFLM** → ciljevi analitičke kvalitete 2014. g. na **1. EFLM strateškoj konferenciji**:
 - * **Model 1** - utjecaj analitičke izvedbe na klinički ishod
 - * **Model 2** - komponente biološke varijacije analita
 - * **Model 3** - „state of the art“ mjerenju
- * Uključuje postavljanje ciljeva za **nepreciznost** mjerenja, **dozvoljeno odstupanje** (*bias*) i **dozvoljenu ukupnu analitičku pogrešku (TE)** iskazanu na tri razine: poželjna, optimalna i minimalna



EFLM

EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY
AND LABORATORY MEDICINE

Primjena RI

- * **Indeks individualnost (II)** → najčešće omjer **CV_I** i **CV_G**
 - * **$II > 1,4$** → RI se mogu primjenjivati
 - * **$II < 0,6$** → RI nisu korisni (VEĆINA ANALITA) → **RCV**
- Idealno izrada **individualnih RI** za svakog pojedinca

BV u laboratorijskoj hematologiji

- * KKS → jedna od **najčešće** zadavanih pretraga → **zlatni standard** za dijagnozu anemije
- * Za postavljanje analitičkih ciljeva kvalitete:
 - * **Model 1** za određivanje: konc. hemoglobina, broja trombocita i neutrofilnih granulocita;
 - * **Model 2** za ostale hematološke pretrage

Korištenje modela 1

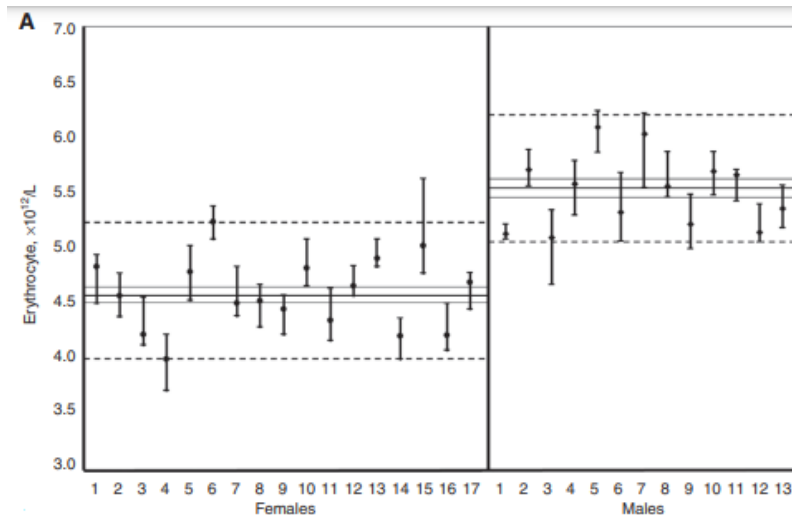
- * Definirane **granice odluke za postavljanje dijagnoze:**
 - * **anemije** (130 g/L u muškaraca, 120 g/L u žena, 110 g/L u djece),
 - * za obavljanje **transfuzije krvi** (70–80 g/L - ovisi o stabilnosti stanja bolesnika),
 - * za **povišenu koncentraciju hemoglobina** (160 g/L u žena i 180 g/L u muškaraca).

Korištenje modela 1

- * **Transfuzija trombocita** → broj trombocita $<10 \times 10^9/L$ u klinički stabilnih bolesnika (granične vrijednosti: $20 \times 10^9/L$ / $50 \times 10^9/L$ i $100 \times 10^9/L$)
- * **Broj neutrofilnih granulocita** $\leq 0,5 \times 10^9/L$ → veliki rizik od ozbiljnih infekcija

BV u laboratorijskoj hematologiji

- * 2019. godine → metaanaliza → 32 istraživanja → u **EFLM bazi podataka**
- * **Niži koeficijenti biološke varijacije** u odnosu na dosadašnju on-line bazu → **stroži** kriteriji za analitičke ciljeve kvalitete i RCV
- * Korištenje **interindividualne** BV po spolovima, dok kod **intraindividualne** nije bilo statistički značajne razlike (osim za broj leukocita, monocita, eozinofila i neutrofila)



Preuzeto: Coşkun A et al. Within-subject and between-subject biological variation estimates of 21 hematological parameters in 30 healthy subjects. Clin Chem Lab Med. 2018; 56(8):1309-1318.

Posebности u laboratorijskoj hematologiji

Tehnološki napredak + automatizacija

```
graph TD; A[Tehnološki napredak + automatizacija] --> B[Hematološki analizatori nove generacije]; B --> C[veća analitička osjetljivost]; B --> D[veći mjerni raspon]; B --> E[novi pokazatelji leukocitne, eritrocitne i trombocitne loze];
```

Hematološki analizatori nove generacije

veća
analitička
osjetljivost

veći
mjerni
raspon

novi pokazatelji
leukocitne,
eritrocitne i
trombocitne
loze

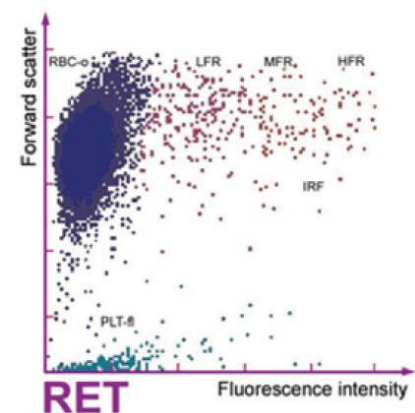
Novi hematološki pokazatelji

- * Za većinu novih pokazatelja podaci o biološkoj varijaciji **nisu dostupni** → uz nedostatak standardizacije, harmonizacije i usporedivosti zbog metodoloških razlika, kao i nedostupnost UKK i/ili VKK → **ograničena klinička primjena**
- * Za neke su dostupni podaci o biološkoj varijaciji → za određivanje **ciljeva analitičke kvalitete**, određivanje **značajnosti promjena između različitih mjerenja** i **utvrđivanje stupnja primjenjivosti RI**

