



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"USO DE MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA OBTENER VALORES DE REFERENCIA EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS"

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

Presenta:

GABRIELA RUIZ MEJÍA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MAYO DE 2000

No Adq. H.63354
No. Título TS
Clas. 616-075602L
R934u



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"USO DE MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA OBTENER VALORES DE REFERENCIA EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS"

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

Presenta:

GABRIELA RUIZ MEJÍA

Dirigido por:

DR. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO

SINODALES

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Presidente

Dra. Victoria Valles Sánchez
Propietario

Q.B. Patricia Villalobos Aguilera
Propietario

Q.B. Sergio Pacheco Hernández
Suplente

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MAYO DE 2000.

DEDICATORIAS

A DIOS : POR CONCEDERME LA VIDA Y FORTALEZA PARA ALCANZAR ESTA META.

A MI PADRE: POR SU EJEMPLO DE TENACIDAD Y SUPERACION AUN EN LAS CIRCUNSTANCIAS ADVERSAS.

A MI MADRE: POR SU FORTALEZA, DEDICACION Y ENTREGA A LA FAMILIA.

A MI HERNANA LILIANA: MI ANGEL GUARDIAN QUE ME ACOMPAÑA SIEMPRE DESDE ALGUN LUGAR.....

A MI ABUELITA ANITA Y MI TIA CLARITA: POR SER MI SEGUNDA FAMILIA.

A FABRICIO GONZALEZ: POR SU PRESENCIA Y APOYO CONSTANTE.

AL DR. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO: POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS DANDO EJEMPLO DE CONSTANCIA Y DISCIPLINA.

A LA Q.F.B ADRIANA DIAZ JIMENEZ Y A LA DRA. OLGA A. ORTEGA CARBALLO POR SU VALIOSA AMISTAD A LO LARGO DE MI VIDA.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO CLINI-LAB, EN ESPECIAL A LA Q.B. NORMA GLORIA PATRÍCIA HERRERA PEREZ POR SU AMISTAD Y APOYO.

AGRADECIMIENTOS

AL DR. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO POR SU VALIOSA PARTICIPACION COMO DIRECTOR DE ESTA TESIS APLICANDO SUS CONOCIMIENTOS EN EL TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS LO CUAL FUE PARTE MEDULAR DEL TRABAJO.

A LA DRA. VICTORIA VALLES SANCHEZ POR REVISAR DETALLADAMENTE ESTE TRABAJO APORTANDO CON SU GRAN EXPERIENCIA, COMENTARIOS VALIOSOS PARA DARLE UN VALOR IMPORTANTE A ESTA TESIS.

A LA Q.B. PATRICIA VILLALOBOS Y AL Q.B. SERGIO PACHECO HERNANDEZ POR APORTAR SUS COMENTARIOS ACERTADOS AL REVISAR ESTE TRABAJO REFLEJANDO SU EXPERIENCIA ADQUIRIDA A LO LARGO DE SU VIDA PROFESIONAL.

A LA Q.B. NORMA GLORIA PATRICIA HERRERA PEREZ DIRECTORA DEL LABORATORIO CLINI-LAB, POR SU APOYO AL PROPORCIONAR LOS DATOS AQUÍ PROCESADOS; PUES SIN ÉSTA APORTACIÓN, NO EXISTIRÍA ESTE TRABAJO.

A TODOS MIS MAESTROS DE LA FACULTAD POR APORTAR SUS CONOCIMIENTOS PARA MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

INDICE GENERAL

	Pág.
Indice de Cuadros	iv
Indice de Figuras	v
I.- RESUMEN	
II.- INTRODUCCION	1
A.- Antecedentes	4
1.- Definiciones	6
2.- Producción de Valores de Referencia	8
3.- Uso y presentación de valores de referencia	10
4.- Tipos de Valores de Referencia	11
5.- Selección de individuos de referencia	12
6.- Criterios de Exclusión y partición	13
B.- Justificación	17
III.- OBJETIVOS	18
A.- General	18
B.- Específicos	18
IV.- MATERIALES Y METODOS	18
A.- Análisis de las muestras	19
1.- Glucosa	19
2.- Urea	20
3.- Creatinina	20
4.- Acido úrico	21
5.- Colesterol	21
6.- Triglicéridos	21
7.- Hemoglobina	22
8.- Hematocrito	22

	Pág.
B.- Selección de individuos de referencia	24
1.- Glucosa	24
2.- Urea	25
3.- Creatinina	26
4.- Acido úrico	27
5.- Colesterol	28
6.- Triglicéridos	29
7.- Hemoglobina	31
8.- Hematocrito	32
C.- Obtención de intervalos de referencia univariados y regiones de referencia multivariadas	34
1.- Intervalos de referencia univariados	34
2.- Regiones de Referencia multivariadas	35
D.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio	36
V.- RESULTADOS	38
A.- Selección de individuos de referencia	38
B.- Obtención de intervalos de referencia univariados y Regiones de referencia multivariadas	52
1.- Intervalos de referencia univariados	52
2.- Regiones de referencia multivariadas	54
C.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio	57
VI.- DISCUSIONES	63
A.- Selección de individuos de referencia	63
B.- Obtención de intervalos de referencia univariados y Regiones de referencia multivariadas	63
1.- Intervalos de referencia univariados	63
a) Glucosa	63
b) Urea	65
c) Creatinina	66
d) Acido úrico	67

	Pág.
e) Colesterol	69
f) Triglicéridos	74
g) Hemoglobina y hematocrito	75
2.- Regiones de referencia multivariadas	78
C.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio	84
VII.- CONCLUSIONES	87
A.- Selección de individuos de referencia	87
B.- Obtención de intervalos de referencia univariados y Regiones de referencia multivariadas	87
1.- Intervalos de referencia univariados	87
2.- Regiones de referencia multivariadas	88
C.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio	88
VIII.- SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	90
IX.- ANEXOS	93
A.- Métodos estadísticos	93
A.1.- El estimador MCD	93
A.2.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio	96
B.- Control de Calidad en el laboratorio clínico	101
X.- BIBLIOGRAFIA	106

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1.- Algunos criterios de exclusión para ser considerados individuos de referencia en cada componente bioquímico analizado.	33
Cuadro 2.- Comparativo de intervalos de referencia.	53
Cuadro 3.- Prevalencia de hipercolesterolemia en México.	73

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Histogramas de frecuencia para glucosa	42
Figura 2.- Histogramas de frecuencia para urea	43
Figura 3.- Histogramas de frecuencia para creatinina	44
Figura 4.- Histogramas de frecuencia para ácido úrico	45
Figura 5.- Histogramas de frecuencia para colesterol	46
Figura 6.- Histogramas de frecuencia para triglicéridos	47
Figura 7.- Histogramas de frecuencia para hematocrito en varones	48
Figura 8.- Histogramas de frecuencia para hematocrito en mujeres	49
Figura 9.- Histogramas de frecuencia para hemoglobina en varones	50
Figura 10.- Histogramas de frecuencia para hemoglobina en mujeres	51
Figura 11.- Histogramas de frecuencia para hemoglobina en varones	55
Figura 12.- Histogramas de frecuencia para hematocrito en varones	55
Figura 13.- Gráfica de correlación entre hemoglobina y hematocrito en varones	56

	Pág
Figura 14.- Elipse que representa la región de referencia multivariada para hemoglobina y hematocrito en varones	56
Figura 15.- Gráfica de Concentración de glucosa a través del tiempo y Gráfica y diferencias observadas en mediciones consecutivas, persona 1	59
Figura 16.- Gráfica de Concentración de glucosa a través del tiempo y Gráfica y diferencias observadas en mediciones consecutivas, persona 8	59
Figura 17.- Gráfica de Concentración de glucosa a través del tiempo y Gráfica y diferencias observadas en mediciones consecutivas, persona 12	60
Figura 18.- Gráfica de Concentración de glucosa a través del tiempo y Gráfica y diferencias observadas en mediciones consecutivas, persona 21	60
Figura 19.- Gráfica de Concentración de glucosa a través del tiempo y Gráfica y diferencias observadas en mediciones consecutivas, persona 22	61
Figura 20.- Gráfica de diferencias observadas en los 32 individuos estudiados	62
Figura 21.- Cuestionario propuesto para seleccionar individuos de referencia	92

I.- RESUMEN

La medición aislada de algún componente bioquímico en cualquier fluido biológico de una persona, no siempre es suficiente para establecer la condición clínica de un paciente. Para esto, necesita comparar el resultado con otro número o rango de valores suponiendo que éstos representan la concentración del componente bioquímico en una condición médica dada.

Es importante que el intervalo de referencia contra el cual se va comparar el resultado de un paciente, sea obtenido para la población a la cual el individuo pertenece. La definición de la población, operativamente puede realizarse a través de la identificación de las características relevantes de los clientes de los laboratorios clínicos, a través de un estudio retrospectivo. De esta manera, las diferencias entre una población y otra son numerosas (genéticas, tipo de alimentación, situación geográfica, estilo de vida, etc.) lo cual hace imposible utilizar los mismos intervalos de referencia en cualquier lugar del mundo.

Actualmente, esta definición de intervalo de referencia univariado, se ha extendido a una región de referencia multivariada con la cual se estudian no a los componentes bioquímicos por separado, sino que se construye con la información de varios componentes bioquímicos correlacionados.

Por otra parte, como la diversidad biológica es grande, hoy en día la tendencia está enfocada a monitorear en el tiempo, la salud de cada paciente en lo individual a partir de una condición clínica inicial de referencia. A partir de las mediciones de algún o algunos componentes bioquímicos durante el monitoreo, se puede establecer qué diferencia es aceptable entre una medición y otra, de tal manera que no sean indicativas de algún proceso anormal, por medio del cual se pueda detectar oportunamente dicho proceso. A tal diferencia se le llama Límite de Referencia para un Cambio.

En el presente trabajo, se aplicaron diversos métodos estadísticos para la obtención de los intervalos de referencia para glucosa, urea, creatinina, ácido

úrico, colesterol, triglicéridos, hemoglobina y hematocrito para la población que acude a un laboratorio clínico de la ciudad de Querétaro.

También se obtuvieron intervalos de referencia univariados y multivariados para hemoglobina y hematocrito en hombres, así como una región de referencia multivariada lo que nos permite evaluar los dos componentes juntos y evitar falsas alarmas en el momento de diagnosticar anemia. Finalmente, se realizó la aplicación del método estadístico para establecer el Límite de Referencia para un Cambio para glucosa en varones sanos.

II.- INTRODUCCION

El papel básico del laboratorio clínico consiste en proporcionar datos cuantitativos y cualitativos de especímenes biológicos, que ayuden al diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades del humano. Las razones por las que se solicitan pruebas de laboratorio a una persona son:

- Diagnosticar enfermedades
- Establecer la severidad de los padecimientos
- Conocer la evolución de los padecimientos
- Evaluar la respuesta al tratamiento
- Determinar la toxicidad de un medicamento
- Investigación
- Prevención de enfermedades
- Estudios epidemiológicos

Para que los análisis sirvan a tales propósitos, es necesario que se considere que existen múltiples fuentes de variación que pueden provocar cambios reales o ficticios en la concentración o actividad de los componentes que se cuantifican, causados por procesos fisiológicos, diferencias genéticas, enfermedades, medicamentos recibidos y factores ambientales.

Una interpretación racional de los resultados del laboratorio exige el conocimiento de la variación de estos componentes en el individuo en estudio, o en uno o más conjuntos de individuos cuya condición clínica esté adecuadamente definida.

Una primera fuente de variación se debe a la inexactitud y/o imprecisión los resultados que emite el laboratorio. Esta variación se logra reducir implementando un programa de control de calidad en el laboratorio. Este programa

comienza aún antes de la toma de muestra (fase pre-examen), continuando durante el manejo de las mismas, su análisis (fase de examen), reporte de resultados al paciente y termina con la adecuada conservación y desecho de dichas muestras (fase post-examen). Un control total de la calidad, incluye las fases pre-examen, fase de examen y post-examen, ya que sólo así podrá garantizarse la confiabilidad de los resultados. Para mayores detalles sobre las fuentes de variación en cada una de estas tres fases del análisis, consultar el anexo de esta tesis.

La medición aislada de algún componente bioquímico en la sangre y orina de un paciente, no siempre es suficiente para establecer la condición clínica de dicha persona. Para esto, necesita comparar el resultado con otro número o rango de valores, suponiendo que éstos representan la concentración del componente bioquímico en una condición médica determinada. Por ejemplo, cuando la condición es la de un sujeto sano, se usa comúnmente un "intervalo normal" para compararlo. Sin embargo, esto también es posible, al menos en un principio, para obtener valores representativos de pacientes con enfermedades específicas. Tomando en cuenta esto, hoy en día los químicos clínicos emplean el término general de "intervalo de referencia".

Por lo tanto, una tarea importante para los químicos clínicos y hematólogos es proporcionar conjuntos relevantes de valores de referencia a partir de conjuntos de individuos con características específicas (Solberg H.E., 1987, Part 1).

Un enfoque racional para proporcionar bases sólidas en la interpretación de los valores observados, reclama una teoría que describa los principios y procedimientos para la selección de poblaciones de referencia y definiciones de los valores de referencia (Solberg H.E., 1987, Part 1).

Con el propósito de definir y estandarizar los criterios para el establecimiento de los valores de referencia, la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), creó en 1970 el Panel de Expertos en Teoría de Valores de Referencia (EPTRV). Este grupo publicó varias recomendaciones provisionales, que fueron aprobadas desde 1986 hasta 1988 y se han traducido a diferentes idiomas.

En estos documentos se señala que es necesario establecer valores de referencia en individuos tan semejantes al paciente o al grupo de pacientes como se pueda, además de que durante el estudio de ambos grupos, se mantengan constantes las condiciones ambientales fisiológicas, del proceso de toma de muestra y del proceso analítico, para que las fuentes de variación sean mínimas y se tenga mayor probabilidad de acertar, al afirmar que si hay diferencias en los resultados de un paciente, con respecto al intervalo de referencia, se debe probablemente a la presencia de una desviación del estado de salud de referencia. Así resulta conveniente establecer valores de referencia para grupos de individuos con características semejantes, por ejemplo, niños, adultos, mujeres menopáusicas, mujeres en una u otra fase del ciclo menstrual, embarazadas, etc.

Otra posibilidad, igualmente propuesta, justificada y con buenos resultados en otros países, es la de evitar la variabilidad biológica, estableciendo valores de referencia individualizados; esto se logra analizando a una persona durante un lapso de ausencia de inestabilidad en su estado de salud, cuyos resultados se utilicen con fines diagnósticos en períodos de inestabilidad.

A.- Antecedentes

Uno de los temas que más se ha estudiado en el laboratorio clínico por su amplia repercusión, es el de los valores de referencia, ya que el resultado de cualquier análisis, por mejor que se haya realizado, no tiene ningún significado si se carece de un punto de comparación que permita decidir si la cifra de un paciente es diferente o no de las personas aparentemente sanas (Solberg H.E., 1987,Part 1).

Hace apenas dos décadas los textos señalaban que era suficiente hacer 20 mediciones para establecer los valores normales y los criterios para definirlos no eran claros. El número de mediciones que actualmente se acepta es mucho mayor y los criterios se han fijado, con el propósito de que la variabilidad biológica no los afecte, ya que aun en una misma persona se pueden presentar cambios significativos si se estudia en diferentes condiciones u horas del día; la variabilidad del proceso analítico y la del tipo de técnica utilizada también puede producir diferencias importantes (PetitClerc C. & Solberg H.E.,1988,Part 3), (McPherson,K. et al , 1978).

Como consecuencia de la diversidad biológica, los intervalos de referencia, que de acuerdo a las recomendaciones internacionales incluyen al 95% de la población estudiada, son amplios, lo que a su vez provoca que con frecuencia, los resultados de algunos enfermos queden dentro del intervalo de referencia. Para evitar este efecto indeseable de la variabilidad biológica sobre el diagnóstico por el laboratorio, actualmente se sugiere que se comparen los resultados de una persona enferma, contra los obtenidos en ella misma, en períodos en los que no estaba enferma; lamentablemente esto no siempre es posible pues en la mayoría de los casos una persona acude a un laboratorio solamente cuando se siente enferma y nunca cuando goza de salud. Por otro lado, sería necesario que la persona fuera siempre al mismo laboratorio donde se

realizaron sus valores de referencia individuales y esto no siempre es posible (Solberg H.E., 1987,Part 1).

Es evidente que la diversidad biológica no se puede evitar, sin embargo, su efecto se puede cuantificar si se establecen intervalos de referencia en grupos de individuos con semejanzas de raza, hábitat, género, edad, hábitos alimenticios y otras características.

