

**ZNAČAJ I METODE PROCENE INTRAINDIVIDUALNE VARIJABILNOSTI KRVNIH
PARAMETARA U VETERINARSKOJ MEDICINI**

**THE SIGNIFICANCE AND METHODS OF ASSESSMENT OF BLOOD PARAMETER
VARIABILITY IN VETERINARY MEDICINE**

**Sandra Nikolić¹, Annamaria Galfi Vukomanović¹, Mira Majkić¹, Jovan Spasojević¹,
Ivan Galić¹, Tijana Kukurić¹**

¹Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu Novi Sad
Korespondentni autor: Sandra Nikolić, neckovs021@gmail.com



S.N. <https://orcid.org/0000-0001-7337-9937>, A.G.V. <https://orcid.org/0000-0002-5361-1070>, M.M. <https://orcid.org/0009-0007-0110-7327>,
J.S. <https://orcid.org/0000-0001-5654-5796>, I.G. <https://orcid.org/0000-0002-6281-0776>, T.K. <https://orcid.org/0000-0003-2561-8555>

SAŽETAK

Intraindividualne varijacije su promene koje se uočavaju unutar jedne jedinke prilikom ponovne procene u nekom vremenskom intervalu i određene su intraindividualnim koeficijentom varijacije (CVi), koji pokazuje stepen varijabilnosti rezultata iz uzorka u odnosu na aritmetičku sredinu populacije. Viši CVi ukazuje na veću varijabilnost unutar jedinke, odnosno manju stabilnost ispitivanog parametra. Izračunavanjem CVi iz ponovljenih merenja, može se proceniti koliko izmereni parametri fluktuiraju kod pojedinačne ispitivane životinje tokom vremena. Odnos individualne i grupne biološke varijacije predstavlja indeks individualnosti (IoI) za ispitivani analit. Ovaj indeks određuje da li je za određeni analit prikladnije koristiti referentne intervale zasnovane na populaciji ili referentne intervale zasnovane na subjektu, odnosno predviđa korisnost referentnih intervala. Ovaj pokazatelj varijacije pruža smernice da će ukoliko je intraindividualna biološka varijacija veća u odnosu na interindividualnu varijaciju, (indeks individualnosti je $\geq 1,4$), referentni intervali zasnovani na populaciji biti od najveće koristi za sve jedinke, dok ukoliko je intraindividualna biološka varijacija manja u odnosu na interindividualnu varijaciju (indeks individualnosti je $\leq 0,6$) predlaže se korišćenje RCV vrednosti (*reference change value*, RCV). Izračunavanje RCV vrednosti odnosno kritične razlike je metoda koja se koristi za utvrđivanje da li je razlika u dve uzastopne analize značajna i biološki relevantna, prilikom čega se uzimaju u obzir i faktori povezani sa aktivnošću u laboratoriji (preanalitička i analitička greška), kao i faktori povezani sa normalnom intraindividualnom biološkom varijacijom. Na kraju, utvrđivanje neophodnog broja uzoraka za procenu homeostatskih okvira je još jedan metod za procenu intraindividualne varijabilnosti. Razumevanje intraindividualne varijabilnosti krvnih parametara u veterinarskoj medicini je od ključnog značaja za postavljanje tačne dijagnoze i monitoring zdravstvenog stanja životinja. Na osnovu upotrebe metoda intraindividualne varijabilnosti mogu se detektovati diskretne promene tokom vremena koje mogu ukazivati na progresiju ili regresiju oboljenja, a može se pratiti i odgovor na terapiju i po potrebi izvršiti njena korekcija.

Ključne reči: intraindividualna varijabilnost, koeficijent varijabilnosti (CVi), kritična razlika (RCV), indeks individualnosti (IoI), neophodan broj uzoraka za procenu homeostatskih okvira (NHSP)