Eritrocitni parametri

Analit	CV _I (%)	CV _G (%)	TE (%)	II
Erc, x10 ¹² /L	2,80	6,29	3,9	0,45
Hb, g/L	2,71	6,07	3,8	0,45
Htc, %	2,71	5,45	3,9	0,50
MCH, pg	0,85	4,30	1,3	0,20
MCHC, g/L	0,95	1,49	1,3	0,64
MCV, fL	0,75	3,78	1,6	0,20
RDW-SD, fL	1,51	4,75	2,6	0,32
Rtc, x10 ¹² /L	9,74	27,11	15,2	0,36
RET-H _e , pg	1,92	3,38	2,4	0,57

- * CV_I < 3% (osim retikulocita)
- * Za **MCV, MCH i MCHC** su CV_I **izrazito niski** → teško postići takve ciljeve analitičke kvalitete s dostupnim tehnologijama → **alternativni pristup** (npr. korištenje minimalnih ciljeva ili model 1)
- * II < 0.7 → **RCV**
- * Ž niže vrijednosti u odnosu na M



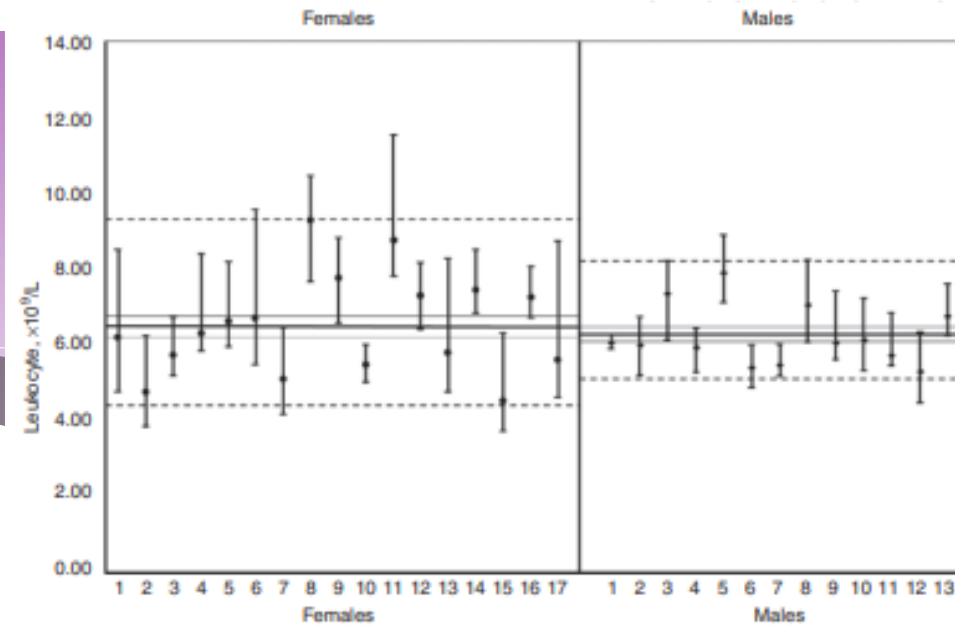
Novi pokazatelji eritrocitne loze

- * Udio hipo- i hiperkromnih, mikro- i makrocitnih te fragmentiranih eritrocita
- * Udio retikulocita niske, srednje i visoke fluorescencije (LFR, MFR i HFR)
- * Udio nezrelih retikulocita (IRF)
- * Indeks stvaranja retikulocita (RPI)
- * Retikulocitni ekvivalent hemoglobina (RTC-H_e)

→ BV za udio hipo- i hiperkromnih eritrocita, HFR i FRC **nije bilo moguće izračunati** (u zdravih vrijednosti blizu nule)

Analit	CV _I (%)	CV _G (%)	II
Mikrociti, %	10,9	66,6	0,2
Makrociti, % (M)	1,91	8,6	0,2
Makrociti, % (Ž)	2,9	8,1	0,4
Rtc, x10 ¹² /L (M)	8,0	24,5	0,3
Rtc, x10 ¹² /L (Ž)	7,6	33,5	0,2
IRF, %	16,4	32,8	0,5
LFR, %	1,5	3,0	0,5
MFR, %	15,4	30,7	0,5
RET-H _e , pg (M)	1,0	2,9	0,3
RET-H _e , pg (Ž)	0,9	5,1	0,2
RPI (M)	10,4	30,7	0,3
RPI (Ž)	11,4	35,9	0,3