Dentro de la diversidad biológica, no son menos importantes las variaciones intraindividuales que generalmente se presentan de manera cíclica, con períodos de un día, semana, meses o estación. Estas variaciones se presentan en mayor o menor grado en diversos componentes de interés clínico, y no se pueden evitar pero su efecto se disminuye, si el paciente se analiza en condiciones semejantes, a las de los individuos estudiados para el establecimiento de los valores de referencia.

Las recomendaciones para el establecimiento de intervalos de referencia corresponden a la etapa pre-examen. A ellas deben sumarse las recomendaciones para limitar las variaciones de la etapa analítica, que también pueden influir de manera importante sobre los resultados. En general, la influencia de estas variaciones sobre los límites de referencia, se disminuye fijando el método de análisis y controlando la calidad analítica, a través del Control de Calidad Interno y Evaluación Externa de la Calidad (Alva S.I., 1995).

Una vez establecidos los límites de referencia, estos tendrán su aplicación en la etapa post-analítica, permitiendo la correcta interpretación de los resultados de los pacientes.

1. - Definiciones

La nomenclatura de uso común para describir la relación entre los valores observados y los valores de referencia es frecuentemente ambigua. Por lo tanto, es importante que sean adoptados para este propósito términos bien definidos.

Los siguientes términos permiten una descripción no ambigua, así como la discusión del tema de los valores de referencia. Se propone que deben realizarse todos los esfuerzos para conseguir su uso generalizado (Solberg H.E., 1987, Part 1).

Un *individuo de referencia* es un individuo seleccionado para compararlo con otros tomando en cuenta un estado de "salud" definido. Generalmente, es importante definir el estado de salud del individuo. Este estado de salud podemos denominarlo estado de referencia.

Estado de referencia: La noción de estado de referencia puede ser usada para facilitar comparaciones de poblaciones y para estudiar la transferibilidad de los datos de los valores de referencia. Para tales comparaciones, la influencia de las variaciones biológicas debe ser mínima

Una *población de referencia* consiste en todos los posibles individuos de referencia. Esta población generalmente tiene un número desconocido de miembros, y por lo tanto es una entidad hipotética.

Una *muestra de referencia* es un conjunto de individuos de referencia seleccionados para representar a la población de referencia. Los individuos de referencia en la muestra deben ser extraídos, idealmente, al azar de la población de referencia.

Un *valor de referencia* es el valor obtenido por la observación o medición de un tipo particular de magnitud, en un individuo perteneciente a la muestra de referencia. El término valor de referencia no debe ser confundido con el término límite de referencia.

Una *distribución de referencia* es la distribución estadística de los valores de referencia. Los parámetros de la distribución de referencia hipotética de la población de referencia deben ser estimados usando la distribución de referencia de la muestra de referencia y métodos estadísticos adecuados.

Un *límite de referencia* es deducido de la distribución de referencia, el cual determina una región de "normalidad" respecto al grupo de referencia preestablecido.

Un *intervalo de referencia* es el intervalo entre dos límites de referencia incluyendo a éstos. Generalmente incluye el 95% de los datos. Desde el punto de vista estadístico, los intervalos de referencia son llamados intervalos de tolerancia que son contruidos para contener o cubrir al menos una proporción especificada de la población objetivo con una confianza dada. También es posible visualizar a los intervalos de referencia como un intervalo de predicción que contenga todas o la mayoría de las observaciones de una muestra futura con una confianza dada.

Los valores observados en un individuo, son valores de un tipo particular de magnitud, obtenidos por observación o medición y producidos para obtener una decisión médica. Pueden ser comparados con los valores de referencia, distribuciones de referencia, límites de referencia o intervalos de referencia. Un valor observado más allá de un límite de referencia, sugerirá descriptivamente una situación anormal respecto a la referencia establecida como criterio de comparación (Solberg H.E., 1987, Part 1).

Dentro de las especificaciones que sugiere el EPTRV, en primer lugar deben definirse el propósito por el cual se desea establecer los valores de referencia, ya que los procedimientos para su producción dependen del mismo y también de la magnitud medida.

El EPTRV señala que es posible establecer valores de referencia con muestras de individuos seleccionados *a priori* (prospectivo) o *a posteriori* (retrospectivo), en el primer caso, se seleccionan los individuos de acuerdo a criterios establecidos, con el propósito de asegurar que no sufren alguna patología especial; en el segundo caso se incluyen de entrada, individuos con mediciones disponibles, por ejemplo, aquellos que asisten a los laboratorios para diferentes estudios no necesariamente relacionados con el componente sobre el cual se desea construir un intervalo de referencia; el número de datos necesarios para la muestra seleccionada *a priori* debe ser mayor de 120 y para la muestra seleccionada *a posteriori* mayor de 1000 (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

2.- Producción de valores de referencia

Primero debe definirse explícitamente el propósito y el uso que se pretende hacer de los valores de referencia que uno planea producir. Comúnmente uno reúne los valores de referencia para permitir la evaluación de los valores observados, obtenidos en una situación que puede estar más o menos bien definida. El uso práctico de los valores de referencia debe estar acompañado por calificativos del estado de salud de referencia.

Los procedimientos para la producción de los valores de referencia deben relacionarse con este propósito y pueden ser dependientes del tipo de la magnitud medida. La fuente y la magnitud de la variación no patológica, la localización y descripción de otros conjuntos de valores de referencia relevantes

obtenidos de varias clases clínicas y la relación costo-beneficio de la clínica y del laboratorio influirán en el procedimiento y el uso de los valores de referencia.

Los valores de referencia de un individuo o un grupo de individuos son significativos sólo cuando el/los individuo(s) y los métodos de producción de los valores son descritos adecuadamente. De esta manera, es esencial que se tomen en cuenta los factores que propone el EPTRV, y sean especificados cuando se establezcan y usen los valores de referencia:

- Los criterios de inclusión y exclusión para definir a la población de referencia.
- El o los criterios de partición usados para caracterizar los subconjuntos de la población de referencia con respecto a edad, género, grupos étnicos, factores genéticos y socio-económicos, etc.
- Las condiciones fisiológicas y ambientales de la población de referencia, previas y durante el momento en que se obtuvieron los especímenes.
- El procedimiento de obtención del espécimen, incluyendo la preparación del individuo, sitio de obtención (punción de la piel o sangre venosa), manipuleo y almacenamiento del espécimen.
- El método analítico usado, incluyendo detalles de su límite de detección, especificidad, precisión y exactitud con especial énfasis de las variaciones a largo plazo si la población o los individuos son estudiados a través de un periodo de tiempo largo.

Los métodos estadísticos empleados para la estimación de los valores de referencia (Solberg H.E., 1987, Part 1).

3.- Uso y presentación de los valores de referencia

El problema por resolver es: dado un valor observado de un individuo en particular, ¿cómo puede ser comparado y ubicado en relación con una distribución de referencia?

Los métodos de comparación de los valores observados con los valores de referencia pueden ser elegidos de acuerdo con los objetivos por alcanzar.

Por ejemplo:

- ◆ Estudio de cambios fisiológicos
- ◆ Detección precoz de la enfermedad.
- ◆ Diagnóstico diferencial.
- ◆ Monitoreo de respuesta a la terapia.
- ◆ Estudio del efecto de la influencia ambiental.

Cuando son encontradas diferencias entre los valores observados y los valores de referencia, es importante darse cuenta de que una diferencia estadísticamente significativa no implica necesariamente significación médica. El significado estadístico sólo es descriptivo. La importancia interpretativa está basada en consideraciones bioquímicas, fisiológicas o clínicas. Es responsabilidad del bioquímico clínico, el ayudar a los médicos en la interpretación de los valores observados mediante la provisión de valores de referencia adecuados y su presentación en una forma conveniente y práctica (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

4.- Tipos de valores de referencia

Los valores de referencia pueden ser clasificados en categorías de acuerdo con criterios diferentes, por ejemplo, valores de referencia de una población o de un individuo, que pueden ser univariados (cuando se toma en cuenta la cantidad o actividad de un solo componente bioquímico) o multivariados (cuando se toma en cuenta la cantidad o actividad de dos o más componentes bioquímicos correlacionados clínicamente) y especificados o inespecificados en el tiempo.

Los valores de referencia de poblaciones, univariados e inespecificados en el tiempo, son producidos a través de especímenes recogidos de varios individuos de referencia sin consideración de los ritmos biológicos.

Los valores de referencia individualizados para un sujeto, se obtienen de valores precisos y previos del mismo individuo, obtenidos cuando él/ella estaban en un estado de salud definido. La comparación de los valores observados con los valores de referencia basados en sujetos, es un método más sensible para la detección de cambios en el estado bioquímico o fisiológico, debido a que generalmente la variabilidad es menor en un individuo que entre individuos. Los intervalos de referencia basados en sujetos, pueden ser construidos sobre la base de análisis estadísticos seriados en el tiempo (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

El término valores de referencia multivariados denota que los resultados de dos o más tipos de magnitudes (ya sea actividad o cantidad de un componente bioquímico) obtenidas del mismo conjunto de individuos de referencia, son tratados tomando en cuenta la correlación clínica existente entre los componentes bioquímicos estudiados. Esto puede solucionar el problema de las falsas altas proporciones de patrones denominados "falsos positivos" observados

en varios proyectos de *screening* multifásicos. En general, la causa de este fenómeno es el incremento en la probabilidad de que al menos en un caso salga de su intervalo de referencia. Un procedimiento mejor es definir regiones de referencia multivariadas y usar estas regiones como base para la comparación.

Los valores de referencia especificados en el tiempo son recogidos en tiempos definidos en relación con ritmos biológicos. En efecto, ritmos de diferentes frecuencias caracterizan a la mayoría, sino a todos, los sistemas biológicos. Los ritmos no son meramente el efecto de la alimentación, actividad, clima o factores fisiológicos, sino que también permanecen manifiestos en ausencia de ciclos ambientales. Teniendo en cuenta la variabilidad predecible de los períodos especificados en el tiempo, mediante la aplicación de procedimientos matemáticos y estadísticos adecuados se pueden obtener valores de referencia para estos casos (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

5. - Selección de los individuos de referencia

A menudo, el límite entre salud y enfermedad es difuso, especialmente en relación con el envejecimiento. Los valores de referencia pueden ser usados para evaluar el estado de salud de individuos y poblaciones, para identificar gente con riesgo para una enfermedad, para ayudar en las decisiones en medicina clínica y con varios propósitos científicos. Debe comprenderse que en la selección de los individuos de referencia el criterio de salud aplicado está dictado por el objetivo de la investigación del laboratorio. De este modo, los individuos de referencia no siempre serán individuos sanos.

La selección de individuos para la producción de valores de referencia ha sido enfocada desde muchos ángulos, de acuerdo con las diferentes filosofías, necesidades y recursos disponibles. Son usados dos tipos de selección:

- Selección *a posteriori* (retrospectiva) de individuos de una gran muestra de población obtenida al azar o no al azar, seguida por la partición (agrupamiento) y exclusión de acuerdo a las características del grupo muestra de referencia. El criterio de partición y exclusión diferirá dependiendo del tipo de magnitud a ser estudiada. En este caso los datos que se utilizan ya existen pues los componentes bioquímicos fueron medidos con anterioridad.
- La selección *a priori* (prospectiva) de una población general usando criterios de exclusión y partición establecidos, determinados por estudios previos sobre la misma población, u obtenidos de la literatura. En este caso, la selección de individuos se realiza antes de generar los datos; es decir, antes de medir los componentes bioquímicos de interés.

Una selección *a priori* es más conveniente, pero requiere conocer o fijar arbitrariamente los criterios de partición y exclusión. En la medida que haya más datos disponibles a partir de la literatura, este tipo de selección se verá ampliamente favorecida.

Para ambos tipos de selección, el tamaño de las muestras es determinado por la naturaleza del criterio de exclusión y por el número de criterios de partición a ser aplicados. La selección *a posteriori* es más conveniente para la producción de valores de referencia de individuos sanos, pero la selección *a priori* podría ser aplicada a todas las situaciones.

6.- Criterios de exclusión y de partición

Muchos factores contribuyen a la variabilidad biológica y pueden causar la exclusión o la partición (agrupamiento) de los individuos de referencia. Además, el uso que se hará de los valores de referencia determinará el criterio de exclusión a ser aplicado. Por ejemplo, los estudios epidemiológicos y los programas de medicina preventiva requieren valores de referencia de individuos sanos, así es que necesitan la exclusión de individuos que padezcan de

enfermedades sistémicas y desórdenes fisiopatológicos. Otro ejemplo es la situación en donde una decisión médica necesita de valores de referencia que discriminen entre desórdenes específicos.

De esta manera, en base al estado de referencia a partir del cual se obtendrán los valores de referencia, determinaremos qué factores afectan a dicho estado de referencia, de tal manera que individuos que presenten esos factores deberán ser excluidos de la muestra de referencia. Por otro lado, una vez aplicados los criterios de exclusión, se determinará si es necesario agrupar (particionar) la muestra de referencia formando grupos de individuos con alguna característica en común para observar el efecto de esta característica en el o los componentes bioquímicos estudiados (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

Así es que, dependiendo del uso pretendido para los valores de referencia y del tipo de magnitud medida, deberían ser aplicados algunos o todos los criterios de exclusión o partición que se mencionan más adelante Propuestos por el EPTRV. De lo contrario, los valores medidos pueden mostrar desplazamientos y/o dispersión aumentada.

Para propósitos específicos, los criterios descritos a continuación pueden ser considerados como criterios de partición o exclusión dependiendo del grupo de individuos estudiados y del o los componentes bioquímicos estudiados.

Estados fisiopatológicos. Los individuos que padecen enfermedades sistémicas y desórdenes fisiopatológicos tales como falla renal, enfermedad cardíaca congestiva, enfermedades respiratorias crónicas, enfermedades hepáticas, síndromes de malabsorción y anemias nutricionales deberían ser detectados mediante exámenes clínicos, investigación del laboratorio y/o cuestionarios, en el momento de la entrevista y de la obtención de la muestra.

La extensa lista de criterios de exclusión y partición preparada por el Comité Escandinavo sobre Valores de Referencia puede ser usada como una guía cuando se definan los criterios a ser usados en un proyecto real.

Ingestión de agentes activos farmacológicamente. Deben ser considerados los individuos que reciban agentes para tratamiento de enfermedades, así como terapia de suplementación o sustitución, o abuso de drogas. La lista de agentes también incluye anticonceptivos orales, alcohol y tabaco. Estas sustancias pueden alterar la fisiología y el metabolismo de los individuos, así como los valores en sangre y en orina de muchos componentes bioquímicos.

Estados fisiológicos modificados. Los individuos deben ser excluidos o agrupados si pertenecen a cualquiera de las categorías siguientes:

- Embarazo(puede inducir importantes cambios hormonales, metabólicos y fisiológicos).
- Ejercicio o actividad física.
- Desórdenes mentales y psicológicos como estrés y depresión.
- Ingestión de alimentos previa a la obtención de la sangre .

Otros factores. La obesidad, la hipertensión y otros factores todavía no identificados pueden indicar que el individuo presenta riesgo para enfermedades determinadas y pudiera ser necesario agruparlos o excluirlos del grupo muestra de referencia (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

La necesidad de particionar los grupos de referencia puede diferir con las cantidades medidas y con los usos pretendidos para los valores de referencia. Las subclasificaciones deberían estar limitadas a los valores de

referencia que exhiben diferencias significativas en ubicación y dispersión. Estos criterios pueden ser los siguientes:

Edad y género. La edad no debe necesariamente estar categorizada mediante intervalos iguales. Los intervalos de edad deben ser elegidos teniendo en cuenta la variación de la cantidad medida con la edad; deberían ser particularmente pequeños sobre períodos tales como la pubertad y la menopausia. La edad ósea, altura y masa corporal son mejores indicadores que la edad real para categorizar a los niños. Las variaciones debidas a desviaciones de la masa corporal ideal deben ser distinguidas de los cambios con la edad y/o el género.

Criterio genético, socioeconómico y ambiental. Para algunas cantidades puede ser necesaria la subclasificación de acuerdo a orígenes étnicos, ubicación geográfica, morfológica o pigmentación. Los marcadores genéticos, tales como los grupos sanguíneos (ABO) y los antígenos de histocompatibilidad (HLA), pueden ser más adecuados. La presencia o ausencia de fenotipos de proteínas plasmáticas y las enzimas tisulares podrían ser útiles para obtener grupos muestra de referencia homogéneos. En algunos casos, la adaptación de los individuos a su entorno ecológico, así como a su nivel socioeconómico, puede ser el origen de grandes diferencias: la concentración de colesterol en suero de los nativos de Asia y las inmunoglobulinas de los negros de Africa antes y después de la emigración hacia Europa o América, por ejemplo. Los efectos dietarios a largo plazo también deben ser considerados separadamente de aquéllos a corto plazo.