ABSTRACT

Changes within an individual during re-evaluation within a certain period are referred to as intraindividual variations, and they are determined by the intraindividual coefficient of variation (CVi), which indicates the degree of variability of the sample results in comparison to the population's arithmetic mean. A higher CVi denotes less stability of the investigated parameter and greater variability within the individual. By calculating CVi from repeated measurements, one can estimate how much the measured parameters fluctuate in an individual over time. The ratio of individual and group biological variation represents the index of

individuality (IoI) for the examined analyte. This index determines whether it is more appropriate to use population-based reference intervals or subject-based reference intervals for a particular analyte, i.e. predicts the utility of the reference intervals. It also suggests that if intraindividual biological variation is greater than interindividual variation, (individuality index is ≥ 1.4), population-based reference intervals will be most useful for all individuals. If intraindividual biological variation is less than the interindividual variation (individuality index is ≤ 0.6), then the RCV value (reference change value, or RCV) should be used. Calculating the RCV value is a method used to determine whether the difference in two consecutive analyses is significant and biologically relevant, taking into account factors related to laboratory activity (preanalytical and analytical error), as well as factors related to normal intraindividual biological variation. Finally, determining the number of samples required for assessing the homeostatic setting point is another method used to evaluate intraindividual variability. In veterinary medicine, it is essential to understand the intraindividual variability of blood parameters to accurately diagnose patients and monitor their health. Subtle changes over time that may suggest a progression or regression of the disease can be detected by the use of intraindividual variability methods. Additionally, the response to treatment can be monitored and, if necessary, adjusted.

Key words: intra-individual variability, coefficient of variability (CVi), critical difference (RCV), index of individuality (IoI), number of samples for homeostatic setting point evaluation (NHSP)

DEFINICIJA REFERENTNIH INTERVALA

Laboratorijska analiza krvi predstavlja metod koji se najčešće upotrebljava kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini prvenstveno u cilju detekcije oboljenja i usmeravanju terapije kod pacijenata, a zatim i u svrhe preventivne provere zdravstvenog statusa jedinke, kako bi se na vreme otkrio ili prevenirao nastanak oboljenja.

U cilju donošenja kliničke odluke, široko je rasprostranjena upotreba referentnih intervala krvnih parametara. Oni predstavljaju sastavnu komponentu dijagnostičkog procesa u laboratorijama (1) i najčešće se koriste kako bi se procenili ili poredili rezultati krvi dobijeni od obolelih jedinki, a takođe i kao osnov za postavljanje dijagnoze oboljenja. Osim ovog aspekta, utvrđivanje vrednosti laboratorijskih krvnih parametara može takođe da pruži uvid u metaboličke i fiziološke procese koji se odvijaju u organizmu.

Referentni intervali predstavljaju intervale izračunate na osnovu grupe ili populacije zdravih jedinki iste vrste za određeno ispitivanje, a nazivaju se još i populacijskim referentnim intervalima (population-based reference intervals) (2). Takođe se mogu definisati i kao intervali kojima je obuhvaćena većina jedinki iz date populacije sa karakteristikama sličnim referentnoj grupi, a isključene jedinke čije se karakteristike razlikuju od referentne grupe (3). Referentni intervali imaju svoju donju i gornju granicu koja obuhvata središnjih 95% referentnog intervala izmerenih vrednosti, dobijenih iz uzoraka

zdrave referentne grupe (4,5,6). Ostalih 5% jedinki biva isključeno iz grupe referentnih zdravih jedinki, jer odstupa od utvrđenih referentnih vrednosti (konvencionalno 2,5% vrednosti se nalaze ispod i 2,5% vrednosti iznad granica referentnog intervala), a takav nalaz će biti označen kao abnormalan (3).

Iako je upotreba referentnih vrednosti utvrđenih na osnovu populacije univerzalno prihvaćena, često je problematičan sam metod utvrđivanja ovih vrednosti, pa je ova tema ne retko predmet diskusije u literature (1). Naime, dobro je poznato da postoje rase čije vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara variraju u odnosu na referentne intervale u smislu da se fiziološki nalaze iznad ili ispod granične vrednosti referentnog opsega za populaciju. Takođe, ova pojava može biti vezana i za uzrast, pol i druge karakteristike jedinke. U ovim slučajevima može se desiti da rezultati određenog testa ovakvih jedinki budu proglašeni patološkim, a da su objektivno samo posledica biološke varijacije. Istraživanje uzroka varijacije parametara je uvek preporučljivo, kako bi se isključile preanalitičke i analitičke smetnje i fiziološki izvori varijacije koji utiču na verodostojnost samog nalaza.