Leukocitni parametri



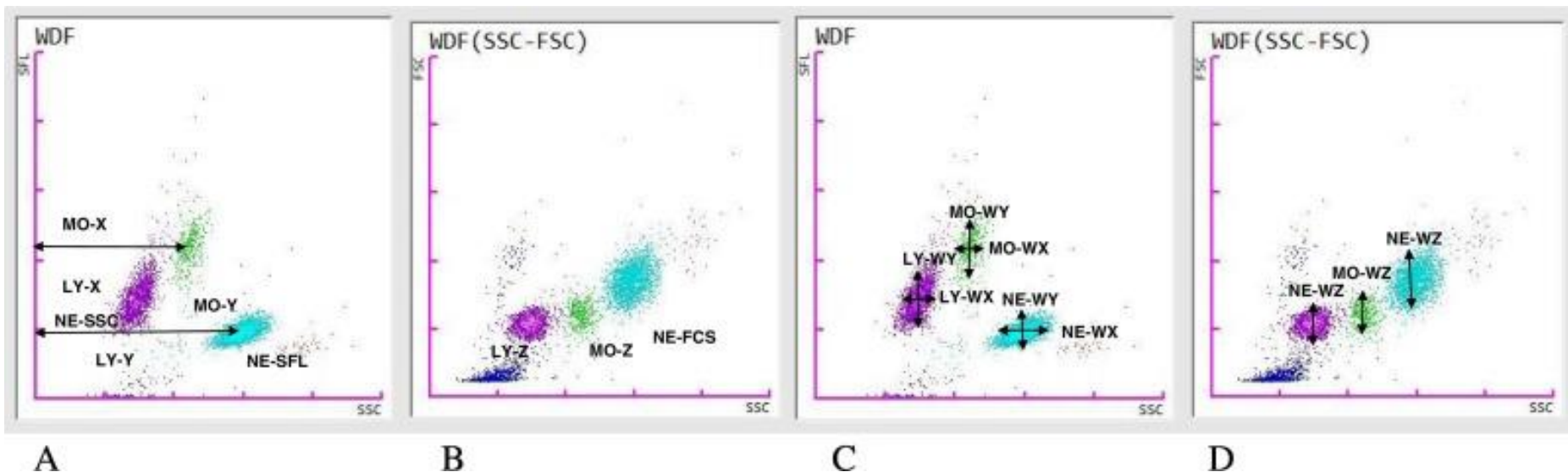
- * Analiti čije su vrijednosti **blizu donje granice njihove kvantifikacije** (npr. eozinofili i bazofili) → nesigurnost mjerenja veća nego u višim koncentracijskim područjima → veći analitički koeficijent varijacije → **veći CV_I i CV_G**

- * $II < 0.7 \rightarrow RCV$

Analit	CV_I (%)	CV_G (%)	TE (%)	II
Leukociti, $\times 10^9/L$	10,01	16,48	13,8	0,61
Limfociti, $\times 10^9/L$	10,13	23,87	15,2	0,42
Monociti, $\times 10^9/L$	12,85	18,30	17,4	0,70
Neutrofili, $\times 10^9/L$	13,61	21,16	18,4	0,64
Eozinofili, $\times 10^9/L$	14,38	64,25	29,1	0,22
Bazofili, $\times 10^9/L$	11,34	25,07	17,5	0,45

Novi pokazatelji leukocitne loze

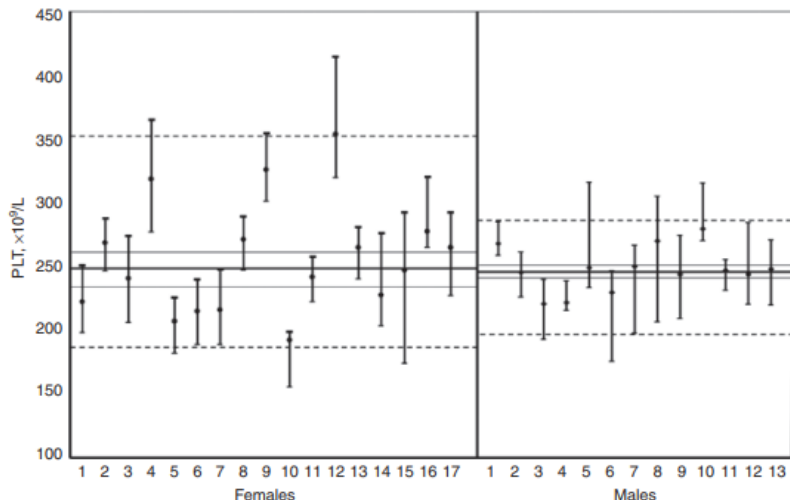
- * Iz različitih dijagrama rasprišenja („scattergrama”)
 - * Širina raspodjele neutrofila, limfocita i monocita
 - * Limfociti visoke fluorescencije, atipični limfociti
 - * Nezreli granulociti



Preuzeto: Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, Manenti B, Pacioni A, Ceriotti F, Ottomano C, Lippi G. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. Clin Chim Acta. 2017; 147-156.

Trombocitni parametri

Analit	CV _I (%)	CV _G (%)	TE (%)	II
Trc, x10 ⁹ /L	7,10	16,17	11,3	0,44
PDW, fL	3,43	12,31	6,4	0,28
PCT, %	5,94	13,33	9,0	0,45
MPV, fL	2,02	6,96	3,8	0,29
P-LCR, %	5,70	20,42	11,1	0,28

