SYSMEX EDUCATIONAL ENHANCEMENT AND DEVELOPMENT | Mai 2023*

SEED Hématologie

Intervalles de référence – et ce que Sysmex peut apporter

La réelle signification des « intervalles de référence » et leur utilité

Un résultat isolé, considéré séparément, n'est pas très significatif. Des conclusions ne peuvent être tirées que lorsque ce résultat est comparé à d'autres valeurs. Une comparaison avec les résultats antérieurs du même patient permet de montrer si la valeur est stable, en hausse ou en baisse. Une comparaison avec des valeurs retrouvées chez des sujets sains permet d'évaluer si la valeur se situe ou non dans la plage typique des personnes en bonne santé. Une comparaison avec les limites de décision permet d'évaluer si d'autres interventions médicales sont préconisées.

La plage des valeurs typiques des personnes en bonne santé est appelée « intervalle de référence ». Elle est aussi souvent appelée simplement « intervalle normale ». Mais qu'est-ce que la « normalité » ? Les résultats de laboratoire peuvent être influencés par un certain nombre de paramètres, tels que l'âge, le sexe et les habitudes alimentaires (voir ci-dessous). Lorsqu'on parle d'« intervalle de référence », il est important de savoir à quoi il est fait référence. La cohorte de référence est-elle réellement comparable ? Ce n'est que lorsque c'est le cas qu'un intervalle de référence est applicable à un patient en particulier.

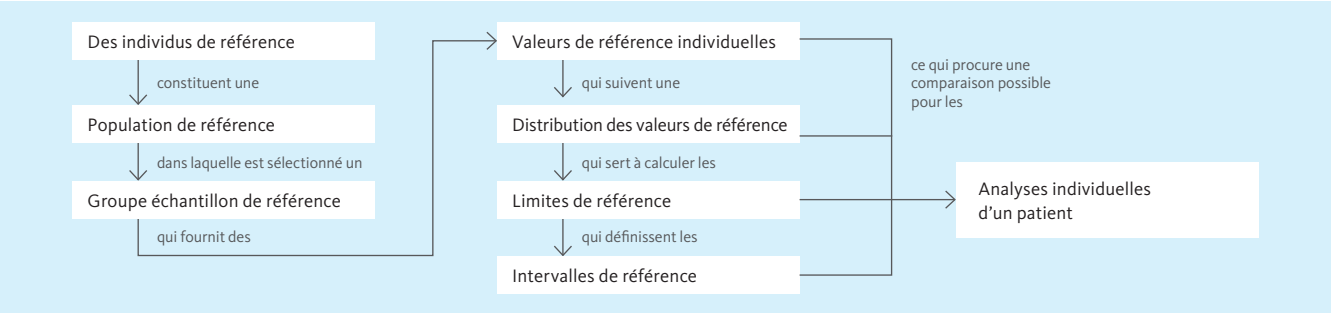

***Fig. 1** Définitions*

* Révision de l'article original publié en avril 2015

Par définition, la population de référence est constituée de tous les individus de référence [1]. Dans un cas spécifique, il peut s'agir d'un seul patient donné avec ses valeurs antérieures. Cependant, une telle population consiste souvent en un grand nombre d'individus où la sélection du groupe représentatif de l'échantillon peut facilement devenir un obstacle. De nombreux critères (âge, sexe, origine ethnique, etc.) peuvent être utilisés pour mieux définir une population de référence. Lorsque l'on sait que les résultats des analyses diffèrent, par exemple en fonction de l'âge ou du sexe, il est nécessaire de définir des sous-groupes d'individus de référence en conséquence. Les groupes de patients souffrant d'une certaine maladie peuvent également servir de population de référence utile pour les patients en particulier atteints de cette même pathologie. Ces intervalles de référence spécifiques sont par exemple utiles après une greffe de moelle osseuse pour déterminer la rémission d'une leucémie aiguë, ou encore pendant la grossesse. Comme on peut s'y attendre, les intervalles de référence les plus fréquemment utilisés proviennent d'une population en bonne santé. Cela soulève toutefois le problème de la définition d'un individu « sain ». Il n'existe pas de critères clairs pour éliminer les personnes « malades » d'une population de référence.

