

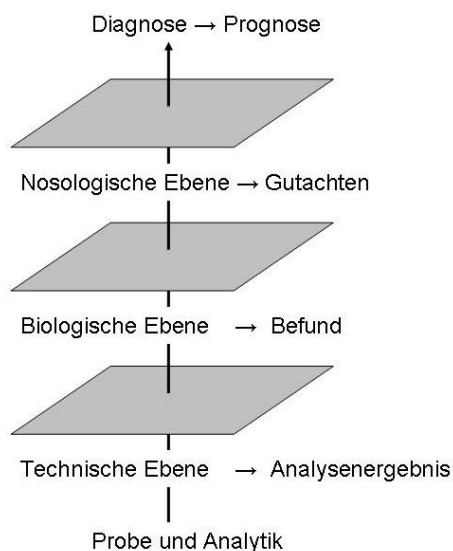
# Normalwerte und Referenzintervalle – zur Transversalbeurteilung in der Labordiagnostik

**Torsten Arndt**

Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH,  
Konrad-Adenauer-Straße 17, 55218 Ingelheim; torsten.arndt@bioscientia.de

## 1. Einleitung

Labordiagnostische Analysen dienen der Verifizierung oder Falsifizierung einer Verdachtsdiagnose, helfen bei der Differentialdiagnose, ermöglichen Prognosen und können die Verlaufskontrolle objektivieren.



Dabei ist ein valides Analyseergebnis zwar Basis einer richtigen Diagnose, reicht aber allein nicht aus, um o. g. Ziele zu erreichen. Hierzu muss es aus der technischen, über die biologische, auf die nosologische Ebene gehoben werden (Abb. 1).

Auf der biologischen Ebene wird das Patientenergebnis mit den für eine entsprechende Kontrollgruppe ermittelten Kontrollwerten verglichen. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als Transversalbeurteilung eines Analyseergebnisses. Während hierfür in der Vergangenheit vor allem sog. Normalwerte und Normbereiche verwendet wurden, sind heute Referenzwerte und Referenzintervalle international akzeptierte und etablierte Bezugssysteme [1-3].

Abb. 1. Die Evolution eines Analyseergebnisses zur Diagnose (Grafik aus [3] modifiziert).

Kenntnisse zu diesen Bezugssystemen sind auch in der Toxikologie erforderlich, weil klinisch-chemische Befunde nicht selten Eingang in Gutachten finden. Als Beispiele seien genannt: die Glukosekonzentration im Plasma und die HbA1C-Konzentration im EDTA-Blut als Diabetesmarker in der Fahreignungsbegutachtung [4,5] und das Kohlenhydrat-defiziente Transferrin im Serum als Marker für chronischen Alkoholmissbrauch [5]. Die vorliegende Arbeit soll in die beiden grundlegenden Transversalbezugssysteme, das Normalwertkonzept und das Referenzwertkonzept einführen.

## 2. Normalwertkonzept – Normalwerte und Normalbereiche

Eine sehr treffende „Definition“ des Normalwertes gibt Gräsbeck in [2]: „Normal values come from young, mostly female technicians, a few medical students and one old professor, all walking about. These values are then used to evaluate data from old, bedridden patients, examined at odd hours of the day“. Nach Stamm [3] ist der „Normalbereich [jener] Konzentrationsbereich, in dem die Analyseergebnisse gesunder «normaler» Personen zu erwarten

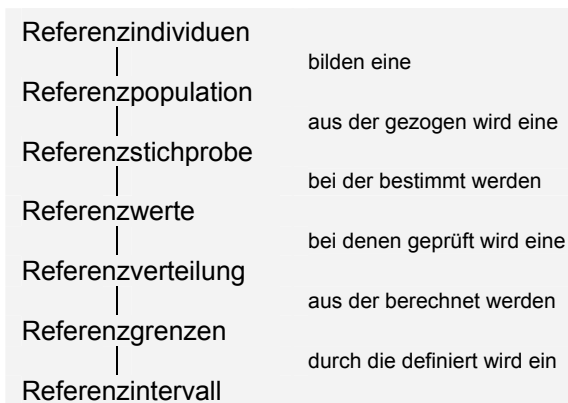
sind“. Dabei wird zumeist die sog. 95. Perzentile der Messwerte eines „Normalkollektivs“ ermittelt. In anderen Worten: 95% der Messwerte eines Normalkollektivs liegen im Normalbereich. Die Grenzen des Normalbereichs bilden die 2,5te und 97,5te Perzentile der Messergebnisse für Analyte, für die erniedrigte und erhöhte Werte diagnostische Bedeutung haben (z. B. Glucose im Serum) bzw. die Nullte und 95te Perzentile für Analyte, für die nur erhöhte Werte diagnostisch relevant sind (z. B. CDT in Serum) [5].