Uzimajući u obzir navedeno, poslednjih godina, u humanoj medicini, uveliko se koristi, a u veterinarskoj medicini počinje da se istražuje, koncept referentnih vrednosti baziranih na subjektu (subject-based reference values), što podrazumeva ponovljeno uzorkovanje od iste životinje. Ovakve referentne vrednosti, izračunate iz podataka o biološkoj varijaciji, mogu se koristiti za utvrđivanje

da li se razlike u dva uzastopna merenja mogu pripisati prirodnoj varijabilnosti, preanalitičkim i analitičkim greškama, ili nekim drugim uzrocima ove razlike kao što su uticaj bolesti ili terapije.

BIOLOŠKA VARIJACIJA, INTRAINDIVIDUALNA I INTERINDIVIDUALNA VARIJACIJA I NJENI POKAZATELJI

Biološka varijacija se definiše kao nasumična fluktuacija analita oko osnovne vrednosti za svaku jedinku ili grupu jedinki (7,8), a obuhvata analitičku varijabilnost (V_a), intraindividualnu (V_i) i interindividualnu varijabilnost (V_g), čija se mera obično procenjuje na osnovu njihovih koeficijenata varijacije (CV). Koeficijent varijacije kao statistička mera disperzije podataka od aritmetičke sredine pokazuje stepen varijabilnosti rezultata iz uzorka u odnosu na aritmetičku sredinu populacije. Predstavlja se formulom kao odnos standardne devijacije (SD) i aritmetičke sredine (Mean) (9).
$$CV = 100 \times (\text{Standardna devijacija} / \text{Aritmetička sredina})$$

Analitička varijabilnost (V_a) odnosno nasumična greška je povezana sa svakim laboratorijskim rezultatom, pri čemu veličina ove greške zavisi od metodološkog pristupa i tipa analizatora. Utvrđuje se tako što se vrše ponovljena merenja iz jednog te istog uzorka i izračunava analitički koeficijent varijacije preko aritmetičke sredine i standardne devijacije. Što je manji koeficijent analitičke varijabilnosti, manja je i nepreciznost rezultata (10). Analitička varijabilnost većine promenljivih je znatno niža u odnosu na inter- i intraindividualnu varijabilnost zbog visokog nivoa kontrole kvaliteta u laboratorijama. Zbog toga se biološka varijacija uglavnom izražava kroz intra- i interindividualnu (8). Intraindividualne varijacije su promene koje se uočavaju unutar jedne jedinke prilikom ponovne procene u nekom vremenskom razmaku ili okolnostima i određene su intraindividualnim koeficijentom varijacije (CV_i), dok su interindividualne (grupne) varijacije razlike koje se uočavaju između različitih jedinki i određene su interindividualnim koeficijentom varijacije (CV_g) (7,11). Viši CV_i ukazuje na veću varijabilnost unutar jedinke, odnosno manju stabilnost izmerenog parametra. Izračunavanjem CV_i iz ponovljenih merenja poreklom od iste jedinke, može se proceniti koliko izmereni parametri fluktuiraju kod pojedinačne ispitivane životinje tokom vremena.

Nasuprot tome, niži CV_i govori u prilog stabilnosti i postojanosti izmerenih parametara tokom određenog vremenskog perioda. Razumevanje CV_i vrednosti pomaže pri ustanovljavanju “normalnih” intervala i detekciji abnormalnih varijacija krvnih parametara, utvrđivanju zdravstvenog stanja životinje, praćenju progresije oboljenja i proceni efikasnosti terapije. Takođe, može da ukaže i na frekvenciju kojom bi trebalo vršiti praćenja određenog analita na osnovu njegove utvrđene varijabilnosti unutar jedinke. Pored svega navedenog, neophodno je imati na umu da CV_i obezbeđuje vredan uvid u intraindividualnu varijabilnost, ali ne može obuhvatati sve izvore varijabilnosti. Faktori kao što su stres, način ishrane, laktacija, bolest i terapija mogu uticati na krvne parametre i doprinosti varijabilnosti iznad one koja je izmerena samo upotrebom CV_i vrednosti.