Conditions préalables à la détermination des intervalles de référence

Les intervalles de référence correspondent fréquemment à des groupes de référence supposés « sains », tels que des donneurs de sang ou de jeunes médecins, infirmiers, ambulanciers, paramédicaux et étudiants en médecine. Il a cependant été démontré que les résultats pour ces groupes de référence facilement accessibles diffèrent significativement de ceux de la population générale et ne sont donc pas représentatifs. En somme, chacune de ces sélections crée des intervalles de référence différents, bien que les différences soient parfois assez faibles [2–4]. Une description claire de la procédure de détermination de la population de référence est nécessaire pour que les intervalles de référence soient utiles :

1. Les analyses d'un patient doivent être comparées aux intervalles de référence qui lui sont applicables. Les mêmes intervalles de référence ne peuvent pas être utilisés à des fins différentes (telles que des études physiologiques chez des athlètes ou un suivi du traitement d'une maladie définie), moyennant quoi la description doit inclure l'objectif des intervalles de référence.

2. De plus, les critères selon lesquels les individus sont inclus ou exclus de la population de référence doivent être expliqués. Si la population doit être divisée en sous-groupes (par exemple selon l'âge ou le sexe), ces caractéristiques doivent être connues pour chaque individu de référence.

3. Les individus de référence doivent toujours être aussi comparables que possible aux patients pour lesquels les intervalles de référence doivent être utilisés.

Les principaux facteurs connus pour influencer les intervalles de référence et qui doivent être pris en considération sont les suivants :

- Sexe, âge, origine ethnique, statut social et profession, conditions environnementales
- État nutritionnel
- Circonstances de l'échantillonnage

Les facteurs qui peuvent conduire à des intervalles de référence différents en hématologie sont les suivants :

- Logistique préanalytique, âge de l'échantillon
  - Transport
  - Exposition à la chaleur
- Habitudes alimentaires
  - Carence en fer
  - Déshydratation
- Activité physique différente
- Différences marquées d'altitude du lieu de vie
- Exposition à certains produits chimiques due au travail, à la pollution de l'environnement, au tabagisme, etc.
- Autres

Fig. 2 *Facteurs pouvant influencer les intervalles de référence en hématologie.*

Procédure de détermination des intervalles de référence applicables

À la lumière de la multitude de facteurs mentionnés, la question peut se poser de savoir comment garantir des intervalles de référence applicables à des patients particuliers. La méthode la plus simple pour le faire, qui est aussi celle recommandée par la Fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) [3, 8], consiste en une étude indépendante des intervalles de référence par le laboratoire. Pour ce faire, des groupes de référence appropriés (par exemple, un groupe d'hommes et un groupe de femmes) sont sélectionnés dans une population de référence appropriée. Chaque groupe étudié doit comprendre au moins 120 sujets après exclusion de ceux qui ne répondent pas aux critères d'inclusion. Afin d'exclure les échantillons d'individus qui ne conviennent pas au groupe de référence, par exemple parce qu'ils prennent des médicaments qui influencent les résultats de mesure étudiés ou parce qu'ils suivent un régime alimentaire inhabituel, il est utile d'établir un questionnaire à ce sujet, tel que celui figurant dans la recommandation C28-A3 du Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI/IFCC, pages 10 et 11. L'intervalle de référence est alors défini comme la fourchette dans laquelle se situent 95 % des résultats obtenus auprès des individus.