Criterios biológicos. La hemodinamia, perfusión renal y balance hormonal son diferentes cuando el sujeto se encuentra parado o recostado. Siempre que esté indicado, se deben seleccionar grupos de individuos ambulantes o que están hospitalizados (PetitClerc C. & Solberg H.E., 1987, Part 2).

B.- Justificación

En la mayoría de los laboratorios clínicos mexicanos se utilizan los que señalan los instructivos de los reactivos, que generalmente son fabricados en otros países y corresponden, seguramente, a individuos con diferencias múltiples, como la raza, las costumbres alimenticias, etc: Ante esta situación, es preferible que cada laboratorio determine sus valores de referencia.

Para realizar esto, es necesario que se desarrollen programas estadísticos para computadora que permitan explotar las bases de datos de los laboratorios para conocer y estudiar la población que acude a ellos y obtener información valiosa a partir de ellos. De esta manera podemos evaluar a la población y observar la prevalencia de algunas enfermedades y obtener intervalos de referencia.

En países en vías de desarrollo, como México, el establecimiento de intervalos de referencia ha sido lento. Resulta urgente que en cada uno de esos países, y más aún, que en cada población de los mismos, se establezcan los valores de referencia, bajo criterios estandarizados. Por esa razón en el presente trabajo se pretende establecer valores de referencia para diversos parámetros de Química Clínica en la población de un laboratorio clínico privado de la zona urbana de la ciudad de Querétaro.

III.- OBJETIVOS

A.- General

Establecer valores de referencia para glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, hemoglobina y hematocrito, en la población que acude a un laboratorio clínico privado de la Ciudad de Querétaro a realizarse dichos estudios, utilizando diversos tipos de herramientas estadísticas desarrolladas para el caso.

B.- Específicos

1. Observar el efecto de edad y género en el establecimiento de valores de referencia para cada parámetro estudiado.
2. Identificar el efecto de algunas de las patologías más frecuentes en el laboratorio clínico estudiado, en relación con el establecimiento de valores de referencia para cada parámetro.
3. Elaborar cuestionarios dirigidos a los pacientes que acuden al laboratorio con el fin de utilizar la información obtenida de la selección *a priori* de individuos de referencia.
4. Observar la diferencia entre los valores de referencia establecidos en el laboratorio clínico estudiado y los valores de referencia establecidos en los insertos de los equipos de reactivos utilizados para cada determinación.
5. Obtener regiones multivariadas de referencia para algunos de los componentes estudiados.
6. Estudiar la aplicación de la metodología para obtener un límite de referencia para un cambio en valores consecutivos de un individuo.

IV.- MATERIALES Y METODOS

Se analizó una muestra de la población queretana, seleccionada *a posteriori*; constituida por 1474 mujeres, y 1049 hombres, todos ellos mayores de 14 años, que asistieron al laboratorio "CLINI-LAB" de la Ciudad de Querétaro, Qro. Todos los pacientes habitan en zonas urbanas de la Ciudad de Querétaro y algunos municipios urbanos y rurales de este estado. La mayoría pertenecen a la clase social media.

La punción venosa se realizó entre las 7 y las 10 de la mañana, con ayuno previo de toda la noche. Se utilizaron tubos al vacío sin anticoagulante para las determinaciones de Química Clínica (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y triglicéridos) y tubos al vacío utilizando como anticoagulante EDTA para las determinaciones de hematología (hemoglobina y hematocrito). Las muestras para las determinaciones de Química Clínica se centrifugaron para separar los sueros los cuales se utilizaron para cuantificar los 6 componentes bioquímicos mencionados anteriormente. Para las determinaciones de hemoglobina y hematocrito se utilizó sangre total.

A.- Análisis de las muestras

Al suero de cada paciente, se le cuantificó el/los componentes bioquímicos solicitados en la orden médica. Las muestras de bioquímica clínica se analizaron en un equipo automatizado Microlab 100 de acuerdo con los siguientes métodos:

1.- GLUCOSA: Se utilizó el equipo Glucosa Trinder Merck (GOD-PAP) siguiendo las instrucciones del equipo.

País de origen del equipo: Alemania

Fundamento: La glucosa es oxidada por la enzima glucosa oxidasa (GOD) liberando peróxido de hidrógeno; éste reacciona con fenol y 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (POD), dando un colorante rojo violeta de antipirilquinonimina en cantidad proporcional a la glucosa presente en la muestra. La reacción se lleva a cabo a 37°C.

2.- UREA: Se utilizó el equipo para determinación de urea mediante el método de la ureasa UV a tiempo fijo de Serapak, Bayer Corporation, siguiendo las instrucciones del equipo.

País de origen del equipo: EUA.

Fundamento: La urea se hidroliza, en presencia de ureasa, de amoníaco y bióxido de carbono. El amoníaco producido en esta reacción se combina con acetoglutarato y NADH en presencia de deshidrogenasa de glutamato y NAD. La cantidad consumida de NADH, determinada por la disminución de absorbancia en ultravioleta, es proporcional a la cantidad de urea en la muestra. La reacción se lleva a cabo entre 30-37°C.

3.- CREATININA: Se utilizó el equipo de la marca Merck para determinación de creatinina según la reacción de Jaffé.

País de origen del equipo: Alemania

Fundamento

La creatinina forma en solución alcalina con ácido pícrico, un compuesto de color anaranjado amarillento. Debido a la baja concentración de ácido pícrico utilizado en este método no se produce precipitación de proteínas. La concentración del complejo colorido producido en un determinado tiempo de reacción, corresponde a la concentración de creatinina.

Debido al transcurso rápido de la reacción entre la creatinina y el ácido pícrico no infieren reacciones secundarias que inician mas tarde, por lo cual, el método se distingue por su mayor especificidad. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente.

4.- ACIDO URICO: Se utilizó el equipo de Serapak Bayer Corporation para determinación de ácido úrico mediante el método enzimático colorimétrico.

País de origen del equipo: EUA

Fundamento: El ácido úrico es convertido por uricasa en alantoina y peróxido de hidrogeno el cual, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno (4-aminofenazona-7,3-hidroxi-2,4,6 ácido triodobenzoico) formando un compuesto rojo. La reacción se lleva a cabo a 37°C.

5.- COLESTERÓL: Se utilizó el equipo de Serapak Bayer Corporation para determinación de colesterol con el método enzimático colorimétrico siguiendo las instrucciones del equipo.

País de origen del equipo: EUA

Fundamento: Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol éster hidrolasa a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre existente, conjuntamente con el producido por esta reacción, es oxidado por la colesterol-oxidasa-4-colestenona y peróxido de hidrógeno 1-3. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno (4-aminofenazona/ac. 2-hidroxifenilacético) a un compuesto de color rojo. La reacción se lleva a cabo a 37°C.

6.- TRIGLICERIDOS: Se utilizó el equipo de Serapak Bayer Corporation para determinación de triglicéridos por el método enzimático colorimétrico.

País de origen del equipo: EUA

Fundamento: El glicerol liberado en la hidrólisis de los triglicéridos por la lipoproteínlipasa, se convierte, mediante la glicerolquinasa, en glicerol-3-fosfato, que se oxida a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno en presencia de la glicerolfosfato oxidasa. Ante la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida al cromógeno N-etil-N-(3sulfopropil)-m-anasidina-aminofenazona a un compuesto de color violeta.

Para la determinación de estos componentes bioquímicos se calibró cada 6 días el aparato analizador con los estándares incluidos en cada equipo. Se manejó control de calidad interno mediante el uso de sueros estandarizados comerciales a los cuales se les mide cada analito y con dichas mediciones se realizan gráficas de Levey-Jennings para evaluar la exactitud y la precisión. También se da mantenimiento preventivo cada 6 meses al equipo utilizado en la medición de estos analitos. El control de calidad externo se llevó a cabo mediante la determinación de estos parámetros en sueros control proporcionados por el programa PECEL del Instituto Politécnico Nacional y por la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica (AMBC) cada mes.

Las muestras para las determinaciones de hemoglobina y hematocrito se procesaron de la siguiente manera:

7.- HEMOGLOBINA: Se utilizó el equipo de Merck para determinación de hemoglobina por el método de la Cianometahemoglobina siguiendo las instrucciones del equipo.

País de origen del equipo: Alemania.

Fundamento: La hemoglobina de los eritrocitos reacciona con el cianuro de potasio formando el compuesto de cionometahemoglobina que se detecta a 545 nm en el espectrofotómetro Perkin Elmer Coleman Jr. II. Se realiza curva de calibración con las soluciones estándares de hemoglobina-cianuro para obtener las concentraciones de hemoglobina para cada paciente a partir de la absorbancia leída en el espectrofotómetro.

8.- HEMATOCRITO: Para esta determinación, la sangre se mezcla perfectamente bien y se llena con ella un tubo capilar con heparina hasta tres cuartas partes de su capacidad. Se coloca el capilar en la centrífuga para hematocrito y se centrifuga durante 5 minutos. Las células se sedimentarán de tal forma que se tendrá un

paquete de eritrocitos, encima de éste un paquete de glóbulos blancos, después el de plaquetas y finalmente el plasma. Lo que nos interesa en este caso, es el paquete de eritrocitos y se expresa en porcentaje.

El control de calidad interno para estos dos últimos analitos, se realiza , en el caso de la hemoglobina, calibrando cada 6 meses el equipo utilizado en la medición de este analito y determinando la concentración de soluciones estandarizadas y graficando los datos en cartas de control de calidad (Levey-Jennings); mientras que para el hematocrito, un especialista realiza la calibración de la microcentrífuga cada 6 meses .

Cada mes se evalúa la calidad en la determinación de estos dos parámetros de hematología a través del Programa de Evaluación Externa de la Calidad Entre Laboratorios (PECEL) y El Programa de Control de Calidad de la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica (AMBC).

De esta población total, se cuenta con datos tales como género y edad de cada individuo, patología, probable diagnóstico, estado fisiológico (embarazo), etc., y las determinaciones bioquímicas que se le realizaron. en algunos casos se determinaron los 8 parámetros que estamos estudiando, pero en otros solamente algunos de ellos.

B.- Selección de los individuos de referencia

Para este trabajo se realizó una selección *a posteriori* o *retrospectiva*, pero se tomaron en cuenta datos clínicos de cada individuo para realizar una exclusión de personas cuyos datos clínicos pudieran interferir en la obtención de valores de referencia para individuos sanos.

Primero se agruparon los individuos por componente (glucosa, urea, etc.), y también por patologías. De esta manera, se procedió a establecer criterios de exclusión para cada grupo. Los criterios se establecieron tomando en cuenta la patología que presentaba cada individuo, y consultando la bibliografía se determinó si afectaba a ese componente bioquímico o no. Si lo afectaba, ese individuo no se incluía en la población de referencia para ese componente. Hasta donde fue posible, se hicieron las exclusiones basándose en los siguientes factores que afectan cada componente bioquímico:

1.- **GLUCOSA:** La hiperglucemia y la hipoglucemia son signos específicos de metabolismo anormal de la glucosa. Estas situaciones se pueden presentar en los siguientes casos (Krupp M.A., 1986) :

a) Elevaciones:

- a.1) En la diabetes mellitus
- a.2) Hipertiroidismo
- a.3) Hiperactividad de la corteza suprarrenal
- a.4) Hiperpituitarismo
- a.5) Hepatopatías

b) Disminuciones:

- b.1) En el hiperinsulinismo
- b.2) Insuficiencia suprarrenal
- b.3) Hipopituitarismo
- b.4) Insuficiencia hepática
- b.5) Hipoglucemia funcional

b.6) Efecto de agentes hipoglucémicos

c) Efectos de los medicamentos:

c.1) Se eleva con los corticosteroides, clorotalidona, diuréticos, anticonceptivos.

c.2) Disminuye con el acetaminofén, propranolol, fenacetina y ciproheptadina.

Por lo tanto, de las patologías identificadas en nuestro grupo de individuos a los que se les determinó glucosa en suero no serán incluidas las siguientes: cefalea, diabetes, hepatopatías, embarazadas, hipertiroidismo, Hipertensión Arterial (HTA), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), nefropatías, y probables diabéticos. No se indica que haya diferencia significativa entre géneros o edades, pero se excluyeron individuos menores de 14 años.

2.- UREA: Ciertos estados fisiológicos y patológicos influyen en los valores de urea (Krupp M.A., 1986):

a) Elevaciones:

a.1) Insuficiencia renal

a.2) Nefritis aguda y crónica

a.3) Insuficiencia renal aguda

a.4) Obstrucción de las vías urinarias.

a.5) Aumento del metabolismo nitrogenado asociado con disminución del flujo renal sanguíneo o función renal alterada

a.6) Deshidratación de cualquier índole

a.7) Hemorragia gastrointestinal.

a.8) Disminución del flujo sanguíneo renal: Choque, insuficiencia suprarrenal, insuficiencia cardíaca congestiva.

b) Disminuciones:

- b.1) En la insuficiencia hepática
- b.2) Nefrosis no complicada por insuficiencia renal
- b.3) Caquexia

c) Efecto de los medicamentos

- c.1) Elevada por muchos antibióticos que alteran la función renal, guanetidina, metildopa, propranolol y diurético potentes

Por lo tanto se excluyen las siguientes patologías de este grupo: diabetes, Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo (EMTC), faringitis, hepatopatía, Hipertensión Arterial (HTA), Lupus Eritematoso Sistémico (LES). No se menciona que exista diferencia significativa entre género o edades, pero se excluyeron individuos menores de 14 años.

3.- CREATININA: La depuración de creatinina es una cuantificación aceptable de la tasa de filtración glomerular. Ciertos estados fisiológicos y patológicos influyen en los valores de creatinina en el suero (Krupp M.A., 1986):

a) Elevaciones:

- a.1) En la insuficiencia renal aguda o crónica
- a.2) Obstrucción de las vías urinarias
- a.3) En los trastornos de la función renal provocados por algunos medicamentos.

b) Disminuciones:

- b.1) Los valores menores de 0.7 mg/dl no son de importancia conocida.

c) Efecto de medicamentos:

c.1) Se eleva con el ácido ascórbico, barbitúricos, salicilatos, metildopa, los cuales causan interferencia en el método para determinar creatinina.

Por lo tanto se excluyen de este grupo individuos con Diabetes, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Enfermedad Mixta de Tejido Conjuntivo (EMTC) y nefropatías. Existe diferencia entre géneros y edades menores a 14 años.

4.- ACIDO URICO: Un aumento de la concentración del ácido úrico en el plasma o suero puede acompañar al catabolismo aumentado de las nucleoproteínas (discrasias sanguíneas, terapéutica con medicamentos antileucémicos), al uso de diuréticos tiacídicos o la disminución de la excreción renal. Los siguientes factores afectan los valores de Acido úrico en el suero (Krupp M.A., 1986):

a) Elevaciones:

- a.1) En la gota
- a.2) Toxemia del embarazo (eclampsia)
- a.3) Leucemia
- a.4) Policitemia
- a.5) Terapéutica con agentes antileucémicos
- a.6) Diversos medicamentos
- a.7) Insuficiencia renal
- a.8) Enfermedad por almacenamiento de glucógeno
- a.9) Síndrome de Lesch-Nyhan ligada al cromosoma X
- a.10) Síndrome de Down.

a.11) Es mayor la frecuencia de hiperuricemia en los filipinos que en sujetos de raza blanca.

b) Disminuciones:

b.1) En la hepatitis aguda (en ocasiones)

b.2) En el tratamiento con alopurino o probenecid.

c) Efecto de medicamentos:

c.1) Elevado por los salicilatos,tiacidas, furosemida, ácido ascórbico,etc.

c.2) Disminuye con metildopa, clofibrato, cincofeno y fenotiacinas.

Por lo tanto se excluyen de este grupo individuos con artralgias, hepatopatía, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Hipertensión Arterial (HTA), leucemia, nefropatía. Hay diferencia entre géneros, por lo que se excluyen individuos menores de 14 años y la población total se particiona en hombres y mujeres.