Sledeći metod procene intraindividualne varijabilnosti ispitivanih krvnih parametara jeste *indeks individualnosti (IoI)*, koji predstavlja odnos individualne i grupne biološke varijacije za ispitivani analit. Ovaj indeks određuje da li je za određeni analit prikladnije koristiti referentne intervale zasnovane na populaciji ili referentne intervale zasnovane na subjektu, odnosno predviđa korisnost referentnih intervala (10,12). Većina analita, kao što je to slučaj sa kalcijumom, holesterolom i kreatininom, imaju izraženu individualnost, odnosno nizak indeks individualnosti, što znači da je stepen biološke varijacije unutar jedinke mnogo manji u odnosu na stepen biološke varijacije unutar populacije. U ovakvim slučajevima populacijski referentni intervali nisu naročito korisni u proceni da li je rezultat testa “normalan” ili ne, te bi verovatno bilo bolje porediti dobijene rezultate sa referentnim intervalima utvrđenim za tu samu jedinku (10). Indeks individualnosti određen analitičkim, intraindividualnim i interindividualnim koeficijentom varijacije pruža smernice da će ukoliko je intraindividualna biološka varijacija veća u odnosu na interindividualnu varijaciju, (indeks individualnosti je $\geq 1,4$), referentni intervali zasnovani na populaciji biti od najveće koristi za sve jedinke, dok ukoliko je intraindividualna biološka varijacija manja u odnosu na interindividualnu varijaciju (indeks individualnosti je $\leq 0,6$) treba koristiti referentne intervale zasnovane na subjektu (12,13,14). Takođe, ovo znači da ukoliko je indeks individualnosti nizak, odnosno da je individualnost visoka, varijabilnost vrednosti za individuu zauzima samo mali deo referentnog intervala. Sa druge

strane, ako je indeks individualnosti visok, odnosno individualnost je niska, disperzija vrednosti kod svake jedinke ponaosob slična je disperziji među jedinkama populacije predstavljene referentnim intervalima (15).

Vrednosti indeksa individualnosti i njihova interpretacija su sledeći:

- <0.6 (nizak indeks individualnosti) - koristiti referentne intervale bazirane na subjektu ili kritičnu grešku (RCV) (2, 7, 12);
- 0.6-1.4 (ekvivokalni indeks individualnosti) - koristiti populacijske referentne vrednosti uz oprez. Na žalost, najveći broj rezultata testova potpada u ovu kategoriju koja nije od prevelike pomoći i
- >1.4 (visok indeks individualnosti) - koristiti populacijske referentne vrednosti.

Formula na osnovu koje se uobičajeno izračunavaju indeksi individualnosti može se predstaviti sledećom jednačinom u kojoj se u brojiocu nalaze CVi koji predstavlja koeficijent intraindividualne varijabilnosti i CVa odnosno koeficijent analitičke varijabilnosti, a u imeniocu se nalazi CVg odnosno koeficijent interindividualne varijabilnosti (16).

$$Iol = \frac{\sqrt{CVi^2 + CVa^2}}{CVg}$$

Kod varijabli kod kojih postoji pretpostavka normalnosti, indeksi individualnosti se mogu računati iz koeficijenata varijacije na osnovu recipročne formule odnosno formule u kojoj se koeficijent interindividualne varijacije (CVg) postavlja kao brojilac i to je tzv. inverzirani indeks individualnosti koji rezultira u višim vrednostima kod porasta intraindividualne varijacije (12, 17). Formula inverziranog indeksa individualnosti može se predstaviti na sledeći način:

$$Iol = \frac{CVg}{\sqrt{CVi^2 + CVa^2}}$$

Pri ovakvom načinu izračunavanja, indeksi individualnosti:

≥1,67 ukazuju na to da su u takvim slučajevima referentni intervali zasnovani na subjektu od veće koristi u odnosu na referentne intervale zasnovane na populaciji,

≤ 0,7 treba koristiti populacijske referentne intervale. 0,7 - 1,67 spadaju u ekvivokalne odnosno u nesigurne, tako da se u ovim slučajevima bazira na populacijske referentne intervale uz oprez.

Uopšteno govoreći, kada je indeks individualnosti po uobičajenoj formuli niži od 0,6, a po inverziranoj formuli viši od 1,67 predlaže se korišćenje RCV vrednosti (*reference change value*, RCV) odnosno kritične razlike koja predstavlja sledeći metod za procenu intraindividualne varijabilnosti krvnih parametara (18).