Die Mängel des Normalwertkonzeptes sind vielfältig. Tatsächlich sagen „die meisten Sammlungen von Normalwerten nichts [darüber] aus“ [3], wie sie ermittelt wurden. Die experimentellen Ansätze von Normalwertstudien sind oft zu wenig detailliert beschrieben und statistisch unzureichend ausgewertet: Ein- und Ausschlusskriterien für die Gruppe der „Normalen“ sind nicht oder mangelhaft definiert oder nicht konsequent umgesetzt, präanalytische Bedingungen kaum beachtet, Analysenmethoden nicht ausreichend validiert und untereinander nicht vergleichbar und die Anzahl der Probanden zu niedrig, um zuverlässige statistische Aussagen treffen zu können [3]. Ein klassisches Beispiel hierfür sind altersabhängige Normbereiche von Kindern, die nicht selten, aus nachvollziehbaren Gründen des Patientenschutzes, auf Probandenzahlen im einstelligen Bereich beruhen.

Im Ergebnis liegen für denselben Analyten in derselben Matrix differierende Normalbereiche vor, die die Diagnostik und Longitudinalkontrolle von Patienten erschweren, z. B. bei deren Wechsel von einer stationären in eine ambulante medizinische Einrichtung. Normalbereiche sollen deshalb durch Referenzwerte und Referenzintervalle ersetzt werden [1-3].

### 3. Referenzwertkonzept – Referenzwerte und Referenzintervalle

Das von Gräsbeck und Saris im Jahr 1969 [6] vorgeschlagene und später unter Leitung der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) ausgearbeitete Referenzwertkonzept



wurde in 6 Teilen auf circa 40 DIN A4 Seiten als „Approved Recommendations“ beschrieben [7-12]. Der folgende Beitrag kann deshalb nur in das Referenzwertkonzept einführen, ohne Details zu diskutieren. Dazu sei auf die durchaus lesenswerten IFCC Empfehlungen verwiesen.

Abb. 2. Wichtige Begriffe im Referenzwertkonzept (nach [3,7]).

#### 3.1. Referenzindividuen – Referenzpopulation – Referenzstichprobe

Die Referenzindividuen bilden eine Referenzpopulation, die aus allen hypothetisch möglichen Individuen besteht, die alle Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen. Da diese Individuen und deren Anzahl gewöhnlich unbekannt sind und in einer Studie nicht untersucht werden können, wird aus der Referenzpopulation eine repräsentative Stichprobe gezogen (Abb. 2).

In anderen Worten: In der Versuchsplanung wird eine statistisch aussagekräftige Individuenzahl festgelegt und in der Studie untersucht [3,7]. Um möglichst repräsentative und von Labor zu Labor transferierbare Referenzintervalle zu erhalten, soll die Auswahl der Referenzindivi-

duen („Kontrollpersonen“) anhand klar definierter und gut dokumentierter Ein- und Ausschlusskriterien erfolgen. Eine a priori Selektion ist dabei einer a posteriori Auswertung vorhandener Analysendaten aus großen Patientengruppen vorzuziehen [7].

Die Ein- und Ausschlusskriterien werden abhängig vom Ziel der Studie und ggf. basierend auf früheren Studien definiert. Sie umfassen sog. „unveränderliche, unbeeinflussbare Einflussgrößen“ wie Alter, Geschlecht, Rasse und sog. „veränderliche, beeinflussbare Einflussgrößen“ wie Körpermasse und -größe (zur Feststellung von Übergewicht), Nahrungskarenz, Fitness u. a. [3]. Ausschlusskriterien sind zumeist organische und/oder psychische Grunderkrankungen, Medikamenteneinnahme, Drogen- und Alkoholmissbrauch, Schwangerschaft, exzessive körperliche Aktivität, Nahrungsaufnahme unmittelbar vor Blutabnahme etc. [3,7,8].