5.- COLESTEROL: Las concentraciones de colesterol son determinadas por funciones metabólicas que se ven influidas por la herencia, nutrición, función endócrina, y la integridad de los órganos vitales como el hígado y el riñón. Algunas elevaciones y disminuciones de su concentración en suero se deben a (Krupp M.A., 1986):

a) Elevaciones:

a.1)En al hipercolesterolemia familiar (xantomatosis)

a.2) Hipotiroidismo

a.3) Diabetes mellitus mal controlada

a.4) Síndrome nefrótico

a.5) Hepatitis crónica

a.6) Cirrosis biliar

- a.7) Ictericia obstructiva
- a.8) Hipoproteinemia (idiopática, con nefrosis o hepatitis crónica).
- a.9) Lipemia(idiopática, familiar).

b) Disminuciones:

- b.1) En la hepatitis aguda
- b.2) Enfermedad de Gaucher
- b.3) Ocasionalmente en el hipertiroidismo
- b.4) Infecciones agudas
- b.5) Anemia
- b.6) Malnutrición
- b.7) Deficiencia de apolipoproteína.

c) Efecto de los medicamentos:

- c.1) Se eleva por los bromuros, agentes anabólicos, anticonceptivos
- c.2) Disminuye por la resina de colestiramina, ácido nicotínico, salicilatos, hormona tiroidea, estrógenos, kanamicina, neomicina, feniramidol.

Por lo tanto se excluyen del grupo los individuos con: anemia, diabetes, faringitis, hepatopatía, hiperlipidemia, hipertiroidismo, embolia, nefropatía, probable anemia y probable diabetes. No se mencionan diferencias significativas entre género y edades, pero se excluyen individuos menores de 14 años

6.- TRIGLICERIDOS: Los trastornos en las relaciones normales de este componente bioquímico pueden ser de origen primario o secundario (Krupp M.A., 1986):

a) Elevaciones:

a.1) Primaria:

a.1.1) Hiperlipoproteinemia tipo 1

**a.1.2) Hiperbetalipoproteinemia
tipo 2, 3, 4 y 5.**

a.2) Secundaria:

a.2.1) Hipotiroidismo

a.2.2) Diabetes mellitus

a.2.3) Síndrome nefrótico

**a.2.4) Alcoholismo crónico con
hígado graso,**

**a.2.5) Ingestión de esteroides de
anticonceptivos**

a.2.6) Obstrucción biliar

a.2.7) Estrés.

b) Disminuciones:

b.1) Primaria

b.1.1) Enfermedad de Tangier

b.1.2) Abetalipoproteinemia

**b.1.3) Algunos síndromes raros,
muy mal definidos.**

b.2) Secundaria:

b.2.1) Desnutrición

b.2.2) Absorción defectuosa

**b.2.3) Ocasionalmente en las
enfermedades parenquimatosas
hepáticas.**

Por lo tanto se excluyen de este grupo los individuos con diabetes, embolia, hepatopatía, hiperlipidemia, hipertiroidismo, hipertensión arterial, nefropatía y probables diabético.

7.- HEMOGLOBINA: La concentración de hemoglobina es una medida indirecta de la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre. Los valores de hemoglobina varían con la edad y género. Los valores normales del adulto se alcanzan a partir de los 14 años. Las mujeres tienen concentraciones menores que los varones y los individuos de raza negra muestran promedios menores que los de raza blanca. En el segundo y tercer trimestre del embarazo la hemoglobina es baja. Otras elevaciones o disminuciones se producen en las siguientes situaciones (McKenzie S.B., 1991):

a) Elevaciones: Todo valor de hemoglobina deberá correlacionarse con el número de eritrocitos y el hematocrito de cada paciente.

b) Disminuciones:

- b.1) Anemia
- b.2) Enfermedades crónicas
- b.3) Quimioterapia para cáncer
- b.4) Radioterapia
- b.5) Embarazo
- b.6) Algunas hepatopatías
- b.7) Leucemia
- b.8) Nefropatías
- b.9) Probable anemia
- b.10) Traumatismos.

c) Efecto de los medicamentos:

- c.1) Disminuye con: Fármacos utilizados en quimioterapia para neoplasias, antibióticos, antihistamínicos, analgésicos no esteroides, etc.

Por lo tanto todos los individuos del grupo que presenten anemia previamente diagnosticada, enfermedades crónicas, hepatopatías, leucemia, nefropatías, traumatismos, que reciban quimio o radio terapia, embarazadas, o individuos con un probable diagnóstico de anemia, se excluyeron. Se separa el grupo por géneros y se excluyen individuos menores de 14 años.

8.- HEMATOCRITO: Sirve para dar una idea del porcentaje de eritrocitos en el individuo. Varía según la edad, género y ubicación geográfica, alcanzándose los valores normales del adulto a partir de los 14 años de edad. Las mujeres tienen valores más bajos que los hombres. Sus valores normales se ven afectados de la misma manera que la hemoglobina, por lo que se excluyen los individuos con las mismas patologías y el grupo se divide por géneros excluyendo también a individuos menores de 14 años (McKenzie S.B., 1991).

De esta manera, si bien se hizo una selección a *posteriori* de sujetos, se pudieron excluir a los individuos que tienen alguna patología o circunstancia fisiológica declarada al laboratorio los cuales pudieran ser inconvenientes para ser considerados como individuos de referencia. Estos criterios de exclusión por patologías o circunstancias fisiológicas se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro1.- Algunos criterios de exclusión para ser considerados individuos de referencia en cada componente bioquímico analizado.

	Edad	Sexo	Glucosa	Urea	Creatinina	Ac. Urico	Colesterol	Trigliceridos	Hb	Hto	Otros estudios sugeridos
Anemia	*	*	*	*	*	*	S	*	S	S	Fierro sérico, ferritina, reticulocitos.
Artralgia	*	*	*	*	*	S	*	*	S	S	PCR,F. Reumatoide, ASTRO, Ac Urico.
Cáncer	*	*	*	*	*	*	*	*	S	S	Ag. Carcinoembrionario, Alfa-fatoproteína
Cefalea	*	*	S	*	*	*	*	S	S	S	Caproparasitoscópico
Diabetes	*	*	S	S	S	*	S	S	*	*	Hb glicada, EGO, Dep. creatinina
Embarazo	*	S	S	*	*	*	*	S	S	S	Fierro sérico, Ac fólico, EGO
Embolla	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	Tiempos de coagulación
EMTC	*	*	S	S	*	*	*	*	S	S	Plaquetas
Faringitis	*	*	*	S	*	*	S	*	*	*	Ex. Faríngeo c/antibiograma, F. Blanca ASTRO
Gota	S	*	*	*	*	S	*	*	*	*	Radiografías
Hepatopatía	*	*	S	S	*	S	S	S	S	S	Bilirrubinas, TGO, TGP, DHL, EGO, P. Inmun. Hepatitis
Hiperlipidemia	*	*	S	*	*	*	S	S	*	*	Perfil tiroideo, perfilde lipidos
Hipertiroidismo	*	*	S	*	*	*	S	S	*	*	Perfil tiroideo
HTA	*	*	S	S	*	*	S	S	*	*	Dep. Creatinina
Inf. Urinaria	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Urocultivo, EGO, albúmina urinaria
LES	*	*	S	S	S	S	*	*	*	*	P. Autoinmunidad, plaquetas, Microalbuminuria.
Leucemia	*	*	*	*	*	S	*	*	S	S	Plaquetas
Nefropatía	*	*	S	S	S	S	S	S	S	S	Dep. Creatinina, Calcio, fósforo, albúmina urinaria
Prob. Anemia	*	*	*	*	*	*	S	*	S	S	Fierro sérico, reticulocitos, Índices eritrocitarios
Prob. Diabético	*	*	S	*	*	*	S	S	*	*	EGO, HB glicada, glucosa post prandial
Reumatismo	*	*	*	*	*	*	*	*	S	S	P. Autoinmunidad, PCR, F. Reumatoide
Traumatismo	*	*	*	*	*	*	*	*	S	S	F. Blanca

*No tiene importancia clínica

S : Sí tiene importancia clínica en esta patología

EMTC: Enfermedad Mixta de Tejido Conjuntivo

HTA: Hipertensión arterial

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

Los individuos, así como sus mediciones que fueron excluidos de acuerdo con los criterios establecidos anteriormente, se graficaron en un histograma de frecuencias para observar el tipo de población que se eliminó del total de datos y observar qué tendencias mostraban sus mediciones y comprobar la efectividad de los criterios de exclusión efectuados. Posteriormente se construyeron los histogramas de frecuencia para cada componente bioquímico estudiado después de aplicar los criterios de exclusión.

Posteriormente, empleando métodos estadísticos, se eliminaron los individuos cuyos resultados de sus mediciones eran atípicas. De esta manera se "limpiaron" los datos de cada componente bioquímico estudiado para aplicar las herramientas estadísticas que nos llevarán a obtener los intervalos de referencia para cada grupo por componente y por géneros respectivamente.

C.- Obtención de intervalos de referencia univariados y regiones de referencia multivariadas

1.- Intervalos de referencia univariados

Una vez aplicados los criterios de exclusión, se procede a determinar los intervalos de referencia de cada grupo con el estimador MCD (Minimum Covariance Determinant estimator) cuyo método se detalla en el anexo de esta tesis (Rousseeuw P.J. y Van Driessen K., 1999) (Castaño E., 2000).

Para utilizar este método, se analiza previamente si los datos siguen una distribución gaussiana. Si es así, se aplica directamente la fórmula, pero si no, se realizan las transformaciones adecuadas para que la muestra siga aproximadamente una distribución normal (Solberg H.E., 1987, Part 5).

Para este trabajo, los datos de urea y colesterol presentaron una distribución normal, por lo que no se hacen transformaciones. Para el caso de triglicéridos se utilizó el logaritmo de cada valor. En el caso de creatinina, tanto para hombre como para mujer, se elevó cada valor a (-1); en el caso de ácido úrico tanto en hombres como en mujeres se utilizó el logaritmo natural de cada valor; para el caso de hemoglobina de hombres y mujeres y hematocrito de hombres, se elevó cada valor al cubo y el hematocrito de las mujeres al cuadrado. Una vez realizadas la transformaciones adecuadas se calculan primero la media muestral (\bar{x}), y la desviación estándar. Estos valores se sustituyen en la siguiente fórmula:

$$\bar{x} \pm \left(1 + \frac{1}{n}\right)^{\frac{1}{2}} * t(0.025, n-1)s$$

Donde n es el tamaño de la muestra y t es la t de Student a un nivel dado de α (alfa) y $(n-1)$ grados de libertad. De esta manera se determinan los intervalos de referencia para los 8 parámetros estudiados.

2.- Regiones de referencia multivariadas

Después se realizó el análisis multivariado para hemoglobina y hematocrito tomando en cuenta que éstos guardan cierta relación entre sí (según la literatura, la relación normal entre hemoglobina y hematocrito es de 1:3) pero no deben evaluarse por separado sino en conjunto dado que la relación 1:3 no es exacta por supuesto. Al realizar este análisis multivariado se realizaron los histogramas de frecuencia para hemoglobina y hematocrito de hombres y se graficaron los pares de datos (hemoglobina y hematocrito) para cada individuo. Posteriormente, con ayuda de un programa para computadora, se realizó el análisis multivariado para construir la elipse y el polígono en la gráfica de distribución de los pares de datos.

D.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio

Este es un enfoque complementario al tradicional de límites de referencia; su objetivo sigue siendo el evaluar la condición de un individuo en un componente bioquímico, pero a través de establecer si la diferencia entre dos mediciones consecutivas del componente es significativamente diferente de cero a un nivel de confianza. Para tal evaluación es necesario calcular lo que se denomina cambio del límite de referencia.

Este enfoque en general puede ser usado tanto en sujetos sanos como en pacientes, con la condición de que su estado sea estadísticamente estable. Sin embargo, se debe señalar que los datos a ser procesados para la obtención de un límite de referencia para un cambio entre dos mediciones, tiene características típicas:

- En sujetos sanos, la serie de datos es grande, en intervalos largos en el tiempo y con una periodicidad regular.
- En pacientes, los datos son series cortas, en intervalos cortos de tiempo y con periodicidad irregular (Albert A. y Harris E.K., 1987).

De esta manera, se analizó una serie de datos de 32 varones aparentemente sanos. A cada individuo se le determinó la concentración de glucosa cada mes durante 14 meses consecutivos. Para cada paciente se determinó la concentración media, desviación estándar, y coeficiente de autocorrelación para las 14 mediciones.

En base al método estadístico descrito en el anexo de esta tesis, el Límite de Referencia Para Un Cambio fue computado. Este valor representa un límite de referencia para un cambio entre mediciones consecutivas para glucosa cuantificada en sujetos aparentemente sanos; es un valor tal que en el 90% de los casos representa el máximo permitido para una diferencia entre dos valores consecutivos del componente bioquímico considerado; en este caso el límite que

utilizamos fue del 95% de confianza. Si la diferencia de dos valores consecutivos saliera al Límite de Referencia Para Un Cambio, habrá indicación estadística de que el componente bioquímico del sujeto está saliendo de su estabilidad previa (Albert A. y Harris E.K., 1987).

Para cada individuo estudiado, se graficaron sus concentraciones de glucosa a través del tiempo, así como las diferencias entre una medición y otra.

V.- RESULTADOS

A.- Selección de los individuos de referencia

En el caso de glucosa, el histograma de frecuencias de los individuos excluidos por criterios clínicos (Figura 1), muestra una tendencia de la población a los valores entre 100 y 250 mg/dl, debido a que la mayoría de ellos son diabéticos, aunque también aparecen individuos con valores menores a 115 mg/dl que era el intervalo mayor de referencia utilizado en el laboratorio en ese momento, los cuales corresponden a diabéticos bien controlados. En este caso se nota claramente la efectividad de los criterios de exclusión. La Figura 1 muestra también el histograma de frecuencias para glucosa del cual han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

Para la urea se observa en el histograma de frecuencias de los individuos excluidos por criterios clínicos (Figura 2), que la mayoría de la población presenta valores comprendidos entre los intervalos de referencia utilizados en el laboratorio (13-59 mg/dl), pues hay una tendencia hacia valores entre 20 y 50 mg/dl los cuales no presentaban aún una disminución o elevación en este tipo de componente bioquímico a pesar de tener alguna patología indicada en los criterios de exclusión, pero hubo una cantidad considerable de personas que muestran valores superiores a 60 mg/dl, incluso mayores a 200 mg/dl de urea los cuales fueron eliminados con los criterios de exclusión. La Figura 2 muestra también el histograma de frecuencias para urea del cual han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

En el caso de creatinina, podemos observar en el histograma de frecuencias de los individuos excluidos por criterios clínicos (Figura 3), que la tendencia de las mediciones de los individuos excluidos está aproximadamente entre 0.3 y 1.7 mg/dl de creatinina los cuales están dentro de los intervalos de

referencia utilizados en el laboratorio, pero la efectividad del criterio de exclusión se hace evidente al observar que se eliminaron sujetos con valores de creatinina que van desde 2 mg/dl hasta 8.7 mg/dl aproximadamente. La Figura muestra también los histogramas de frecuencias para creatinina de hombres y mujeres respectivamente, de los cuales han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

En la Figura 4, podemos observar el histograma de frecuencia para Acido úrico de individuos hombres y mujeres excluidos por criterios clínicos. En este histograma, observamos que las concentraciones que presentan estos individuos van desde 1.5 hasta 11.5 mg/dl de ácido úrico. La mayoría presenta concentraciones entre 2.5 y 9.5 mg/dl, lo cual sugiere que algunos de estos individuos, a pesar de tener alguna patología tomada como criterio de exclusión para ácido úrico, no presentan todavía un efecto sobre este componente bioquímico pero otros individuos sí lo presentan. De esta manera observamos la utilidad de la exclusión por criterios clínicos. La Figura 4 muestra también el histograma de frecuencias para hombres y mujeres respectivamente, de los cuales han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

Para el colesterol, observamos en el histograma de frecuencias de los individuos excluidos por criterios clínicos (Figura 5), que una considerable proporción de individuos presentan valores superiores a los 200 mg/dl, incluso existen valores de 400 o 600 mg/dl los cuales se eliminaron gracias a los criterios de exclusión. La Figura 5 muestra también el histograma de frecuencias para colesterol del cual han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

En el caso de triglicéridos, el histograma de frecuencias de individuos excluidos por criterios clínicos (Figura 6), nos muestra un alto porcentaje