Biološka varijacija često može da komplikuje interpretaciju kliničkih rezultata, naročito onih dobijenih konsektivnom analizom uzorka poreklom od iste jedinke. Metoda koja se koristi za utvrđivanje da li je razlika u dve uzastopne analize značajna i biološki relevantna jeste izračunavanje RCV vrednosti (*reference change value*, RCV) prilikom čega se uzimaju u obzir i faktori povezani sa aktivnošću u laboratoriji (preanalitička i analitička greška), kao i faktori povezani sa normalnom intraindividualnom biološkom varijacijom (18). RCV predstavlja najmanju razliku dva uzastopna merenja koja izdvaja rezultat iz zone nepouzdanosti merenja. Nepouzdanost merenja predstavlja ekspresiju statističke varijanse vrednosti usled izmerenog kvantiteta. Nijedan metod merenja nije u potpunosti precizan kada je merenje kvantiteta u pitanju, jer vrednosti zavise od različitih faktora kao što su sistem merenja, metod merenja, nivo usavršenosti vršioca merenja, kao i okruženja. Čak i ako se količina meri nekoliko puta uzastopno, na isti način i u istoj situaciji, vrednosti merenja će se razlikovati od jednog merenja do drugog (19). RCV definiše procenat promene koji treba da se nadvisi kako bi se utvrdila značajna razlika između dva uzastopna merenja (18). RCV ima svoj opseg vrednosti odnosno donju i gornju granicu izvan kojih se promene smatraju značajnim, a ne samo rezultatom fizioloških varijacija ili analitičke nepreciznosti (11).

Iz svega prethodnog mogli bismo izvući konačnu definiciju RCV, a to je da se najmanje razlike između dve dobijene koncentracije ispitivanog analita koje se mogu povezati sa realnom promenom zdravstvenog stanja pacijenta nazivaju „*reference change values*“ (RCV) ili kritične razlike. Procena na osnovu RCV je dosta korisnija u odnosu na populacijske referentne intervale i objektivnija jer uključuje kako biološku (intraindividualnu) tako i analitičku varijaciju, odnosno RCV daje objektivnu prednost interpretaciji laboratorijskog nalaza pacijenta kada je dostupan prethodni nalaz (20). Baza podataka o biološkoj varijaciji se stalno dopunjuje, izračunate RCV vrednosti mogu se naći u literaturi, što je češći slučaj u humanoj medicini u

odnosu na veterinarsku, a neke strane države uvele su izdavanje podatka o RCV uz referentne intervale kao pomoć pri interpretaciji nalaza (10,21).

RCV vrednosti se računaju prema sledećoj formuli (22):

$$RCV = Z \times \sqrt{2} \times \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2}$$

U ovoj formuli Z predstavlja odgovarajući broj standardnih devijacija zasnovanih na željenoj verovatnoći (za dvosmerne promene $1.96 = 95\%$ i $2.58 = 99\%$), $\sqrt{2}$ ukazuje na to da procenjujemo promenu koja se javlja između dva rezultata u seriji, CV_A je koeficijent analitičke varijabilnosti i CV_I koeficijent intraindividualne varijabilnosti (18,22,23). Kvantitativni podaci o komponentama biološke varijacije se koriste u svrhu utvrđivanja specifikacija kvaliteta laboratorijske analize (24), zatim utvrđivanja neophodnog broja uzoraka kako bi se procenilo homeostatsko okruženje jedinke, kao i u proceni korisnosti populacijskih referentnih intervala (25) i izračunavanja referentne vrednosti promene (RCV) neophodne za procenu značajnosti promena u serijskim rezultatima jedinke (23,26,27). Takođe, referentni intervali zasnovani na subjektu (RCV), koji se izračunavaju na osnovu podataka o biološkoj varijaciji, mogu se koristiti pri utvrđivanju da li je razlika u dva uzastopna merenja rezultat prirodne varijabilnosti ili su prisutni neki drugi uzroci kao što su bolest ili terapija koji dovode do evidentne razlike (7,12,28).

U poslednje vreme, razmatra se mogućnost da će se ukoliko se uobičajeni proračuni za RCV primene na više od dva uzastopna uzorka, povećati verovatnoća dobijanja lažno pozitivnih rezultata (ako promena za rezultat ima porast) kao i lažno negativnih rezultata (ukoliko promena za rezultat ima opadanje), naročito ako je visok ukupni koeficijent varijacije (CVT=30-40%) (29). Kako bi rešili ove probleme različiti autori su razvili nove modele zasnovane na log-normalnoj distribuciji podataka o biološkoj varijaciji uz preporuku da se koriste faktori referentne promene za izračunavanje gornjeg i donjeg limita za značajne promene u sekvenci rezultata (29).