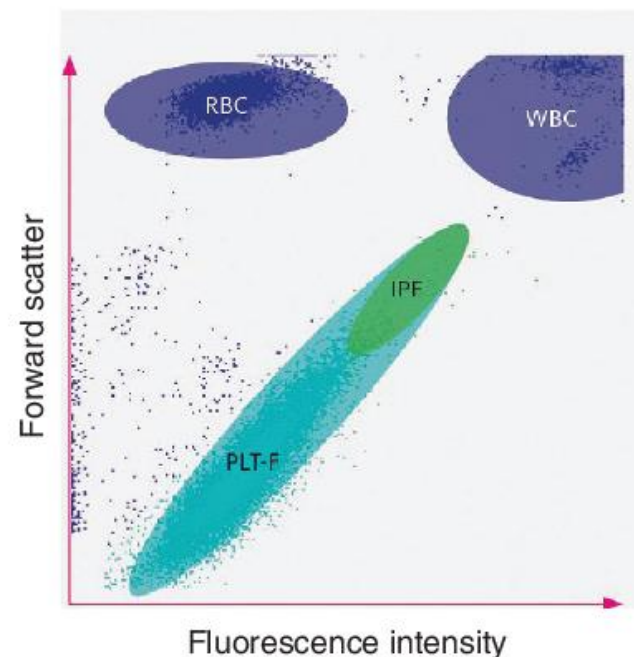
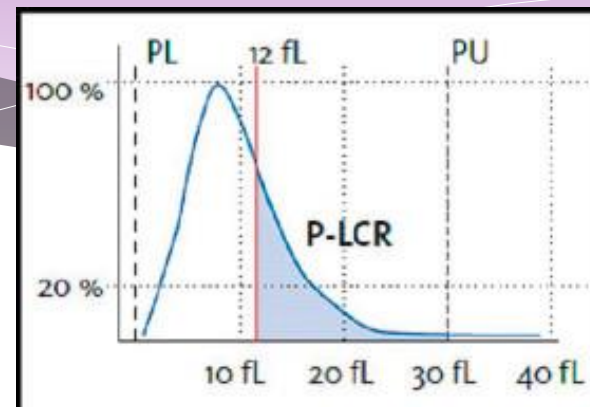


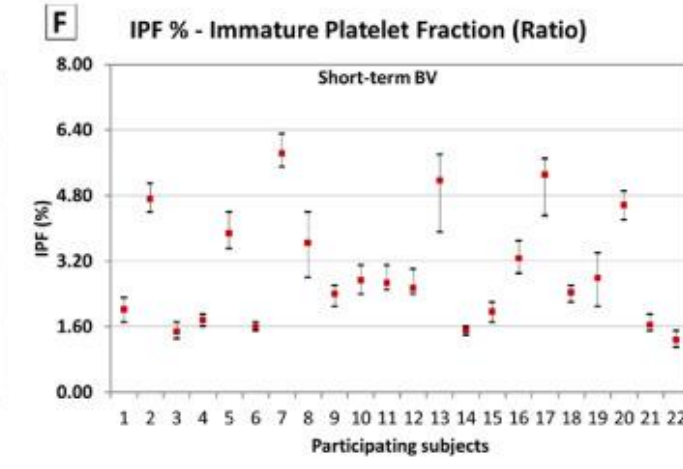
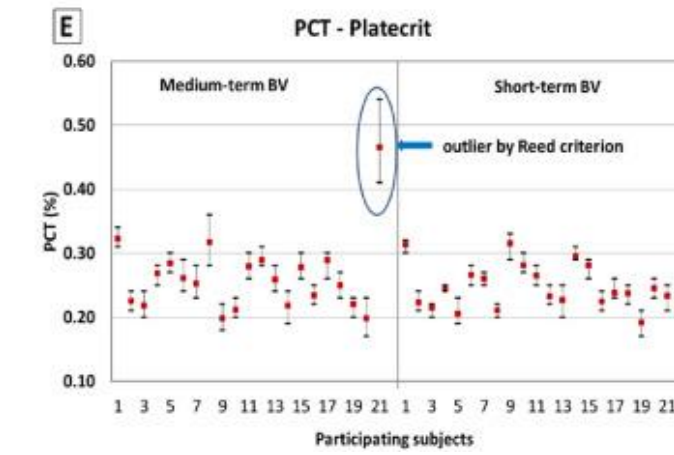
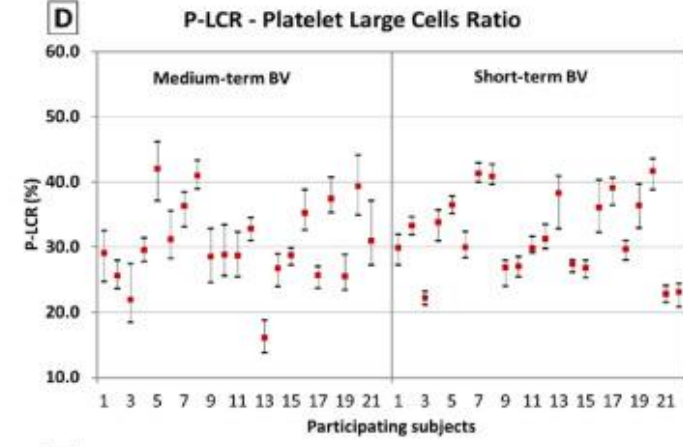
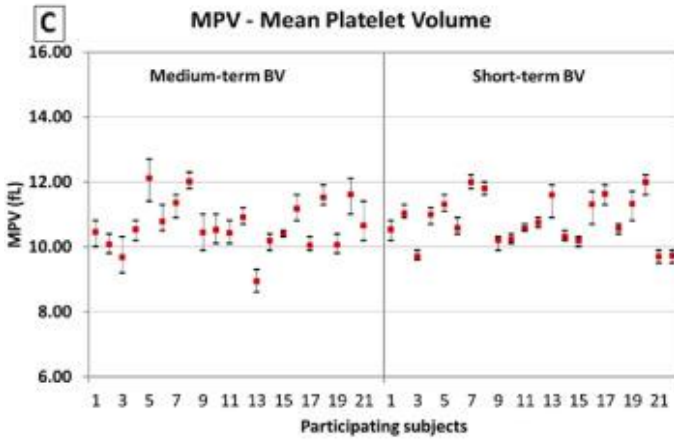
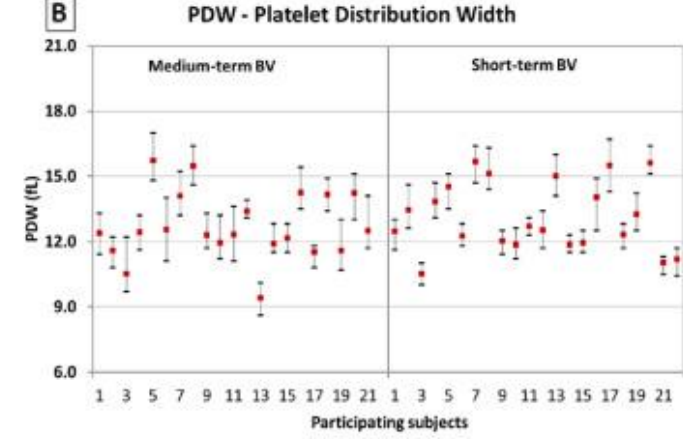
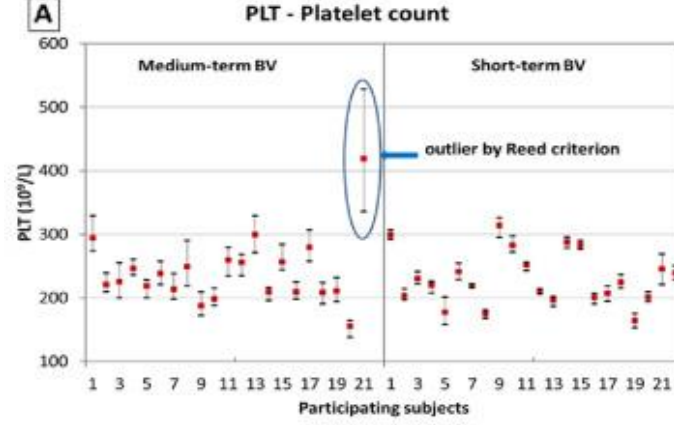
- * Nije uočena razlika u BV između spolova (CV_G niži u M)
- * Životni vijek trombocita iznosi 7-10 dana → korištenje podataka o BV tijekom kraćeg perioda za izračun RCV i analitičkih ciljeva kvalitete
- * $II < 0.6 \rightarrow \text{RCV}$