Gewöhnlich würde man unter Referenzindividuen gesunde Probanden im Sinn des Wortes verstehen. Dies suggerieren auch die hier nur beispielhaft genannten Ausschlusskriterien. Nach dem Referenzwertkonzept definiert sich der Zustand „gesund“ aber nicht in diesem Sinn, sondern durch das Ziel der Referenzbereichsstudie [8]. Das heißt zum Beispiel, dass eine alkoholabstinente Schwangere als Referenzindividuum in eine Referenzbereichsstudie zur Ermittlung des Referenzintervalls für einen von einer Schwangerschaft unabhängigen Alkoholabstinenzmarker einbezogen werden kann. Es kann auch eine Medikation erlaubt sein, wenn diese nicht unmittelbar oder indirekt den Zielanalyten beeinflusst. Dies muss dann entsprechend begründet und dokumentiert werden.

Von großer Bedeutung für die Validität und damit die Transferierbarkeit eines Referenzintervalls ist die präanalytische Phase. Man fasst darunter gewöhnlich die Patientenvorbereitung, Probennahme und -aufbereitung und den Probentransport zusammen [3]. Nach den IFCC Empfehlungen Teil 3 [9] ist eine Vielzahl von Faktoren zu beachten und möglichst zu standardisieren. Für die Patientenvorbereitung vor der Probennahme: Nahrungsaufnahme (Menge, Zeit), Menge und Art pharmakologisch aktiver Substanzen (Alkohol, Nicotin, Coffein, Pharmaka mit Art, Menge, Einnahmerhythmen), Synchronisation des Tagesablaufes (Wach- und Schlafphasen), körperliche Aktivität (Schwere und Dauer), mentaler Stress. Für die Probennahme: Umweltbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, geografische Höhe), Tageszeit (absolut und relativ zu Nahrungsaufnahme und Schlafperiode), Jahreszeit, Körperlage (liegend, sitzend, stehend), Probenmaterial (Blut arteriell oder venös, Urin etc.), Probennahmestelle, Desinfektionsmittel, Art der Blutflussanregung, Entnahmebesteck, Blutsammelungsart (ziehend oder freier Fluss). Für die Probenaufbereitung und den Probentransport: Gerinnungsaktivator und Gerinnungszeit, Zentrifugations- und Transportbedingungen).

### **3.2. Referenzverteilung – Referenzgrenzen – Referenzintervall**

Eine repräsentative Stichprobe (IFCC Empfehlungen Teile 1-3 [7-9]) und eine valide Analytik (IFCC Empfehlung Teil 4 [10]) vorausgesetzt, müssen die Messergebnisse statistisch auf Normalverteilung untersucht, Referenzgrenzen berechnet und Referenzintervalle abgeleitet werden (IFCC Empfehlung Teil 5 [11]). Auch hierzu wurden verschiedene Modelle und Verfahren beschrieben. Aus Platzgründen sei auf die Originalliteratur verwiesen und hier die am weitesten verbreitete Vorgehensweise kurz erwähnt [11]:

Nach internationaler Übereinkunft reflektieren Referenzintervalle das zentrale Segment mit 95% der Messergebnisse aus der Referenzstichprobe. Die 2,5te und 97,5te Perzentile der Messwerte bilden die Referenzintervallgrenzen [11] (Abb. 3). Sie sind Bestandteil des Referenzintervalls. Modifikationen, entsprechend den diagnostischen Erfordernissen, sind möglich. Das Referenzintervall für CDT oder einige Tumormarker umfasst, wie im Normwertkonzept, die Nullte bis 95te Perzentile, weil erniedrigte CDT- oder Tumormarkerwerte bisher ohne diagnostische Bedeutung sind.

#### 4. Sogenannte Befundkranke

Wenn nur 95% der Messergebnisse der Referenzstichprobe das Referenzintervall bilden, liegen 5% der Messwerte der gesunden Referenzindividuen außerhalb des Referenzintervalls, 2,5% unterhalb der 2,5ten Perzentile (= untere Referenzintervallgrenze) und 2,5% oberhalb der 97,5ten Perzentile (= obere Referenzintervallgrenze). Das heißt, ein Teil, nämlich insgesamt 5%, der eigentlich Gesunden wären als krank zu betrachten [13]. Man spricht hier auch von sog. Befundkranken [3]. (Analoges galt auch im Normalwertkonzept.)