Potencijalni nedostaci upotrebe RCV vrednosti su:

- Velika količina statističkih informacija koja zbunjuje kliničare
- Upotreba Z skora koja eliminiše kliničku procenu
- RCV vrednosti mogu biti zavisne od učestalosti testiranja

- Neke biološke varijacije mogu biti zavisne od zdravstvenog stanja
- Pravilna primena RCV vrednosti zahteva prefinjeni laboratorijski informacioni sistem upravljanja (*Laboratory information management system /LIMS*)
- Neophodna je edukacija laboratorijskog osoblja i kliničara
- Terminologija može biti zbunjujuća (30)

Na kraju, utvrđivanje neophodnog broja uzoraka za procenu homeostaze je još jedan metod za procenu intraindividualne varijabilnosti. Iako je u uslovima zdravlja samo jedan laboratorijski rezultat dovoljan da se procene homeostatski okviri jedinke, preciznija procena homeostatskih okvira se dobija izračunavanjem srednjih vrednosti višestrukih uzoraka (npr. multiplih godišnjih rezultata ispitivanja). Neophodan broj uzoraka za procenu homeostatskih okvira sa zadatom preciznošću se može izračunati na osnovu ocene standardne greške aritmetičke sredine. Formula koja se koristi je sledeća:

$$NHSP = \left(z \times \frac{\sqrt{CV_I^2 + CV_A^2}}{D} \right)^2$$

U ovoj jednačini Z predstavlja odgovarajući broj standardnih devijacija zasnovanih na željenoj verovatnoći (za dvosmerne promene $1.96 = 95\%$ i $2.58 = 99\%$), CV_A je koeficijent analitičke varijabilnosti, CV_I koeficijent intraindividualne varijabilnosti, a D predstavlja dozvoljeni procenat odstupanja od homeostatskih okvira jedinke. Obično se dozvoljava maksimalno do 10% odstupanja što je adekvatno za analite sa vrednostima $CVI \geq 6,67$, ali previsoko za analite niske individualnosti, npr. elektrolite. Za analite kod kojih je $CVI < 6,67$, preporučuje se da vrednost $D = 1,5 \times CVI$, do maksimalnog odstupanja od 10%. Istraživanja ukazuju da se homeostatski okviri za većinu analita kod zdravih pasa, mačaka i konja, mogu utvrditi sa verovatnoćom od 95% iz manje od 4 uzorka, dok se kod bolesnih jedinki neophodan broj uzoraka značajno povećava (31).

Razumevanje intraindividualne varijabilnosti krvnih parametara u veterinarskoj medicini je od ključnog značaja za postavljanje tačne dijagnoze i monitoring zdravstvenog stanja životinja. Na osnovu upotrebe metoda intraindividualne varijabilnosti mogu se detektovati diskretne promene tokom

vremena koje mogu ukazivati na progresiju ili terapiju i po potrebi izvršiti njena korekcija.
regresiju oboljenja, a može se pratiti i odgovor na

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was created as a result of research within the "Agreement on the transfer of funds for the financing of scientific research work of teaching staff at accredited Higher Education Institutions in 2024, contract registration number: 451-03-65/2024-03/ 200117".