Novi pokazatelji trombocitne loze

- * širina raspodjele trombocita po volumenu (PDW)
- * srednji volumen trombocita (MPV)
- * udio velikih trombocita (P-LCR)
- * trombokrit (PCT)

- * udio nezrelih trombocita (IPF)
- * pokazatelji aktivacije trombocita (srednja komponenta trombocita (MPC), srednja masa trombocita (MPM))

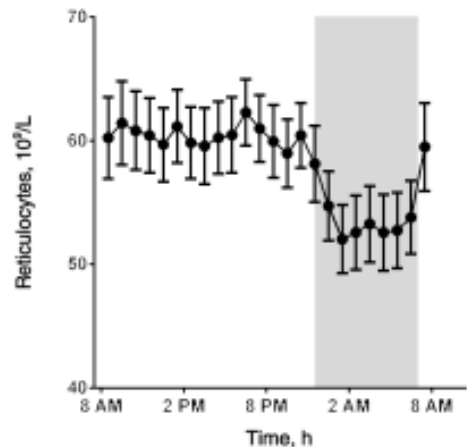
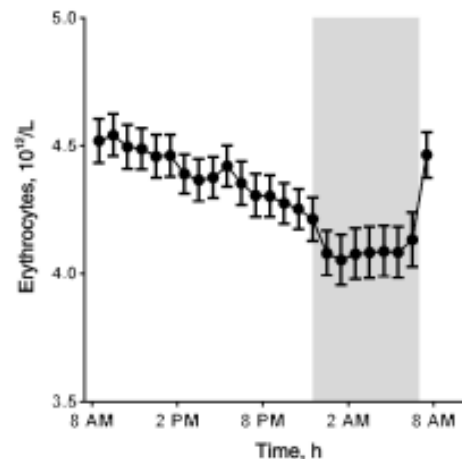
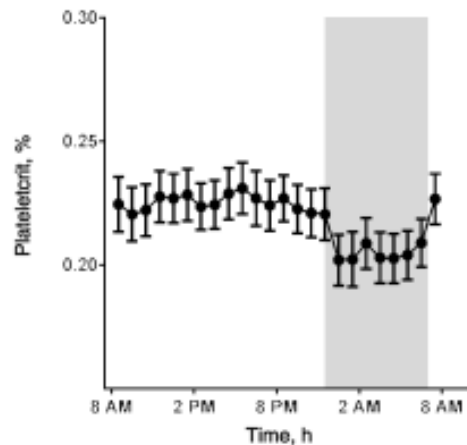
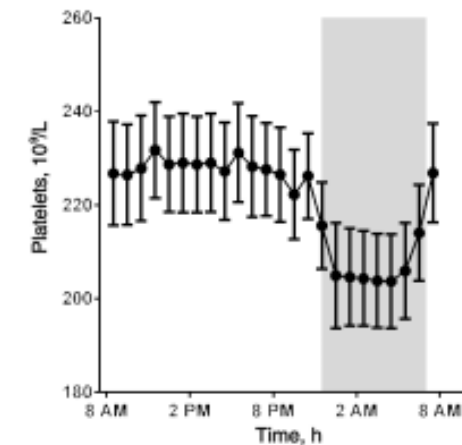
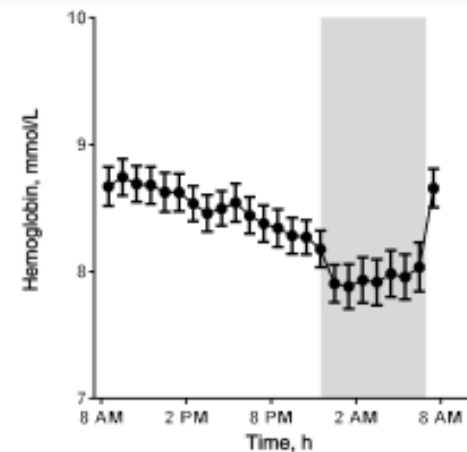
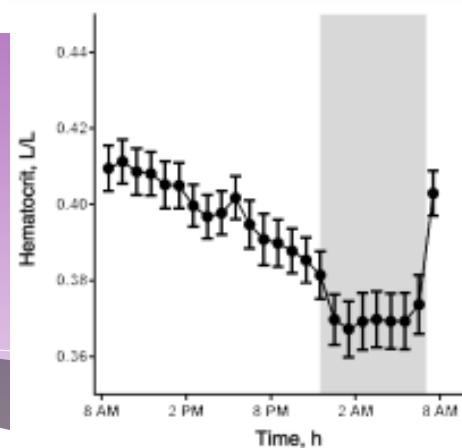