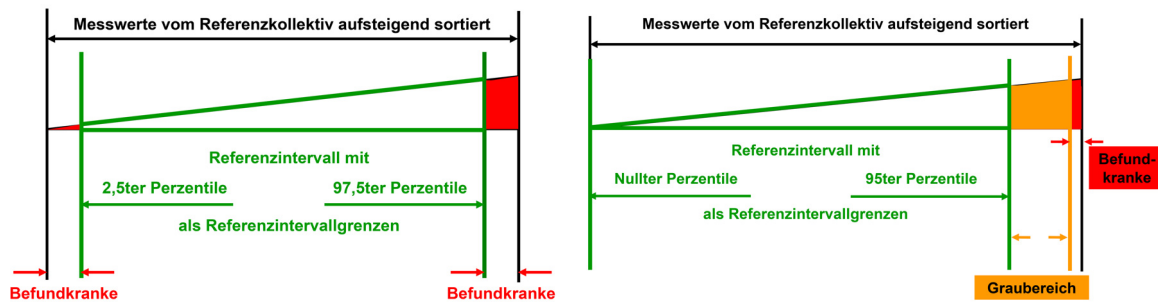


Abb. 3. Ableitung eines Referenzintervalls aus den Messwerten einer Referenzstichprobe. Hierzu werden die Messergebnisse in aufsteigender Reihenfolge sortiert und 2,5 Prozent der Messergebnisse am unteren Ende und 2,5 Prozent der Ergebnisse am oberen Ende der Datenreihe ausgeklammert. Die 2,5te und 97,5te Perzentile bilden die Referenzintervallgrenzen für Parameter für die erniedrigte und erhöhte Messergebnisse diagnostisch relevant sind (links). Die Nullte und 95te Perzentile sind die Referenzintervallgrenzen für Parameter für die nur erhöhte Messwerte diagnostisch bedeutsam sind (rechts). Der Anteil Befundkranker kann durch Einführung eines Graubereiches reduziert werden, der sich z. B. an der analytischen Unpräzision des Analysenverfahren orientieren kann. Messwerte im Graubereich bedürfen gewöhnlich einer besonders sorgfältigen Interpretation.

Aufgrund dieser Überlegungen können Analyseergebnisse außerhalb des Referenzintervalls und isoliert betrachtet, nicht pathognomonisch sein. Stattdessen ist für eine valide Interpretation eines Laborergebnisses immer eine Zusammenschau aus Anamnese, Klinik und (weiteren) Labordaten erforderlich.

#### 5. Resümee und Ausblick

Die unter Punkt 3.1. vorgestellten Ein- und Ausschlusskriterien und deren Komplexität sind ein häufig kritisiertes Element im Referenzwertkonzept [14]. Bei Beachtung aller Selektionskriterien für die Referenzindividuen lässt sich kaum eine repräsentative Referenzstichprobe zusammenstellen. Deshalb werden a posteriori (retrospektive) Ansätze, wie in [14,15] beschrieben, immer wieder und jüngst auf der Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) als praktikablere Alternative zu den a priori Studienmodellen diskutiert [16]. Allerdings benötigt man hierfür Daten von großen Patientenkollektiven, die kleineren Laboren gewöhnlich nicht zur Verfügung stehen.

Für die von Akkreditierungs- und Zertifizierungsstellen geforderte laborinterne Referenzintervallüberprüfung bei Aufnahme eines Analyten in das Analysenspektrum des Labors oder bei Modifikation eines im Labor schon etablierten Testverfahrens könnte das vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) beschriebene Verfahren C28-A3 [17] eine praktikable Alternative sein, auch für kleine Laboratorien mit vglw. geringen Analysenzahlen. Danach ist es ausreichend, Referenzwerte von 20 Referenzindividuen zu ermitteln und diese mit dem vom Testhersteller empfohlenen Referenzintervall oder entsprechenden Literaturdaten zu vergleichen. Liegen maximal 2 Referenzwerte (Messergebnisse) außerhalb des emp-

fohlenen oder intendierten Referenzintervalls, kann dieses übernommen werden. Liegen 3 oder 4 Messwerte außerhalb, müssen 20 weitere Referenzindividuen untersucht und deren Messergebnisse mit dem avisierten Referenzintervall verglichen werden. Bei darüber hinaus gehenden Abweichungen ist das empfohlene Referenzintervall nicht repräsentativ für das eingesetzte Analysenverfahren und darf deshalb nicht zur Transversalbeurteilung im Befund berichtet werden [17].