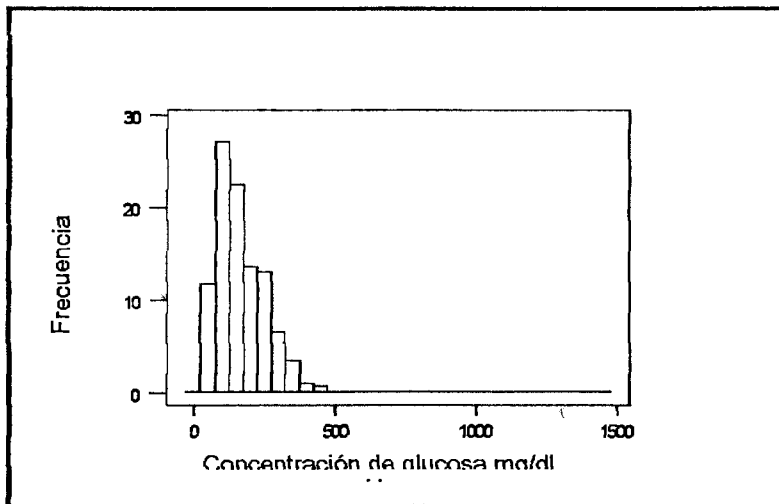
de individuos presenta valores entre 250 y 250 mg/dl, los cuales no están muy alejados de los intervalos de referencia utilizados en el laboratorio (mayor a 200 mg/dl), pero hay una cantidad considerable de individuos con valores superiores a los 250 y hasta casi 800 mg/dl lo cual nos indica también la efectividad de los criterios de exclusión utilizados. La Figura 6 muestra también el histograma de frecuencias para logaritmo de triglicéridos del cual han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

En el histograma de frecuencias de individuos excluidos por criterios clínicos para hematocrito en hombres (Figura 7), se observa que los valores siguen una distribución normal. Observamos que un porcentaje importante de individuos presentan valores menores al 37%, y la mayoría presenta valores entre los 37 y 52% (los intervalos utilizados en el laboratorio son de 42-52%) lo cual nos indica que los criterios de exclusión eliminaron efectivamente a un buen número de individuos que no podemos considerar como de referencia. En el caso de las mujeres (Figura 8), la mayoría de la población se encuentra entre 35 y 42 %, pero una considerable cantidad de personas con valores menores a 35 y mayores a 45 se eliminaron. Los valores utilizados en el laboratorio van de 37 a 48 mg/dl. Las Figuras 7 y 8 muestran también el histograma de frecuencias de hematocrito para hombres y mujeres respectivamente, de los cuales han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

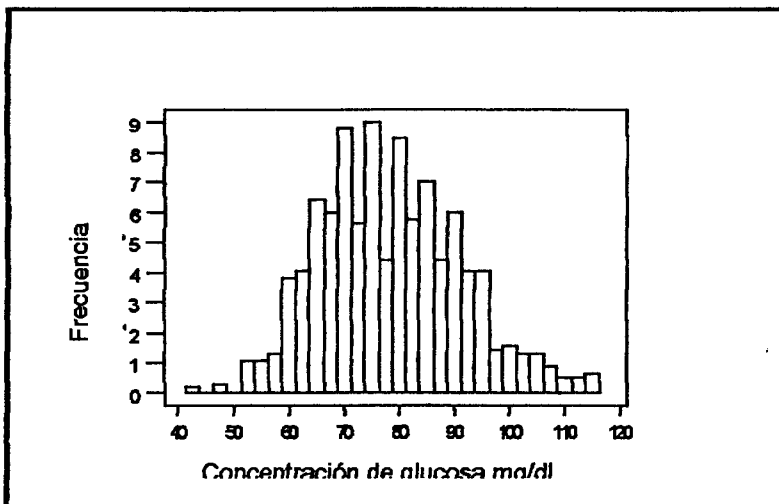
Para la hemoglobina, en el caso de los hombres, el histograma de frecuencias de los individuos excluidos por criterios clínicos (Figura 9), podemos observar casi la misma tendencia que en el hematocrito, los valores excluidos no parece seguir una distribución normal y hay una cantidad considerable de individuos con valores menores a 12.5 g/dl. Incluso, un porcentaje importante presenta valores alrededor de los 8 y 9 g/dl, siendo los intervalos de referencia utilizados actualmente entre 14 y 18 g/dl. Lo cual nos hace pensar que los criterios de exclusión son importantes. Para el caso de las mujeres (Figura 10), también se

eliminaron una cantidad considerable de individuos con valores muy bajos, pero el histograma muestra que la mayoría presenta valores comprendidos en el intervalo de referencia utilizado en ese tiempo para hemoglobina lo cual señala que aún las embarazadas no muestran valores muy bajos de hemoglobina. Las Figuras 9 y 10 respectivamente, muestran también los histograma de frecuencias para hemoglobina de los cuales han sido eliminados individuos con patologías que afectan este componente bioquímico.

En general, aunque los criterios de exclusión en la mayoría de los parámetros eliminó a individuos con valores que caen dentro de los intervalos de referencia utilizados en el laboratorio, un buen porcentaje de individuos con valores atípicos fueron eliminados efectivamente. Con este tipo de criterios de exclusión disminuimos las interferencia que éstos pudieran causarnos al momento de aplicar los métodos estadísticos necesarios para la construcción de los intervalos de referencia.

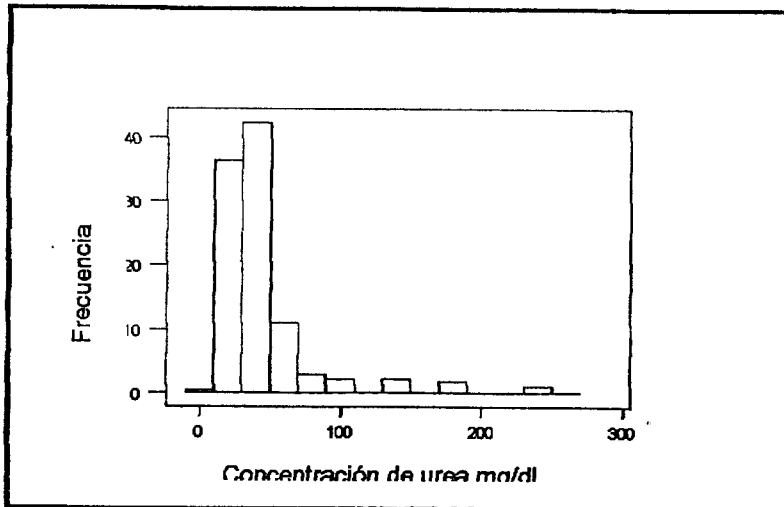


Histograma de frecuencia para glucosa de individuos excluidos por criterios clínicos.

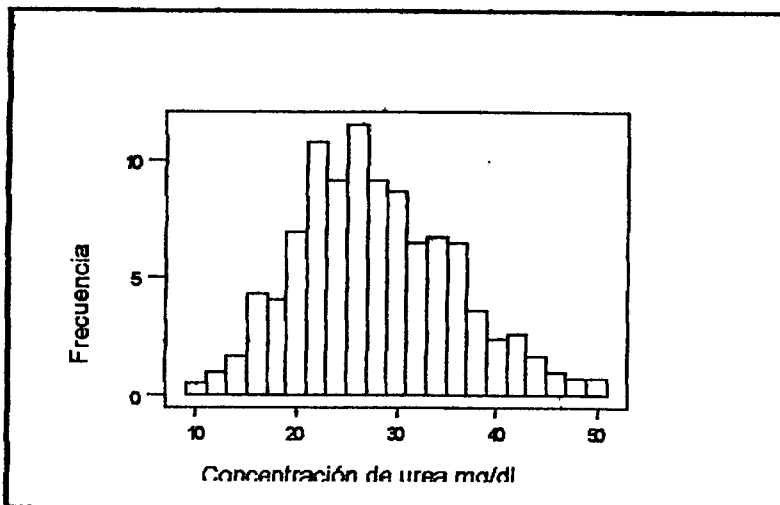


Histograma de frecuencias para glucosa después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 1.- Histogramas de frecuencia para glucosa.

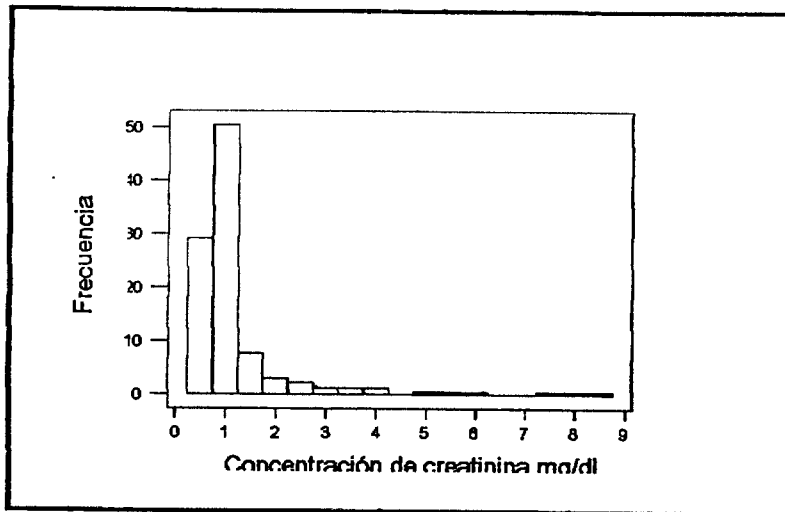


Histograma de frecuencia para urea de individuos excluidos por criterios clínicos.

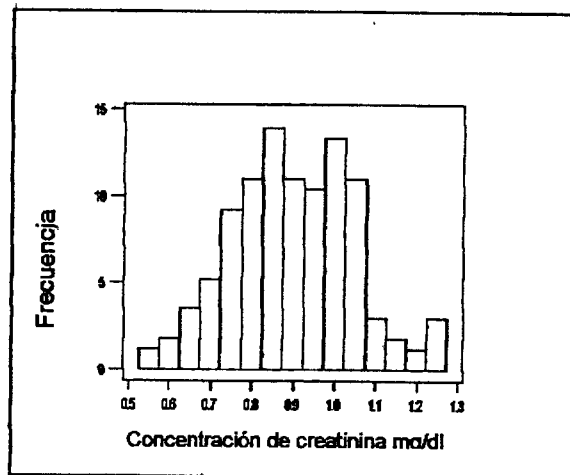
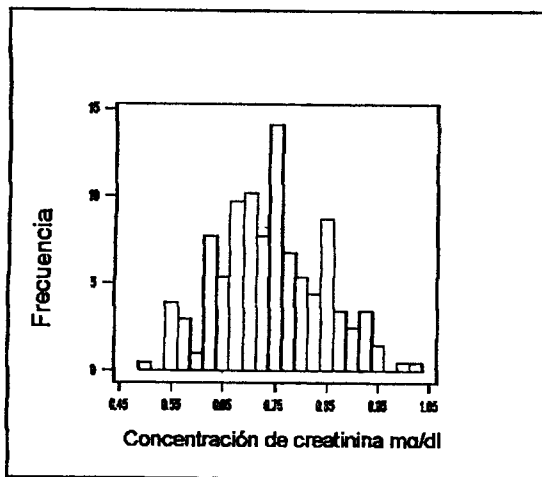


Histograma de frecuencias para urea después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

FIGURA 2.- Histogramas de frecuencia para urea

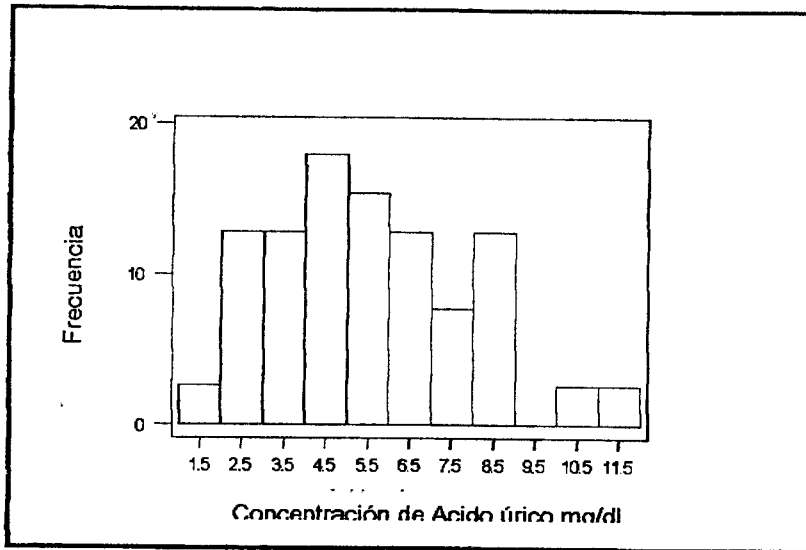


Histograma de frecuencia para creatinina en hombres y mujeres de los individuos excluidos por criterios clínicos.

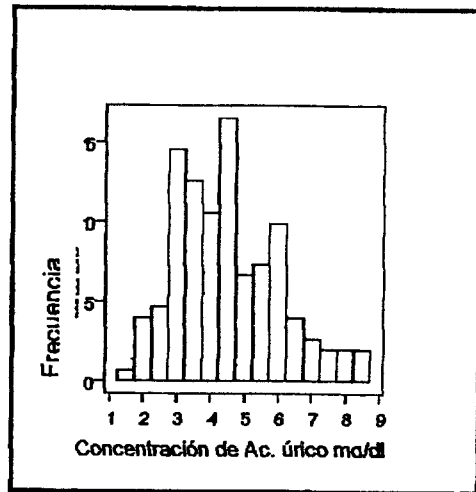
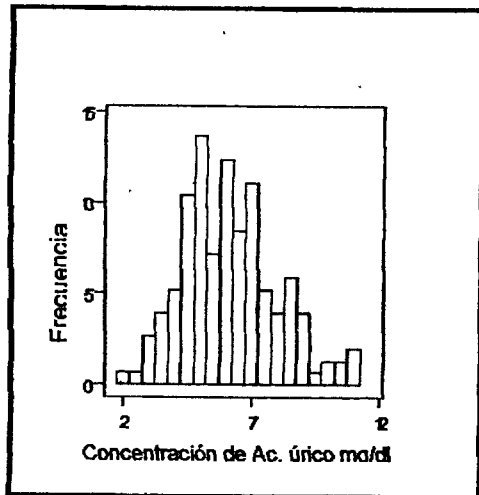


Histogramas de frecuencia para creatinina en hombres y mujeres después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 3.- Histogramas de frecuencia para creatinina.

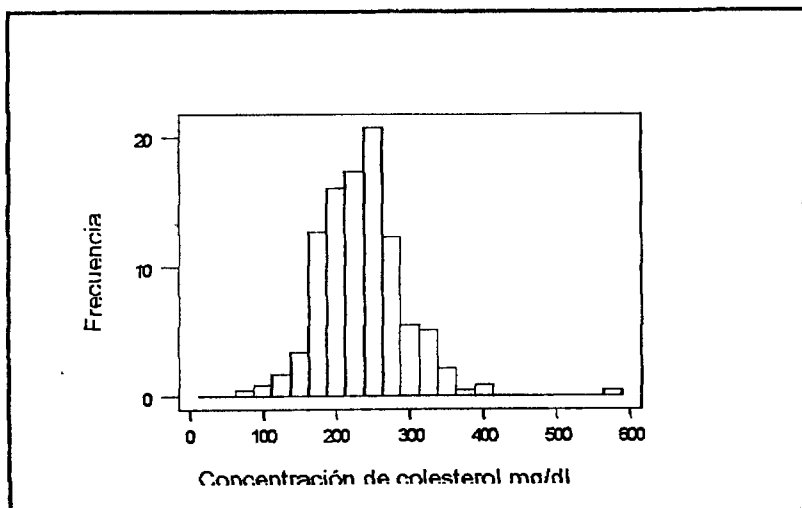


Histograma de Frecuencias para ácido úrico en hombres y mujeres de los individuos excluidos por criterios clínicos.

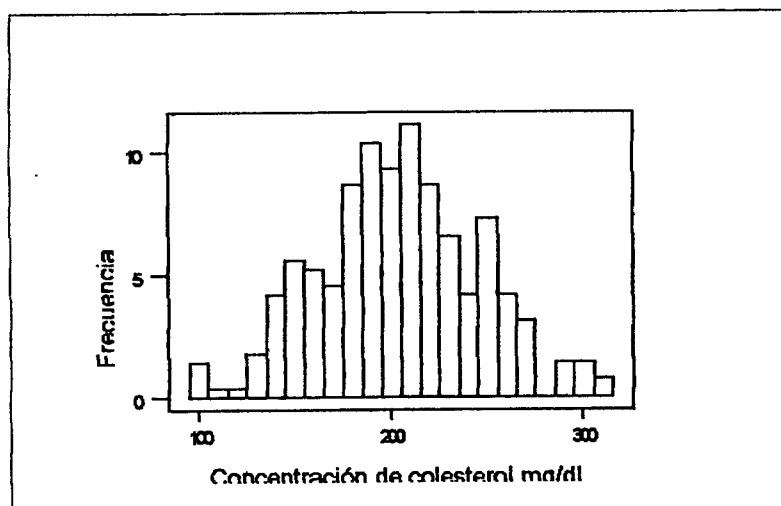


Histogramas de frecuencia para ácido úrico en hombres y mujeres después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 4.- Histogramas de frecuencia para Acido úrico.