Si un paramètre peut révéler à la fois des valeurs pathologiquement élevées et basses, comme c'est le cas pour la plupart des paramètres hématologiques [6–8], la tranche supérieure de 2,5 % et la tranche inférieure de 2,5 % sont toutes deux éliminées et la plage restante est utilisée comme intervalle de référence. Si le résultat de la mesure ne peut être élevé que s'il est pathologique mais sans atteindre des valeurs trop basses, les valeurs de la tranche supérieure de 5 % sont éliminées pour obtenir l'intervalle de référence. Il existe également une méthode de calcul basée sur seulement 80 sujets, mais celle-ci est mathématiquement plus complexe (voir Fig. 4). Si différents sous-groupes sont considérés, par exemple les hommes et les femmes, les valeurs obtenues peuvent être examinées pour déterminer s'il existe ou non une différence statistiquement significative. Si ce n'est pas le cas, les valeurs peuvent être combinées en intervalles de référence communs.

Cependant, des groupes de 80 et 120 sujets sont souvent considérés comme une charge de travail inacceptable, en particulier lorsque plusieurs sous-groupes sont considérés, qui nécessitent chacun 80 ou 120 individus.

La méthode décrite ci-dessus pour déterminer les intervalles de référence est appelée « méthode non paramétrique ». Des méthodes paramétriques sont également utilisées. Elles déterminent un intervalle de référence par un calcul de la moyenne ± deux fois l'écart-type. Ces méthodes supposent toutefois que le paramètre étudié suit une distribution normale ou gaussienne, ce qui n'est pas le cas pour de nombreux paramètres. Dans quelques cas, une transformation logarithmique, c'est-à-dire la transformation des valeurs en leur logarithme, peut convertir la distribution non normale d'un paramètre en une distribution normale. Cette méthode devant en outre être combinée à une transformation inverse, l'effort mathématique est plus important. L'avantage théorique de ces méthodes est qu'elles fonctionnent avec moins d'individus. Cependant, le fait qu'elles ne s'appliquent pas à de nombreux paramètres et exigent en outre une distribution normale augmente considérablement l'effort mathématique.

Fig. 3 *Méthodes paramétriques et non paramétriques de calcul des intervalles de référence.*

Examen de la pertinence des intervalles de référence déterminés ailleurs

Pour la raison évoquée ci-dessus, l'adoption pure et simple d'un intervalle de référence publié ailleurs n'est pas admissible et peut même être dangereuse pour les patients, moyennant quoi sa pertinence comme référence doit être examinée dans tous les cas. Pour ce faire, l'IFCC propose la procédure suivante [9] : 20 échantillons de référence locaux sont prélevés et comparés à l'intervalle de référence publié ailleurs. Si tout au plus deux des 20 échantillons sont en dehors de cet intervalle, l'intervalle de référence peut être utilisé. Si 3 à 4 échantillons sont en dehors de l'intervalle de référence, 20 échantillons supplémentaires doivent être prélevés. Si tout au plus deux de ces 20 échantillons sont en dehors de la plage, l'intervalle de référence peut être utilisé. Si, lors de la vérification initiale, cinq échantillons ou plus, ou plus de deux échantillons d'un ensemble répété d'échantillons, se situent en dehors de l'intervalle de référence publié, l'intervalle de référence ne convient pas comme référence pour ces patients. L'alternative est alors une nouvelle étude (voir ci-dessus) ou la validation d'un intervalle de référence différent.

Différentes significations des intervalles de référence et des limites de décision

Si le résultat d'un patient est en dehors de l'intervalle de référence, il n'appartient pas à la population de référence, ce qui ne signifie pas nécessairement que des interventions médicales soient nécessaires.

D'une part, les valeurs de 5 % de la population de référence se situent de toute façon en dehors de l'intervalle de référence (du fait du calcul) et le patient pourrait simplement faire partie de ce pourcentage (rappelons que 5 % signifie « 1 patient sur 20 »). D'autre part, aucune intervention n'est nécessaire pour les formes légères de nombreuses pathologies. Au lieu de cela, le résultat est comparé à des limites de décision, appelées « valeurs seuils ». Celles-ci peuvent être établies, par exemple, par l'analyse d'une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) . De même, dans de nombreux autres domaines, il n'est pas crucial qu'une valeur ne puisse plus être considérée comme « normale ».