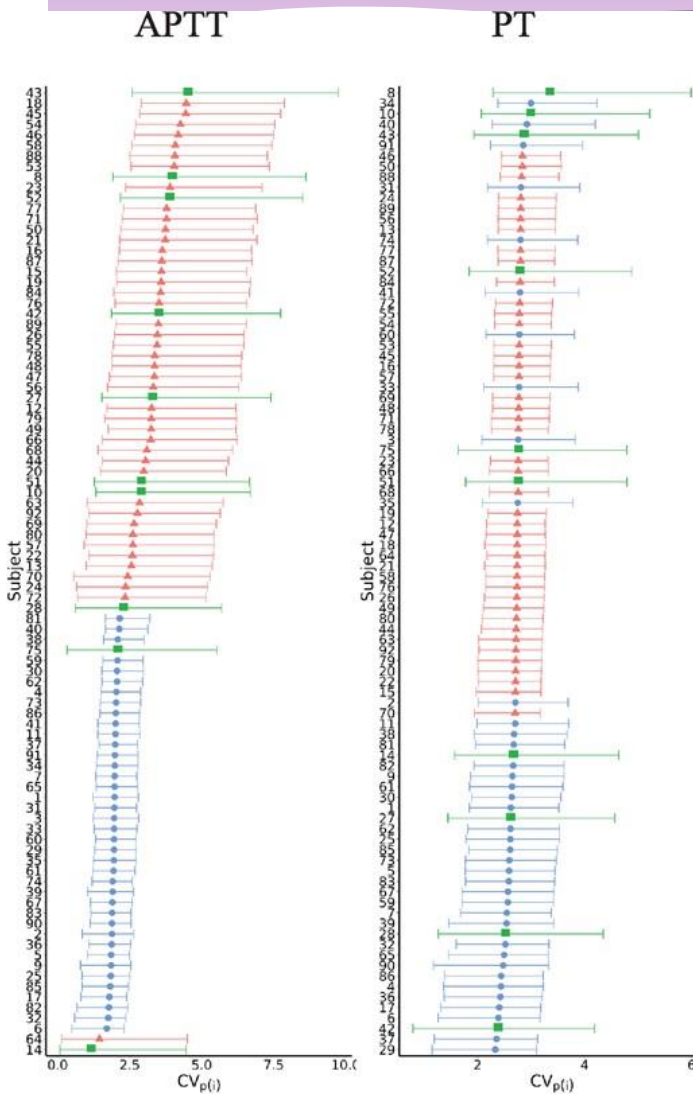
Primjer BV
novih
pokazatelja
trombocitne
loze

Varijacija tijekom 24h

- * **ovisna** o položaju tijela 7 analita (hb, htc, erc, rtc, trc i pct)
- * **neovisna** o položaju tijela 6 analita (leukociti, neutrofili, limfociti, eozinofili, bazofili, monociti) → mogući utjecaj kortizola



Biološka varijacija u laboratorijskoj koagulaciji



- * Značajna uloga kod tromboembolizma, krvarenja, praćenja antikoagulantne terapije, procjene jetrene funkcije, ...
- * Za neke **osnovne** koagulacijske pretrage s dobro definiranom kliničkom primjenom (npr. PV za praćenje dikumarinske terapije ili APTV za praćenje terapije heparinom) → **model 2**