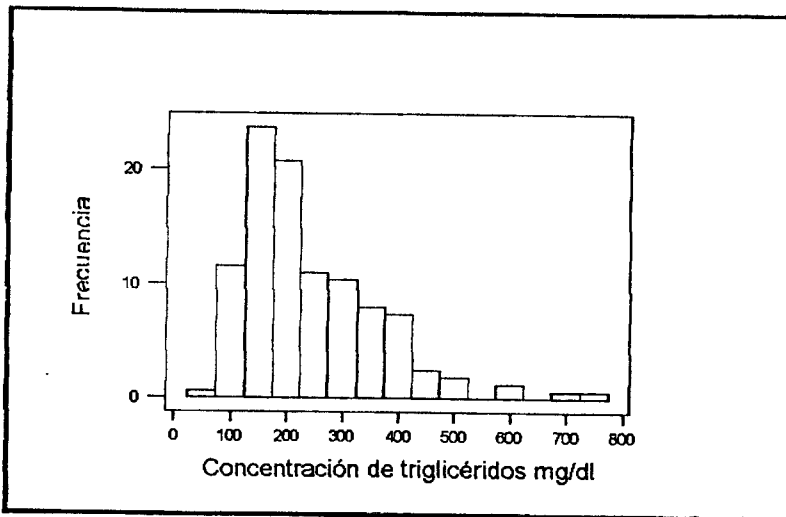


Histograma de Frecuencias para colesterol de Individuos excluidos por criterios clínicos.

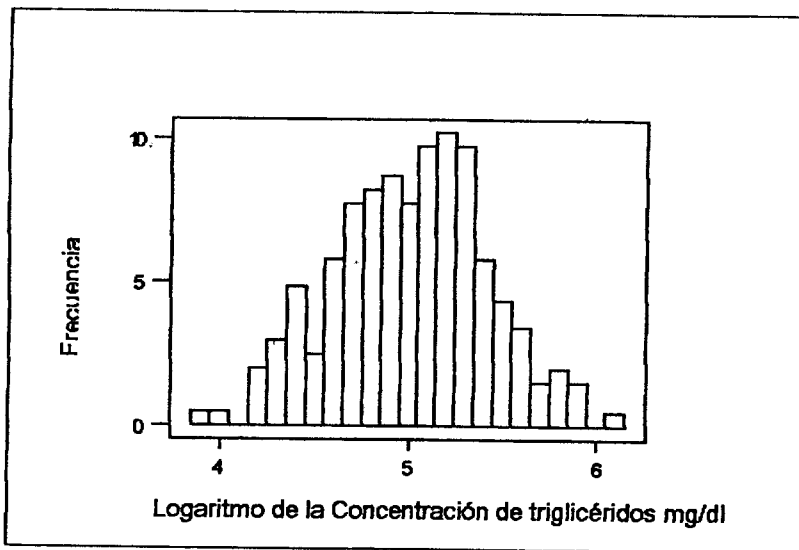


Histograma de frecuencias para colesterol después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 5.- Histogramas de frecuencia para colesterol.

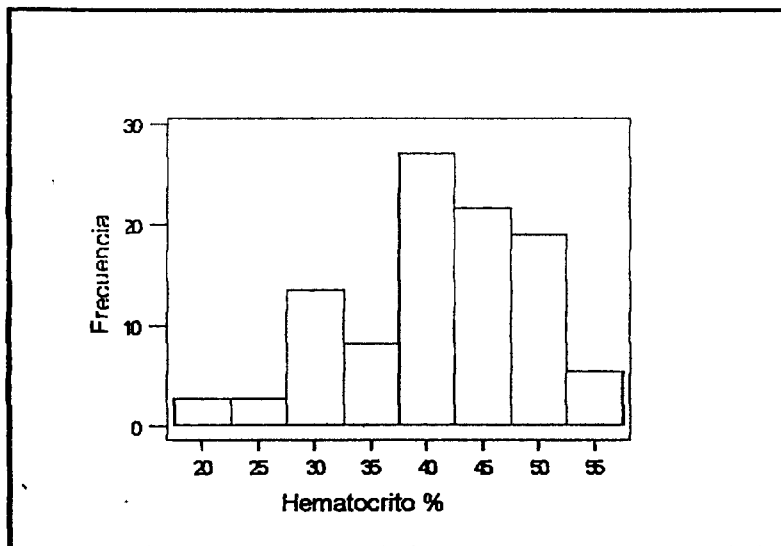


Histograma de Frecuencias para triglicéridos de Individuos excluidos por criterios clínicos.

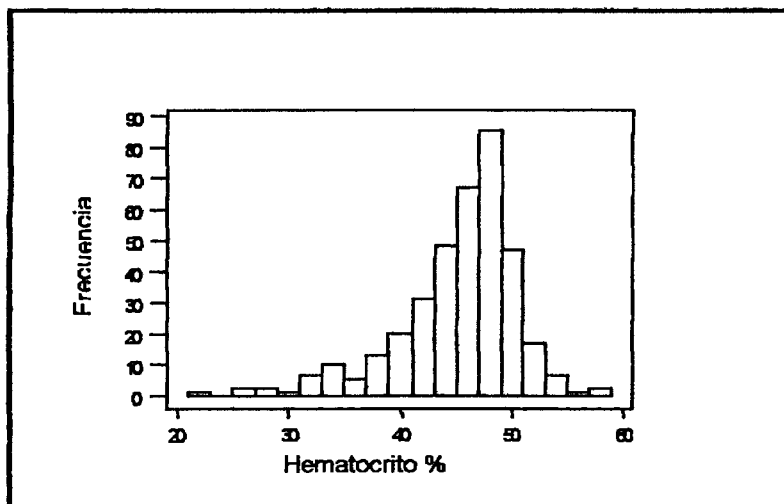


Histograma de frecuencias para triglicéridos después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 6.- Histogramas de frecuencia para triglicéridos.

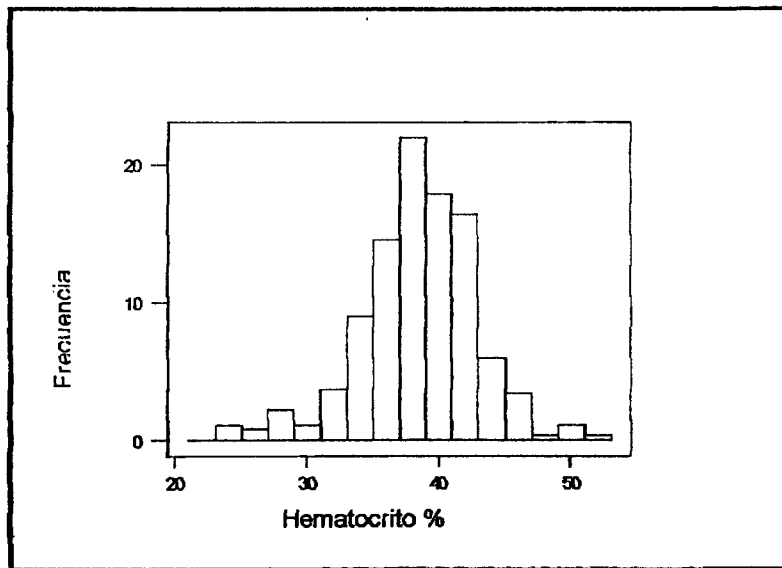


Histograma de frecuencia para hematocrito en varones de individuos excluidos por criterios clínicos.

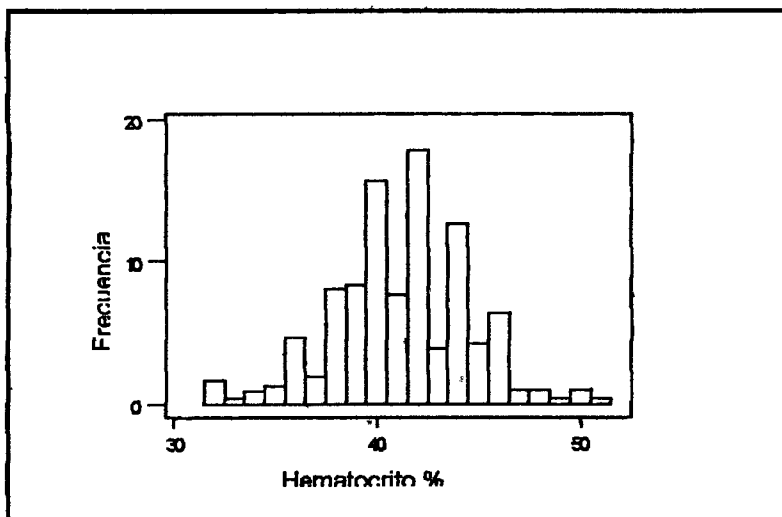


Histograma de frecuencia para hematocrito en varones después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 7.- Histogramas de frecuencia para hematocrito en varones.

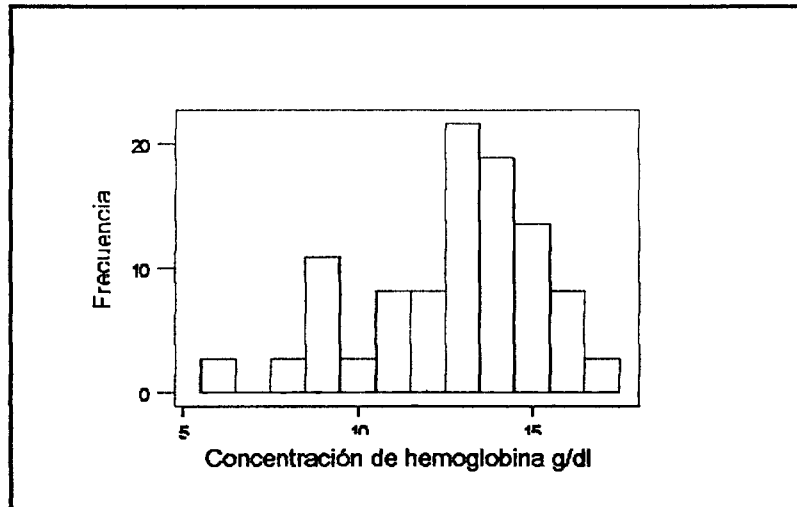


Histograma de frecuencia para hematocrito en mujeres de individuos excluidos por criterios clínicos.

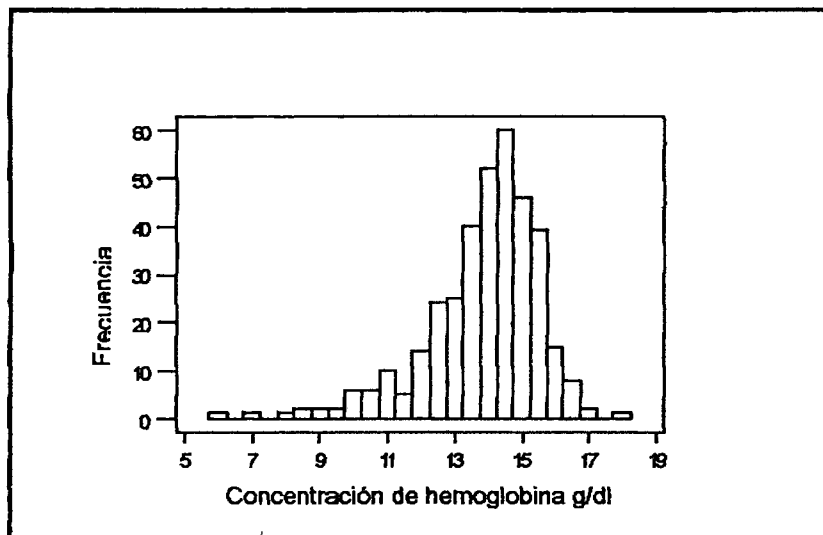


Histograma de frecuencias para hematocrito en mujeres después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 8.- Histogramas de frecuencias para hematocrito en mujeres.

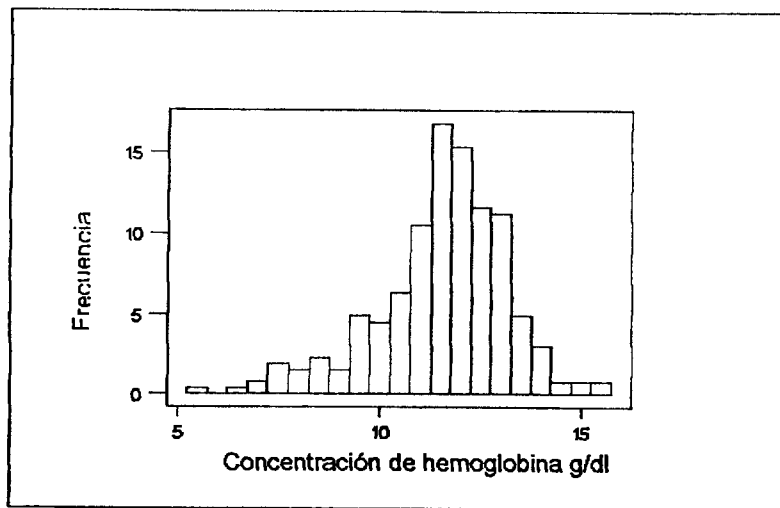


Histograma de frecuencia para hemoglobina en varones de individuos excluidos por criterios clínicos.

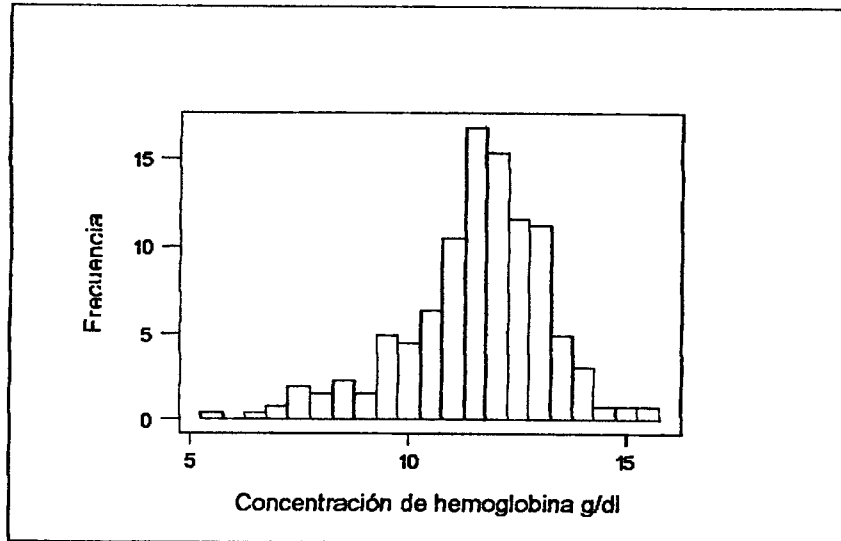


Histograma de frecuencias para hemoglobina en varones después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 9.- Histogramas de frecuencia para hemoglobina en varones.



Histograma de frecuencia para hemoglobina en mujeres de individuos excluidos por criterios clínicos.



Histograma de frecuencias para hemoglobina en mujeres después de aplicar criterios de exclusión clínicos.

Figura 10.- Histogramas de frecuencia para hemoglobina en mujeres.

B.- Obtención de intervalos de referencia univariados y regiones de referencia multivariadas

1.- Intervalos de referencia univariados

Para este caso, una vez realizadas las exclusiones de individuos de acuerdo con los criterios clínicos para cada componente bioquímico, se utilizó el estimador MCD el cual detecta estadísticamente valores atípicos de cada componente bioquímico, los cuales son eliminados para posteriormente obtener los intervalos de referencia. En el Cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos para los intervalos de referencia univariados:

Cuadro 2.- COMPARATIVO DE INTERVALOS DE REFERENCIA

Componente	Individuos de referencia incluidos en la obtención del intervalo de referencia (n)	Intervalos de Referencia obtenidos	Intervalos utilizados en el laboratorio	¿Se recomienda usar los obtenidos?
Glucosa (mg/dl)	400 hombres y mujeres	59.14 – 105.71	75 – 115	SI
Urea (mg/dl)	402 hombres y mujeres	12.82 - 40.69	13-59	SI
Creatinina (mg/dl)	219 Mujeres	M 0.58 - 1.01	0.6-0.9	SI
	168 Hombres	H 0.69 - 1.25	0.7-1.1	SI
Acido Urico (mg/dl)	152 Mujeres	M 2.16 - 8.65	2.4-5.7	NO
	154 Hombres	H 3.35 - 10.93	3.4-7.0	NO
Colesterol (mg/dl)	279 hombres y mujeres	129.32 – 275.42 unilateral: Hasta 273.72	Menos de 200*	NO
Triglicéridos (mg/dl)	204 hombres y mujeres	69 – 328 unilateral: Hasta 290.06	Menos de 200*	NO
Hemoglobina (g/l)	401 Mujeres	M 9.77 - 14.52	12-16	SI
	344 Hombres	H 11.23 – 16.22	14-18	SI
Hematocrito	436 Mujeres	M 35.12 – 46.54	37-48	SI
	332 Hombres	H 38.11- 51.99	42-52	SI

M = Mujeres

H= Hombres

* Éstos son valores recomendados. Una elevación a partir de este valor representa un mayor riesgo para el individuo de presentar eventos indeseables en su salud. Por lo tanto, no se consideran como valores de referencia.