Cela commence plutôt lorsqu'un diagnostic peut être établi. Des limites de décision peuvent également être établies pour les pathologies chroniques, en fonction des possibilités thérapeutiques par exemple. La question est alors de savoir dans quelle mesure la situation du patient est considérée comme stable et à quel moment un changement de traitement est approprié. En principe, les méthodes de détermination d'un intervalle de référence peuvent être appliquées de manière analogue, comme décrit ci-dessus, à un groupe de référence de patients stables. Cependant, de telles limites de décision sont souvent simplement basées sur l'expérience médicale et le consensus au sein de la spécialité concernée.

Une approche indirecte pour déterminer les intervalles de référence

Une nouvelle approche pour déterminer les intervalles de référence a récemment été publiée dans un document d'opinion du Comité de l'IFCC sur les intervalles de référence et les limites de décision (C-RIDL) [9]. Cette approche « indirecte » pour déterminer les intervalles de référence faire référence à une analyse statistique

des résultats existants d'échantillons prélevés à des fins de routine (par exemple, des échantillons prélevés pour le dépistage, le diagnostic ou le suivi). Cette approche est non seulement un complément utile à l'utilisation des méthodes directes traditionnelles, mais présente également un certain nombre d'avantages tels que le fait de baser les résultats sur les procédures analytiques et pré-analytiques utilisées, la capacité de prendre en compte un large éventail de populations, en particulier la population desservie par le laboratoire, et surtout, la relative facilité d'utilisation et les coûts nettement inférieurs. Dans ce document d'opinion, le C-RIDL de l'IFCC encourage les laboratoires « à utiliser des méthodes indirectes pour évaluer les intervalles de référence qu'ils appliquent, à estimer de nouveaux intervalles de référence, à publier et partager leurs résultats de manière détaillée et à poursuivre la recherche de techniques nouvelles et améliorées pour ce processus ».

Intervalles de référence XN-Series provenant de la cohorte néerlandaise Lifelines

Dans le cadre d'une étude prospective multidisciplinaire en population générale menée par L van Pelt J et al. de 2022 sur la cohorte néerlandaise Lifelines, les 105 paramètres des analyseurs XN ont été évalués [10]. Les intervalles de référence ont été calculés conformément aux méthodes statistiques recommandées par l'IFCC. Les méthodes et les intervalles de référence de cette étude sont décrits dans l'article SEED « L'art de définir des intervalles de référence ».

Intervalles de référence Sysmex

Même si Sysmex, en tant que fabricant, doit fournir des intervalles de référence comme orientation pour ses analyseurs d'hématologie et le fait dans différentes publications, ils ne peuvent pas être appliqués aveuglément à tous les patients pour les raisons expliquées ci-dessus. Sysmex fournit une liste de publications scientifiques qui procurent des informations utiles sur les intervalles de référence pour les analyseurs Sysmex (voir Tab. 1). Les publications montrent que les intervalles de référence changent selon les populations étudiées. Les intervalles de référence publiés pour les anciennes générations d'analyseurs peuvent être utilisés pour des analyseurs de génération plus récente, mais uniquement après validation. Étant donné qu'il existe des différences entre les intervalles de référence hématologiques de différentes populations, les informations contenues dans le tableau peuvent faciliter la sélection d'un intervalle de référence approprié comme point de départ pour la validation.