Problemi

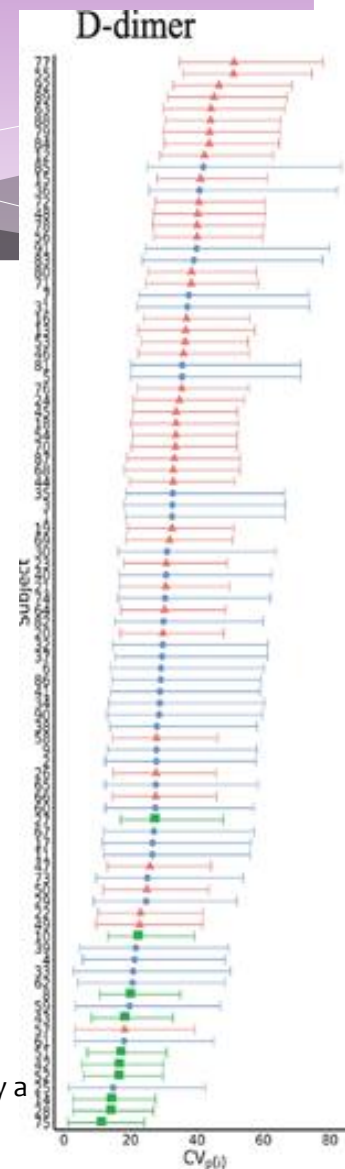
- * Optimalni pristup osiguranju analitičkih ciljeva kvalitete za koagulacijske pretrage je **u izradi** → brojni komercijalno dostupni reagensi (**različita osjetljivost** na različite koagulacijske faktore)
- * Ranija istraživanja biološke varijacije su upitne kvalitete → upitna i pouzdanost dostupnih koeficijenta biološke varijacije
- * Značajno **odstupanje rezultata od normalne razdiobe podataka** → nije prikladno koristiti statističku obradu preporučenu od EFLM radne grupe za BV



Primjer - određivanje konc. D-dimera

- * Za isključenje venskog tromboembolizma i plućne embolije
- * Izrazita **heterogenost** razdiobe rezultata u zdravih osoba (koncentracije blizu granice detekcije i u području visokog analitičkog koeficijenta varijacije)

→ preporučeno koristiti **model 1** temeljen na kliničkom ishodu za postavljanje analitičkih ciljeva kvalitete



Analit	CV _I (%)	CV _G (%)	TE (%)	II
D-dimer , ng/mL FEU (svi)	29	35,6	287,47	0,81

Preuzeto: Aarsand AK et al. EuBIVAS: Biological Variation Data for Coagulation Markers Estimated by a Bayesian Model. Clin Chem. 2021;76(9):1259-1270.

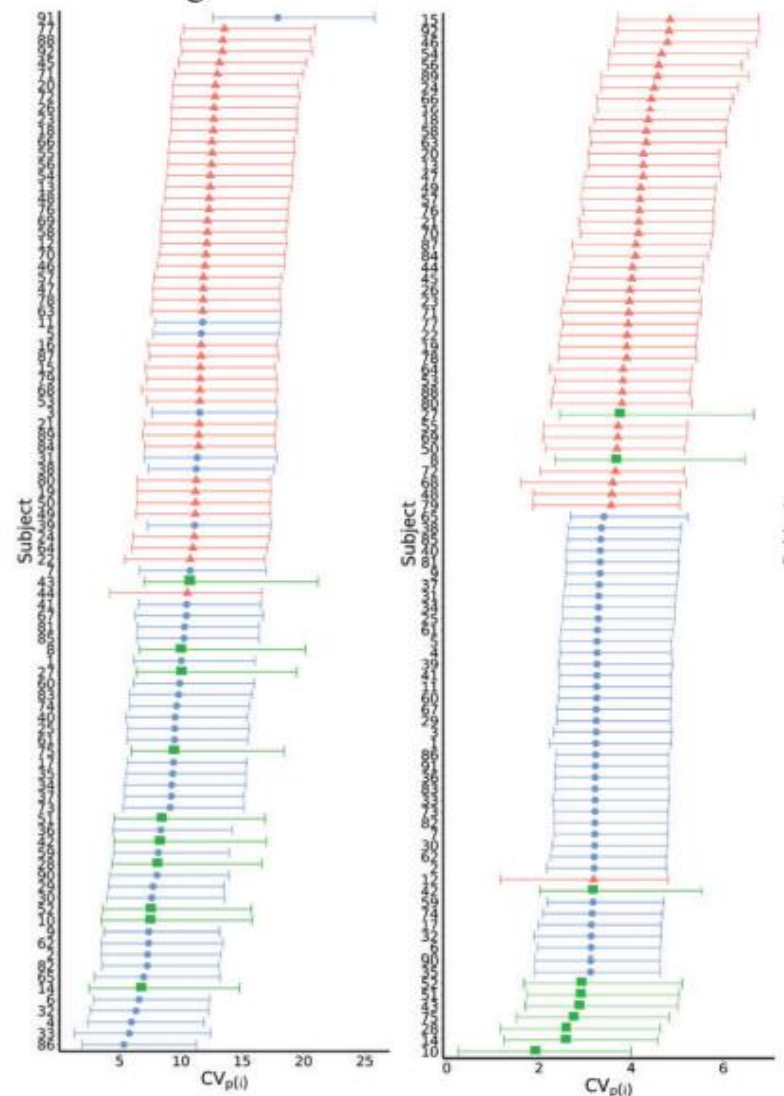
Biološka varijacija u laboratorijskoj koagulaciji

- * **EFLM** radna grupa za BV na 92 zdrava ispitanika 2021. godine
- * APTV, PV, fibrinogen, D-dimer, antitrombin, protein C, slobodni protein S i faktor VIII → **visoka individualnost** → **RCV** za procjenu klinički značajne razlike
- * Značajne razlike **CV₁** za APTV, protein C i slobodni protein S između spolova → računati **RCV za svaki spol**
- * **CV₁** u žena viši → utjecaj hormona tijekom menstrualnog ciklusa

APTV, PV, fibrinogen i antitrombin

Fibrinogen

AT



Analit	CV _I (%)	CV _G (%)	TE (%)	II
APTV, s (M)	1,9	6,8	7,80	0,28
APTV, s (Ž)	3,3	7,4	10,93	0,45
PV, s (svi)	2,6	5,1	6,24	0,51
Fibrinogen, mg/dL (svi)	10,2	17,3	58,83	0,59
AT, % (svi)	3,5	8,1	12,62	0,43