2.- Obtención de una región de referencia multivariada

En este caso se eligieron hemoglobina y hematocrito como componentes bioquímicos para obtener la región de referencia multivariada, debido a que se contaba con una base de datos amplia y adecuada para realizar este tipo de evaluación. La Figura 11 muestra el histograma de frecuencia para hemoglobina y la Figura 12 el histograma de frecuencia para hematocrito en varones. La gráfica de correlación de los pares de datos se presenta en la Figura 13, y la gráfica con la elipse y el polígono de la región de referencia multivariada para estos dos valores se puede apreciar en la Figura 14.

Al observar la gráfica de distribución de los pares de datos para hemoglobina y hematocrito, podemos observar que sí existe una fuerte correlación positiva entre la hemoglobina y el hematocrito ($r = 0.818$). Los individuos incluidos en este estudio fueron 368.

Con el análisis multivariado se construyó una región de referencia elipsoidal la cual se convierte en la región de referencia para los pares de datos de los dos componentes bioquímicos estudiados de esta población definida de individuos y que presentan una distribución normal. Esta elipse está construida estadísticamente para contener un porcentaje específico del total de los pares de datos (95%). Con este análisis multivariado se eliminaron 52 pares de datos atípicos (o) los cuales se pueden observar en la gráfica y se distinguen porque se encuentran fuera de la elipse y se nota que no se ajustan a la relación que guardan entre sí los demás pares de datos. Sobre esta elipse se traza un polígono cuyos vértices son los límites inferior y superior de los intervalos de referencia obtenidos de manera univariada. De esta manera podemos detectar los valores falsos positivos (+) los cuales son pares de datos que se encuentran dentro de la elipse que es nuestra región de referencia pero que los intervalos de referencia univariados detectan a uno o a los dos parámetros (hemoglobina o hematocrito) fuera de los intervalos de referencia considerando como "anormal" sin tomar en

cuenta que el otro componente bioquímico se encuentre dentro del intervalo de referencia.

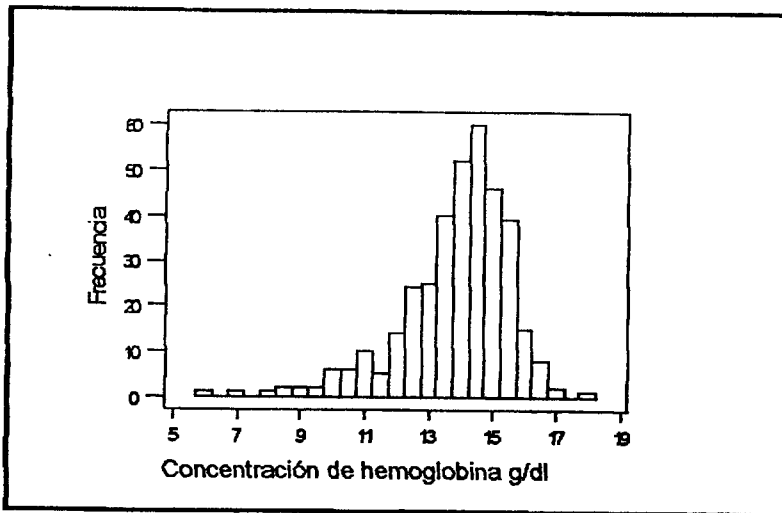


Figura 11.- Histograma de frecuencias para hemoglobina en varones.

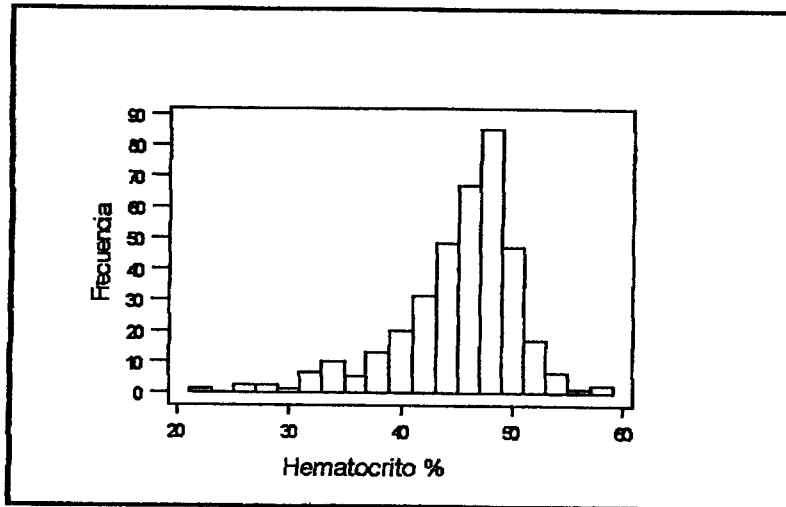


Figura 12.- Histograma de frecuencias para hematocrito en varones

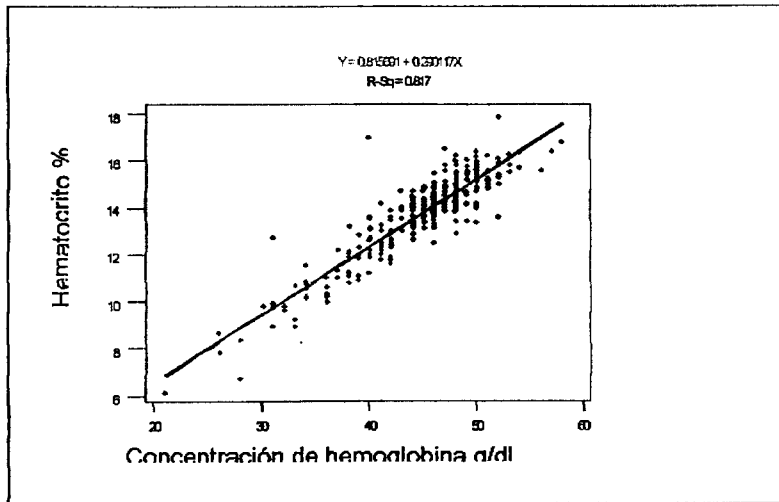


Figura 13.- Gráfica de correlación entre hemoglobina y hematocrito.

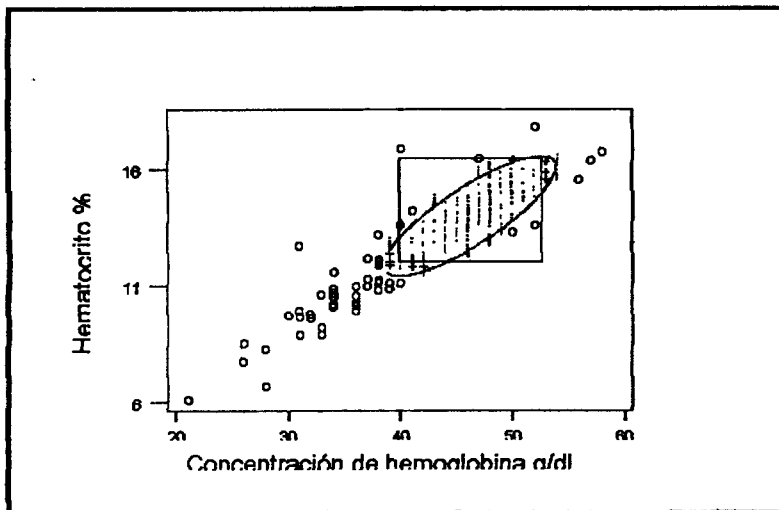


Figura 14.- Elipse que muestra la región de referencia multivariada para hemoglobina y hematocrito en varones. Los vértices del rectángulo corresponden a los valores del intervalo de referencia univariado obtenido para hemoglobina y hematocrito.

O = Valores atípicos += Falsos positivos
i = Valores no de referencia pero no atípicos
. = individuos de referencia

Un aspecto importante en este caso, es evaluar la concentración aproximada de hemoglobina en cada eritrocito, la cual es conocida como Concentración Media de Hemoglobina Globular (CMHG). De esta manera, podemos decir si los eritrocitos tienen una concentración de hemoglobina normal, baja o alta y clasificar los eritrocitos como normocrómicos, hipocrómicos o hiperocrómicos respectivamente; lo cual ayudará a clasificar el tipo de anemia de un individuo. Al evaluar en nuestra población total la CMHG (este valor se obtiene dividiendo la hemoglobina entre el hematocrito), se observa que el valor promedio de los individuos que comprenden la región de referencia multivariada es de 30.82 y se obtiene de estos individuos un intervalo de referencia para este parámetro de 28.57-33.13. Para detalles del método estadístico, consultar el anexo .

C.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio

En las Figuras 15 a 19 podemos observar las gráficas más representativas de 5 de los 32 individuos del programa de monitoreo de su estado de salud, trabajadores de una empresa de la región. Estos sujetos son presumiblemente "sanos" en términos generales. En las gráficas observamos la concentración de glucosa medida a través de los intervalos de tiempo (t) y las diferencias entre una medición y otra (Por ejemplo, t_3-t_2).

Mediante la aplicación de las fórmulas estadísticas mencionadas en el anexo de esta tesis, se obtuvo un límite de referencia para un cambio de 5.6984 unidades que acotará al 90% de los cambios con un 95% de confianza; es decir, cuando un individuo presenta una diferencia superior a 5.6984 mg/dl entre dos mediciones consecutivas, puede ser indicativo de algún desajuste en su metabolismo, lo cual puede ser indicio de algún proceso patológico. Esto da la pauta al médico de identificar oportunamente un cambio significativo en dicho individuo. En la Figura 15 observamos el comportamiento de un individuo en el cual no se observan diferencias entre una medición y otra de glucosa mayores al Límite de Referencia Para un Cambio. En las Figuras 16 a 19 se observa el

comportamiento de individuos que presentan diferencias entre una medición y otra de glucosa mayores al Límite de Referencia Para un Cambio.

En la Figura 20 se muestran las diferencias para cada sujeto sano y se puede observar cuántas sobrepasan el límite de referencia para un cambio de 5.6984 mg/dl, teniendo de esta manera, que sólo el 4% del total de las diferencias se sale de este valor.

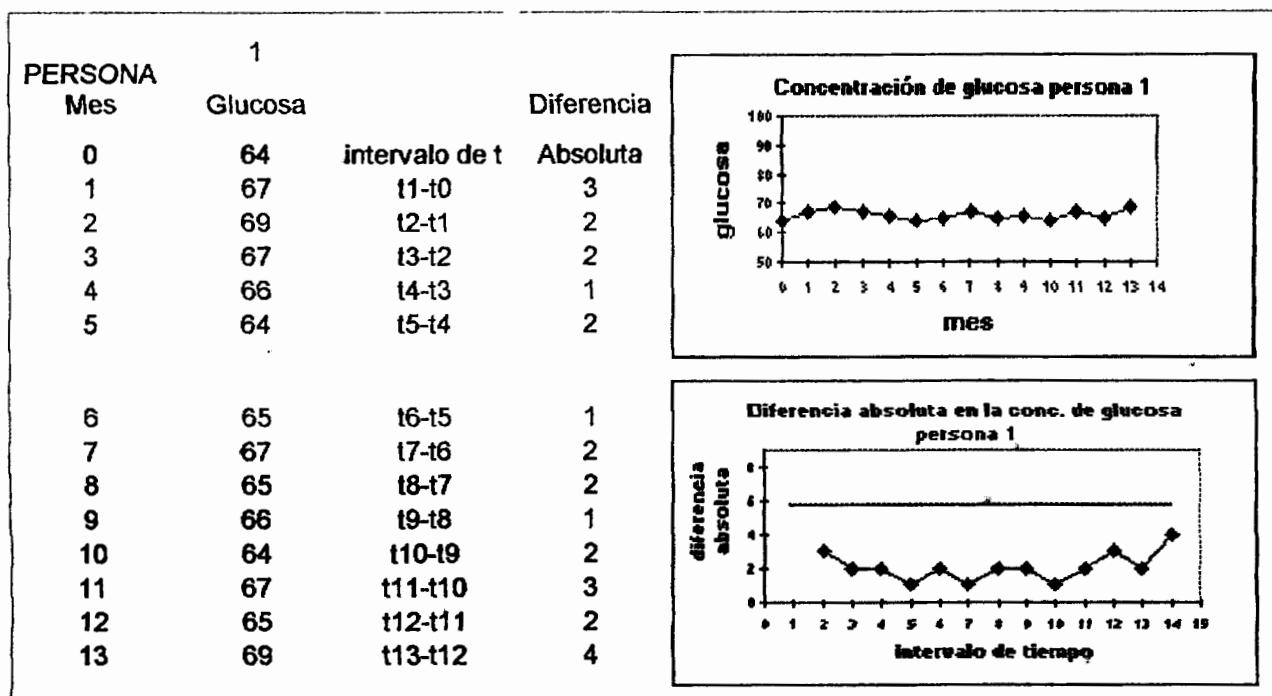


Figura 15 .- Gráfica de conc. de glucosa (mg/dl) y diferencias observadas en mediciones consecutivas persona 1

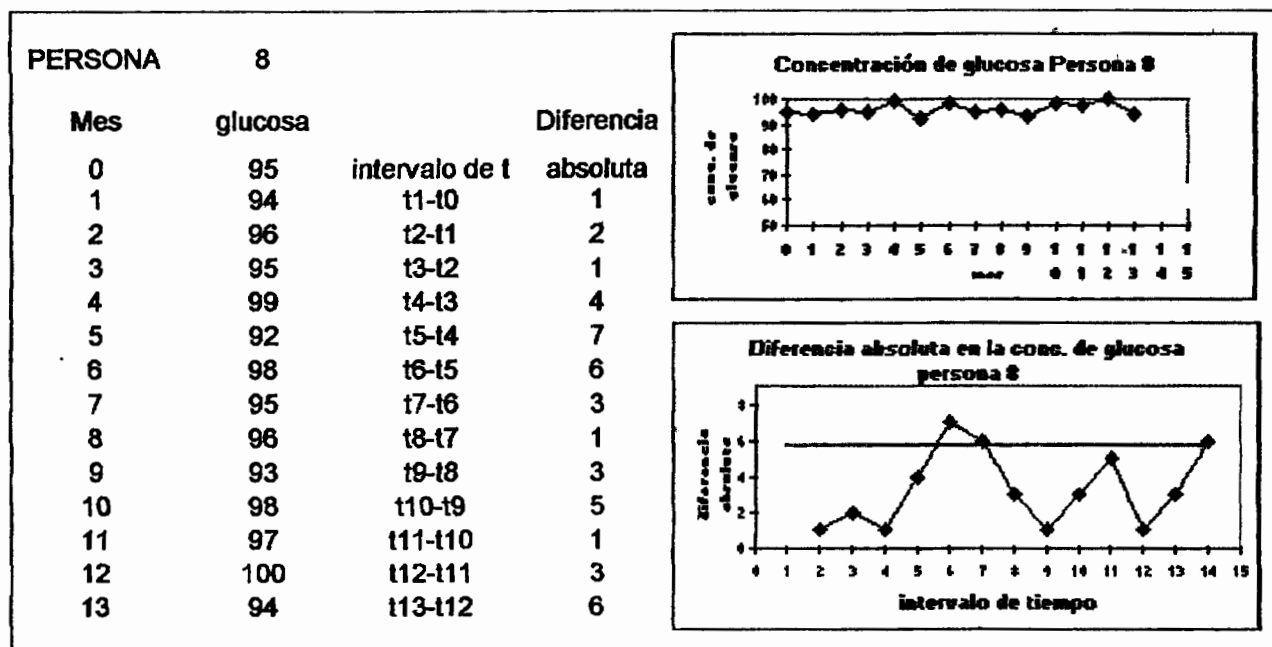


Figura 16.- Gráfica de conc. de glucosa (mg/dl) y diferencias observadas en mediciones consecutivas persona 8