Tableau 1 *Intervalles de référence publiés pour les analyseurs Sysmex.*

Premier auteur	Référence	Analyseur	Paramètres	Population
L van Pelt J *et al.* [10]	Clin Chem Lab Med	XN-Series	CBC+DIFF+RET+PLT-F	Pays-Bas
Mrosewski I *et al.* [11]	Clin Chem Lab Med	XN-9000	CBC	Allemagne, pédiatrique
Florin L *et al.* [12]	Int J Lab Hematol	XN-Series	CBC+DIFF+RET	Belgique, adulte
Wilson S *et al.* [13]	Int J Lab Hematol	XN-3000	CBC+DIFF	Canada, pédiatrique
Bohn MK *et al.* [14]	Int J Lab Hematol	XN-3000	CBC+DIFF	Canada, pédiatrique
Ianni B *et al.* [15]	Arch Pathol Lab Med	XN-1000	CBC+DIFF+RET+PLT-F	USA, nouveau-nés
Arbiol-Roca A *et al.* [16]	EJIFCC	XN-Series	CBC+DIFF+RET	Espagne
Sysmex Corporation [17]		XN-Series	CBC + DIFF + RET	Japon
Dockree S *et al.* [18]	EBioMedicine	XN-Series	WBC+DIFF	Grande-Bretagne, femmes enceintes (prénatales et postnatales)

Références

[1] **CLSI (2000):** *C28-A2 How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Second Edition Vol. 29 No. 13.*

[2] **Haeckel R et al. (2007):** *A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. Clin Chem Lab Med 45 : 1033–1042.*

[3] **Henny J et al. (2009):** *The IFCC recommendations for determining reference intervals: strengths and limitations. LaboratoriumsMedizin 33: 45–51.*

[4] **Ceriotti F et al. (2009):** *Reference intervals: the way forward. Ann Clin Biochem 46: 8–17.*

[5] **Wakeman L et al. (2007):** *Robust, routine haematology reference ranges for healthy adults. Int J Lab Hematol 29: 279–283.*

[6] **Heil W et al. (2008):** *Reference ranges for adults and children. Pre-analytical considerations. Mannheim: Roche Diagnostics.*

[7] **Bain BJ et al. (1975):** *Normal haematological values: sex difference in neutrophil count. Br Med J. 5953: 306–309.*

[8] **Solberg HE. et al. (2004):** *The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. Clin Chem Lab Med 42: 710–714.*

[9] **Jones GRD et al. (2018):** *Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. CCLM, 57 (1), 20–29. Free online.*

[10] **L van Pelt J et al. (2022):** *Reference intervals for Sysmex XN hematological parameters as assessed in the Dutch Lifelines cohort. Clin Chem Lab Med. 60(6): 907–920.*

[11] **Mrosewski I et al. (2021):** *Indirectly determined hematology reference intervals for pediatric patients in Berlin and Brandenburg. Clin Chem Lab Med. 60(3): 408–432.*

[12] **Florin L et al. (2020):** *Establishment of common reference intervals for hematology parameters in adults, measured in a multicenter study on the Sysmex XN-series analyzer. Int J Lab Hem. 42: 110–115.*

[13] **Wilson S et al. (2021):** *Continuous reference curves for common hematology markers in the CALIPER cohort of healthy children and adolescents on the Sysmex XN-3000 system. Int J Lab Hematol. 43(6): 1394–1402.*

[14] **Bohn MK et al. (2020):** *Complex biological patterns of hematology parameters in childhood necessitating age- and sex-specific reference intervals for evidence-based clinical interpretation. Int J Lab Hematol. 42(6): 750-760.*

[15] **Ianni B et al. (2021):** *Defining Normal Healthy Term Newborn Automated Hematologic Reference Intervals at 24 Hours of Life. Arch Pathol Lab Med. 145(1): 66–74.*

[16] **Arbiol-Roca A et al. (2018):** *Reference intervals for a complete blood count on an automated haematology analyser Sysmex XN in healthy adults from the southern metropolitan area of Barcelona. EJIFCC. 29(1): 48-54.*

[17] **Sysmex Corporation, Japan (2014):** *Reference ranges analysis document for XN series.*

[18] **Dockree S et al. (2021):** *White blood cells in pregnancy: reference intervals for before and after delivery. EBioMedicine: 74: 103715.*