Das von der IFCC beschriebene Referenzwertkonzept gilt heute als universeller Standard der Laboratoriumsdiagnostik. Und trotzdem bleibt häufig unklar, ob im Laborbefund ein „echtes“ Referenzintervall oder nicht doch ein eher „traditioneller“ Normalbereich ausgewiesen ist. Hierzu fehlen gewöhnlich die Detailinformationen, die sich in einem Befund kaum darstellen lassen (und von den behandelnden Ärzten der Übersichtlichkeit eines Befundes halber wenig erwünscht sind).

Ein Ausweg könnten **intraindividuelle Referenzwerte** oder -intervalle sein. Dabei werden für jedes Individuum (am besten von Geburt an) Laboraten erhoben, deren Verlauf dokumentiert und bei Bedarf mit einem aktuellen Analysenergebnis verglichen [18]. Der Anstieg einer Tumormarkerkonzentration im Blut könnte dann mglw. sehr frühzeitig auf die Entwicklung eines Tumors hinweisen. Der Ansatz ist durchaus elegant: Jeder Patient ist sein eigenes Bezugssystem, seine eigene Referenzstichprobe, die hier nur aus dem Patienten selbst besteht. Bedenkt man aber, dass die Lebensdauer eines Deutschen derzeit bei ca. 80 Jahren liegt und es entsprechend stabiler Analysensysteme mit Inter-Assay-Unpräzisionen innert acht Dekaden unterhalb der biologischen Variation des Laborparameters bedarf, erscheint eine breite Verwendung individualisierter Referenzintervalle als unwahrscheinlich. Datenschutz und Kostengründe könnten weitere Argumente gegen dieses Konzept sein.

Die in der Toxikologie und Arbeitsmedizin oft verwendeten **Entscheidungsgrenzen** (syn. Grenzwerte, Cut-offs) sind von den Referenzwerten und Referenzintervallen abzugrenzen. Sie sollen Gegenstand eines kommenden Beitrages sein.

## 6. Literatur

- [1] Henny J. Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine [editorial]. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:686-691.
- [2] Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:692-697.
- [3] Stamm D. Normalwerte und Referenzwerte. In: Greiling H, Gressner AM (Hrsg.). *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. 3. Aufl., Schattauer, Stuttgart, 1995, 1-5 und 71-111.
- [4] Madea B, Mußhoff F, Berghaus G (Hrsg.). *Verkehrsmedizin. Fahreignung, Fahrsicherheit, Unfallrekonstruktion*. 2. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 2012.
- [5] Gressner A, Arndt T (Hrsg.). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Auflage, Springer, Heidelberg, 2013.
- [6] Gräsbeck R, Saris NE. Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;26(Suppl 110):62-63.
- [7] International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:337-342.
- [8] International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-644.
- [9] International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV). Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:593-598.

- [10] International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Division Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV). Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991;29:531-535.
- [11] International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV) and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:645-656.
- [12] International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV) and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:657-662.
- [13] Mills JR, Katzmann BM, Baumann NA. The perils of deprofessionalizing laboratory test ordering: are we headed down a costly path? Clin Chem 2015;61:1216-1217.
- [14] Haeckel R, Wosniok W, Arzideh F. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General consideration and concepts of determination. Clin Chem Lab Med 2007;45:1033-1042.
- [15] Arzideh F, Wosniok W, Gurr E, Hinsch W, Schumann G et al. 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. Clin Chem Lab Med 2007;45:143-1057.
- [16] Programm zur 12. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin vom 14. – 17. Oktober 2015 in Leipzig. Kurs der Arbeitsgruppe Richtwerte „Ermittlung von Referenzgrenzen aus vorhandenen Datenpools“.
- [17] Appold K. Determining laboratory reference intervals: CLSI guideline makes the task manageable. Labmedicine 2009;40:75-75.
- [18] Queraltó JM. Intraindividual reference values. Clin Chem Lab Med 2004;42:765-777.

## 7. Zum Weiterlesen

Clin Chem Lab Med 2004;42(7):685-873. Ein Sonderheft von Clinical Chemistry Laboratory Medicine das auf knapp 200 Seiten das Referenzwertkonzept und weiteren Ansätze zur Transversalbeurteilung in der Laboratoriumsmedizin behandelt.

CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline – third edition. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: CLSI, 2008.