LITERATURA

1. Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P., Szladovits B., Walton R.M., Barnhart K.F., et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 2012, 41(4):441–53.
2. Reference intervals. *Eclinpath.com*. 2013; Available from: <https://eclinpath.com/test-basics/reference-intervals/>
3. Katayev A., Balciza C., Secombe D.W. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results: is there a better way?: Is there a better way? *Am J Clin Pathol* 2010, 133(2):180–6.
4. Özcürümez M.K., Haeckel R., Gurr E., Streichert T., Sack U. Determination and verification of reference interval limits in clinical chemistry. Recommendations for laboratories on behalf of the Working Group Guide Limits of the DGKL with respect to ISO Standard 15189 and the Guideline of the German Medical Association on Quality Assurance in Medical Laboratory Examinations (Rili-BAEK). *Journal of Laboratory Medicine* 2019, 43(3):127–33.
5. Pak S.I., Han H.J. Evaluation of clinical usefulness of reference interval of some selected hematological parameters in canine blood. *Korean J Vet Res* 2004, 44(4):649–653.
6. Regis M., Postma T.A., van den Heuvel E.R. A note on the calculation of reference change values for two consecutive normally distributed laboratory results. *Chemometr Intell Lab Syst* 2017, 171:102–11.
7. Falkenö U., Hillström A., von Brömssen C., Strage E.M. Biological variation of 20 analytes measured in serum from clinically healthy domestic cats. *J Vet Diagn Invest* 2016, 28(6):699–704.
8. Trumel C., Monzali C., Geffré A., Concordet D.V., Hourqueig L., Braun J.-P.D., et al. Hematologic and biochemical biologic variation in laboratory cats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2016, 55(5):503–9.
9. Pélabon C., Hilde C.H., Einum S., Gamelon M. On the use of the coefficient of variation to quantify and compare trait variation. *Evol Lett*. 2020, 4(3):180–8.
10. Fierdoz O. Essential laboratory knowledge for the clinician. Laboratory testing forms an integral part of patient management. *CME* 2012, 30(7):244–8.
11. Campora C., Freeman K.P., Baral R. Clinical application of biological variation data to facilitate interpretation of canine and feline laboratory results: Biological variation applied to clinical practice. *J Small Anim Pract* 2018, 59(1):3–9.
12. Baral R.M., Dhand N.K., Freeman K.P., Krockenberger M.B., Govendir M. Biological variation and reference change values of feline plasma biochemistry analytes. *J Feline Med Surg* 2014, 16(4):317–25.
13. Pagitz M., Frommlet F., Schwendenwein I. Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2007, 21(5):936–42.
14. Badrick T. Biological variation: Understanding why it is so important? *Pract Lab Med* 2021, 23(e00199):e00199.
15. Braga F., Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016, 53(5):313–25.
16. Bourges-Abella N.H., Gury T.D., Geffré A., Concordet D., Thibault-Duprey K.C., Dauchy A., et al. Reference intervals, intraindividual and interindividual variability, and reference change values for hematologic variables in laboratory beagles. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2015, 54(1):17–24.
17. Ruau C.G., Carney P.C., Suchodolski J.S., Steiner J.M. Estimates of biological variation in routinely measured biochemical analytes in clinically healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 2012, 41(4):541–7.
18. Nunes L.A.S., Brenzikof R., de Macedo D.V. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol* 2010, 110(1):191–8.
19. Hong J., Cho E.-J., Kim H.-K., Lee W., Chun S., Min W.-K.. Application and optimization of reference change values for Delta Checks in clinical laboratory. *J Clin Lab Anal* 2020, 34(12):e23550.

20. Fernandez D., Avinash S.S., Malathi M., Shivashankara A.R., Kumar A., Fernandez P. Establishing the reference change values (RCVs) and validating the delta check auto-verification in a clinical biochemistry laboratory. *Muller j med sci res* 2017, 8(1):42.
21. Krleža J.L. *Laboratorijska medicina: Predanalitička pogreška, interferencije i interpretacija nalaza*. Klinika za dječje bolesti Zagreb 2014.
22. Fernández-Grande E., Valera-Rodriguez C., Sáenz-Mateos L., Sastre-Gómez A., García-Chico P., Palomino-Muñoz T.J. Impact of reference change value (RCV) based autoverification on turnaround time and physician satisfaction. *Biochem Med (Zagreb)* 2017, 27(2):342–9.
23. Ricós C., García-Victoria M., de la Fuente B. Quality indicators and specifications for the extra-analytical phases in clinical laboratory management. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42(6):578–82.
24. Kenny D., Fraser C.G., Hyltoft P. Consensus agreement. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999, 59(7):585–585.
25. Fraser C.G. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2011, 50(5):807–12.
26. Iglesias Canadell N., Hyltoft Petersen P., Jensen E., Ricós C., Jørgensen P.E. Reference change values and power functions. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42(4):415–22.
27. Biosca C., Ricós C., Lauzurica R., Galimany R., Hyltoft Petersen P. Reference change value concept combining two delta values to predict crises in renal posttransplantation. *Clin Chem* 2001, 47(12):2146–2148.
28. Walton R.M. Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. *Vet Clin Pathol* 2012, 41(2):175–81.
29. Lund F., Petersen P.H., Fraser C.G., Sölétormos G. Calculation of limits for significant bidirectional changes in two or more serial results of a biomarker based on a computer simulation model. *Ann Clin Biochem* 2015, 52(Pt 4):434–40.
30. Fraser C.G. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42:758-764.
31. Flatland B., Baral R.M., Freeman K.P. Current and emerging concepts in biological and analytical variation applied in clinical practice. *J Vet Intern Med* 2020, 34(6):2691–700.