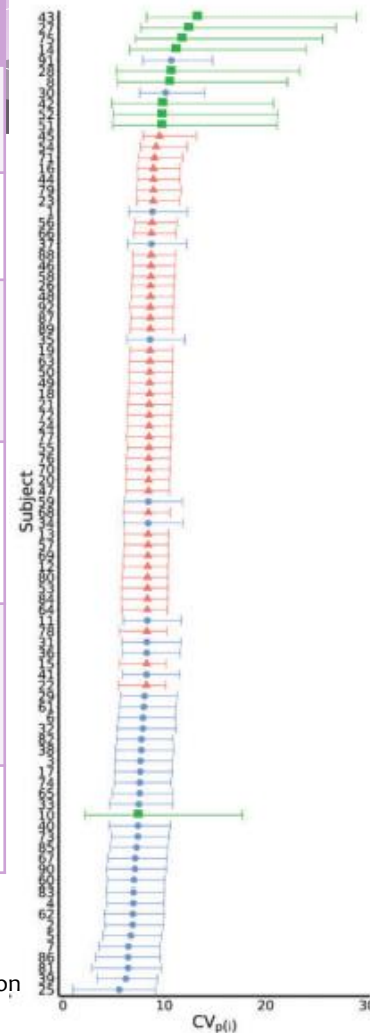
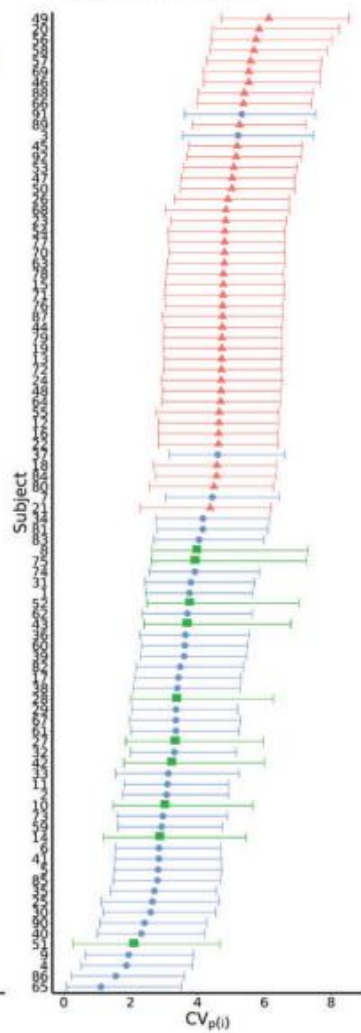
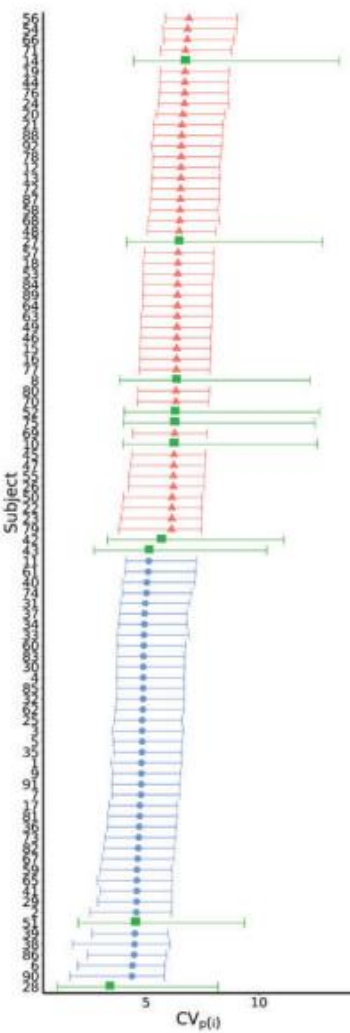
Preuzeto: Aarsand AK et al. EuBIVAS: Biological Variation Data for Coagulation Markers Estimated by a Bayesian Model. Clin Chem. 2021;76(9):1259-1270.

Protein C, slobodni protein S i FVIII

Protein C

Protein S free

FVIII



Analit	CV _I (%)	CV _G (%)	TE (%)	II
Protein C, % (M)	4,6	18,6	49,7	0,3
Protein C, % (Ž)	6,1	19,1	55,3	0,3
Slobodni protein S, % (M)	3,2	16,7	38,8	0,2
Slobodni protein S, % (Ž≤50g)	4,7	18,7	50,4	0,3
Slobodni protein S, % (Ž≥50g)	3,0	23,3	71,5	0,1
Faktor VIII, % (svi)	8,3	23,3	83,3	0,4

Preuzeto: Aarsand AK et al. EuBIVAS: Biological Variation Data for Coagulation Markers Estimated by a Bayesian Model. Clin Chem. 2021;76(9):1259-1270.

Zaključak

- * Najvažnija **primjena BV** je u definiranju ciljeva analitičke kvalitete, izračunu RCV vrijednosti i utvrđivanju stupnja primjenjivosti RI
 - * Budućnost → **korištenje individualnih RI ili RCV**
 - * Hematološke i koagulacijske pretrage čine **veliku grupu** heterogenih analiza → **sve više novih parametara i pretraga**
 - * Potrebno je napraviti **više novih ispitivanja** koeficijenata BV pogotovo za koagulacijske pretrage pomoću definiranog protokola EFLM radne grupe za BV
- za ranije uočavanje klinički značajne promjene analita svake osobe
→ donošenje pravovremene kliničke odluke o daljnjoj skrbi



Hvala na pažnji 😊