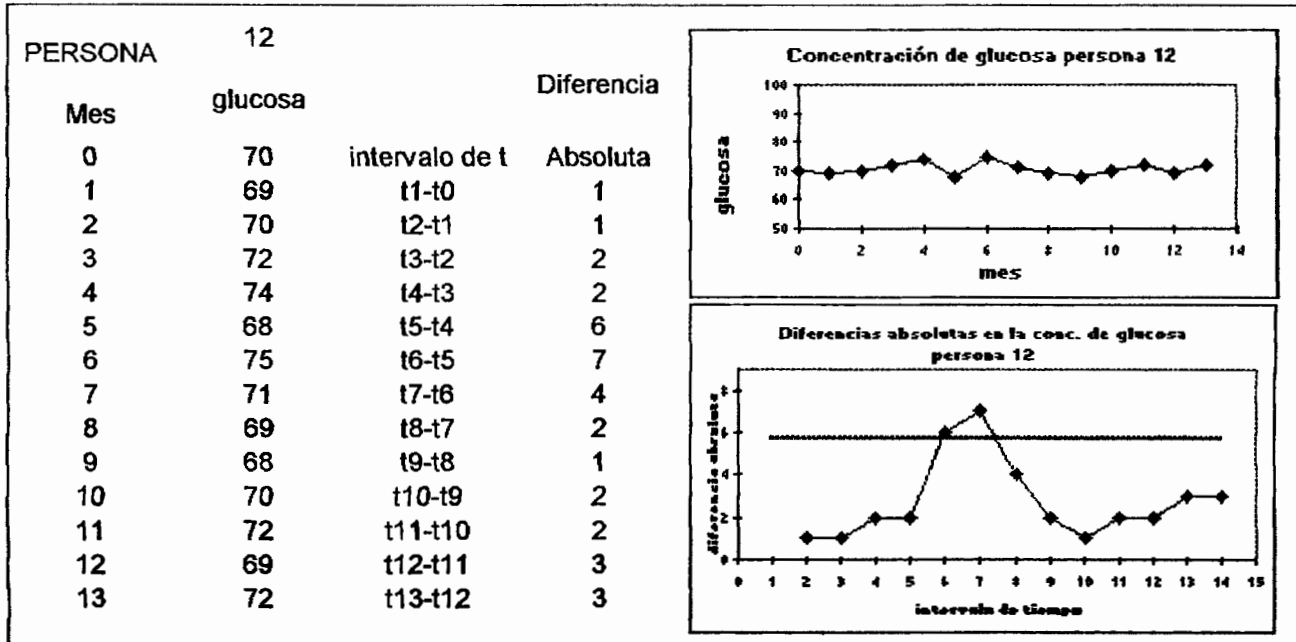


Figura 17.- Gráfica de conc. de glucosa (mg/dl) y diferencias observadas en mediciones consecutivas persona 12

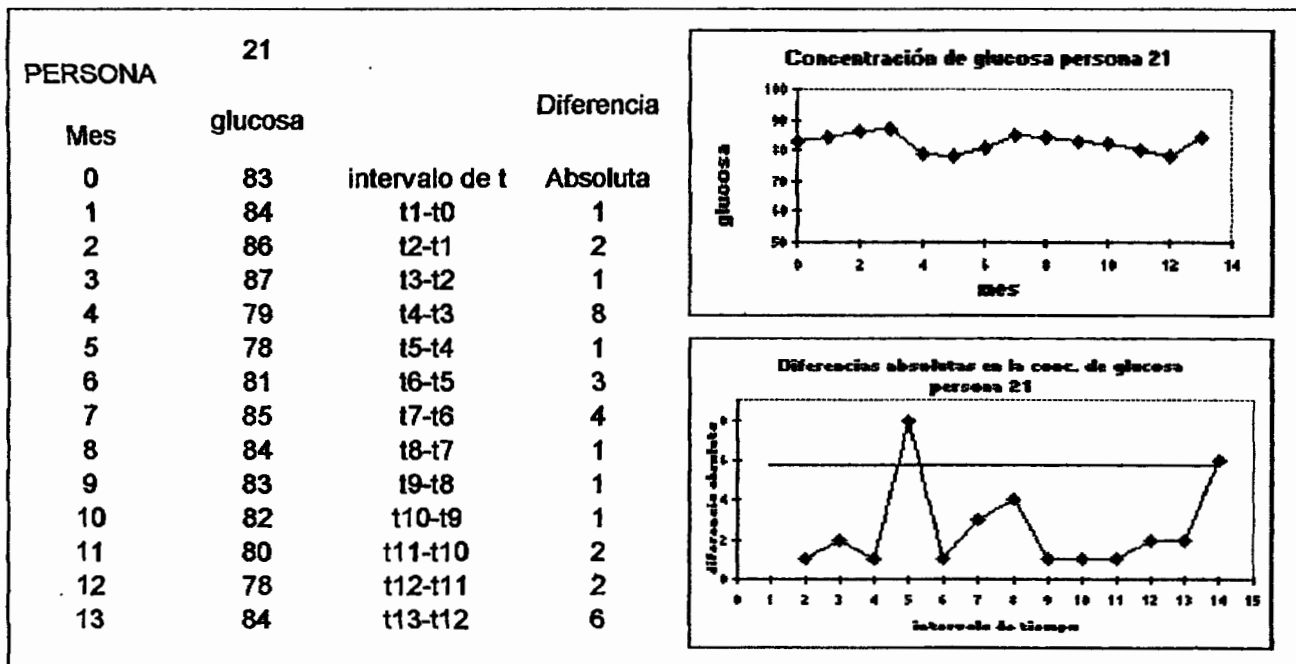


Figura 18.- Gráfica de conc. de glucosa (mg/dl) y diferencias observadas en mediciones consecutivas persona 21

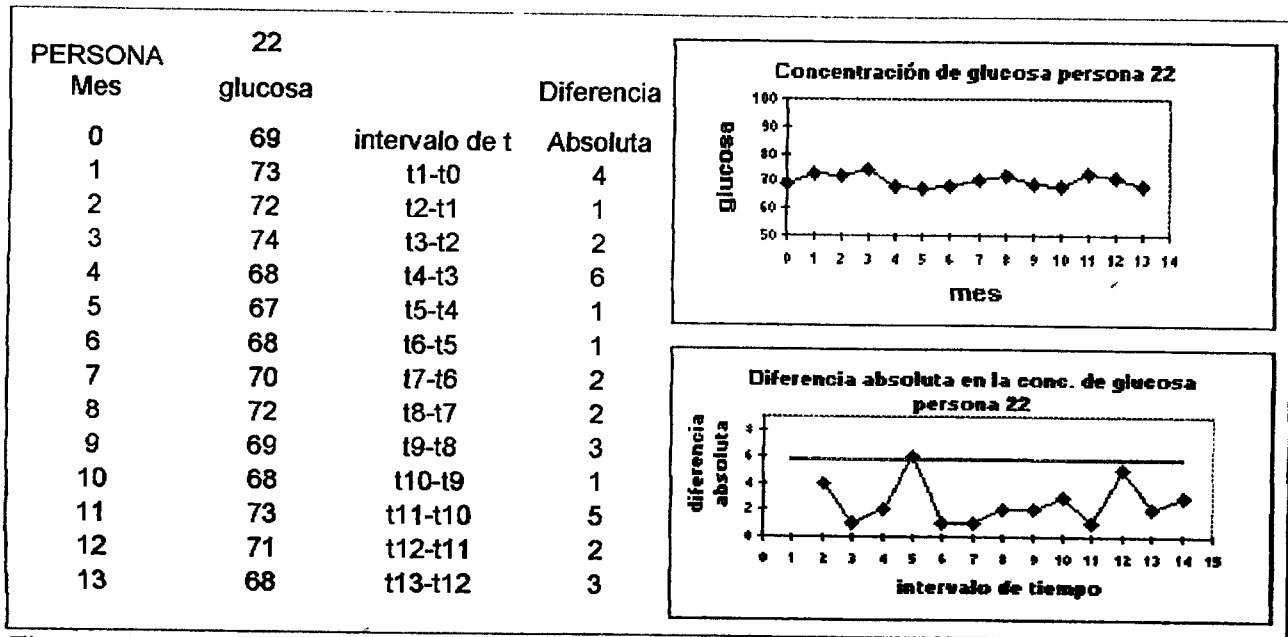


Figura 19.- Gráfica de conc. de glucosa (mg/dl) y diferencias observadas en mediciones consecutivas persona 22

cambio de referencia para glucosa

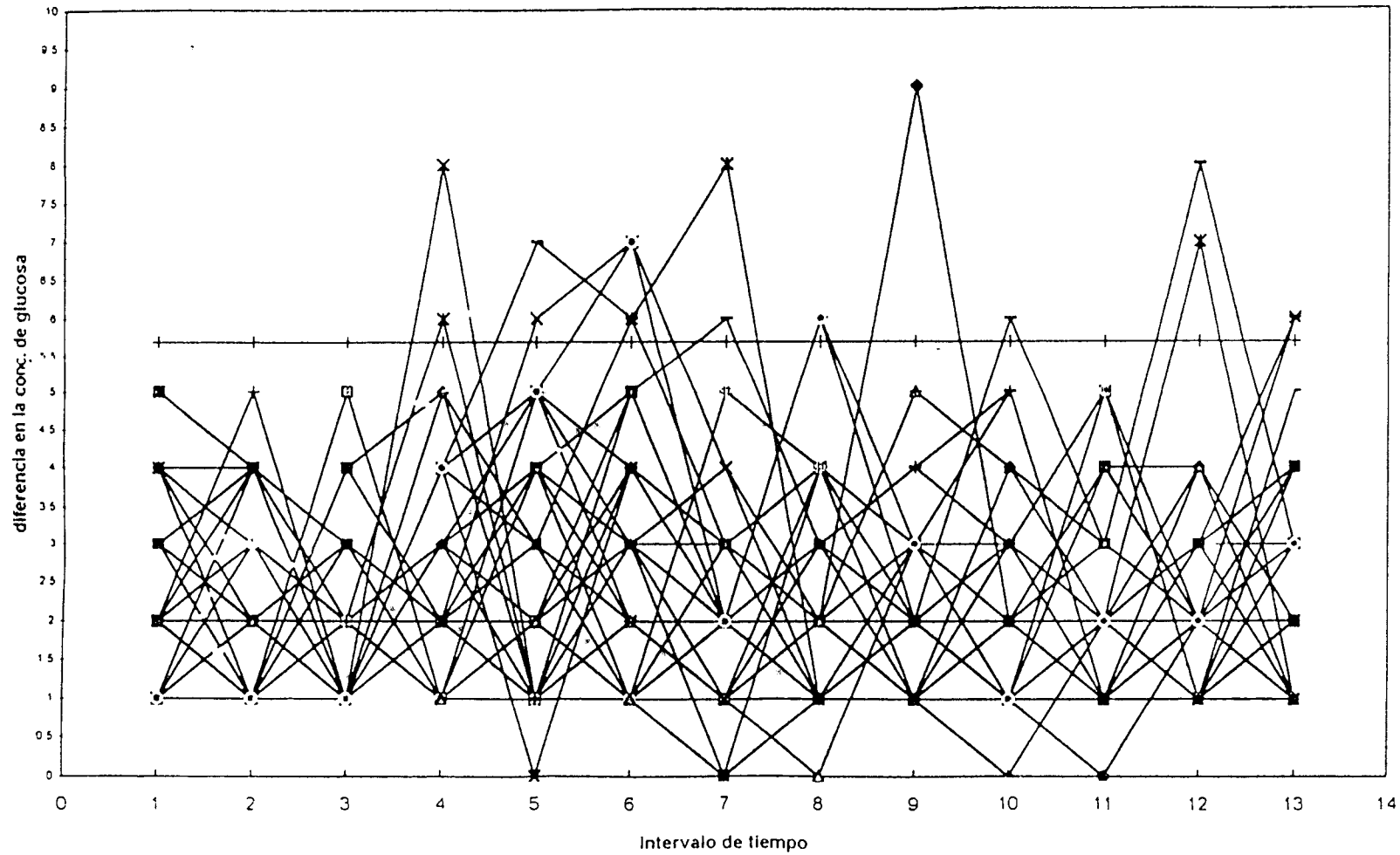


Figura 20- Gráfica de diferencias en mediciones consecutivas de glucosa observadas en los 32 individuos estudiados

Total de mediciones: 448

Total de diferencias: 416

Cambio de limite de referencia para glucosa: 5.6984 mg/dl

VI.- DISCUSION

A.- Selección de individuos de referencia

En la obtención de nuestros intervalos de referencia utilizamos una selección de individuos a *posteriori*, pero en base a los datos disponibles como género, edad y patología pudimos agrupar y excluir individuos para obtener nuestros intervalos de referencia. Además se utilizaron métodos estadísticos para excluir algunos valores atípicos. Estos valores atípicos que no se excluyeron en base a datos clínicos, probablemente corresponden a personas que en el momento de realizarse sus análisis no presentaban síntomas de ninguna enfermedad, o acudían a realizarse un chequeo de rutina, pero posiblemente ignoraban tener signos anormales.

Por lo tanto, se recomienda utilizar el cuestionario propuesto en la Figura 21 para cada paciente que acuda al laboratorio. De esta manera, se tendrá una base de datos más completa para realizar nuevos estudios retrospectivos en la población que acude laboratorio.

B.- Obtención de intervalos de referencia univariados y regiones de referencia multivariadas

1.- Intervalos de Referencia univariados

a) GLUCOSA

Intervalos obtenidos con MCD: 59.14 – 105.71 mg/dl

Valores atípicos eliminados estadísticamente: 237 valores

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica: 1207

Intervalo utilizado en el laboratorio: 75 – 115 mg/dl

- El intervalo obtenido es más amplio que el utilizado en el laboratorio y está desplazado hacia la izquierda. El límite inferior obtenido es 20 unidades

menor que el utilizado en el laboratorio y el límite superior es 8 unidades menor al utilizado. Las causas de no coincidencia pueden ser:

- Que la dieta de la población queretana es muy diferente a la del país de origen del reactivo lo cual ocasiona estos valores bajos.
- El nivel de glucosa en sangre varía con el tipo de dieta, factores genéticos y ambientales.
- En las mujeres, puede influir el hecho de que presenten hipoglucemia reactiva lo cual nos desplaza el límite inferior 20 unidades abajo del utilizado en el laboratorio. Por lo tanto, se destaca la necesidad de construir intervalos de referencia para glucosa particionando la población por género.
- El tiempo entre un alimento y otro es muy prolongado en la mayoría de nuestra población debido al tipo de actividades que realizan lo cual ocasiona ayunos prolongados que disminuyen este componente en la sangre.
- En nuestro país es alto el porcentaje de individuos con algún tipo de parasitosis, lo cual provoca una absorción deficiente de glucosa en el intestino y por lo tanto se encuentran valores bajos en sangre.

Se determinó la concentración media de glucosa en el total de la población estudiada obteniéndose un valor de 91.32 mg/dl. Este valor concuerda con estudios realizados en la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, en la cual se obtuvo una concentración media de glucosa de 98 mg/dl. Esta encuesta, estudió individuos de las zonas centro, sur, norte y área metropolitana de la República Mexicana en el año de 1993. Los individuos estudiados tienen entre 20-29 años de edad que residen en las zonas urbanas de nuestro país (Rull J. et al., 1995).

A pesar de todo, los valores obtenidos no son indicativos de ninguna patología y pueden utilizarse como referencia de la población del laboratorio.

b) UREA

Intervalos obtenidos con MCD: 12.8268 - 40.695 mg/d

Valores atípicos eliminados estadísticamente: Se eliminaron 27 valores

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica: 182 individuos

Intervalo utilizado en el laboratorio: 10 – 50 mg/dl.

Los valores atípicos eliminados estadísticamente no corresponden a alguna patología en particular.

Con este método obtenemos un intervalo de referencia menos amplio que el utilizado en el laboratorio y esto refleja la diferencia entre la población del país donde se fabrica el reactivo (EUA) y la de nuestro laboratorio. La urea es un producto final del metabolismo de las proteínas y varía directamente con la ingestión de proteína. Las causas de falta de coincidencia pueden ser debidas principalmente a la dieta de la población la cual influye de manera significativa en este tipo de mediciones.

En un estudio realizado en nuestro país, los resultados indican que los valores de referencia obtenidos para este componente en la población mexicana son ligeramente inferiores a los utilizados en otros países. Esto coincide con nuestros resultados. En Europa y Estados Unidos de América consumen más proteínas de origen animal que en México, aunque en nuestro país, una de las fuentes principal de proteína es el frijol, un alimento alto en fibra por lo que es eliminado mejor por el organismo (Alva S.I. García M.C., 1986).

No existe inconveniente en cambiarlos, pero sería interesante estudiarse si hay diferencia significativa entre género y edad. También será interesante estudiar la diferencia entre la proteína animal y vegetal y conocer el contenido de nitrógeno para saber si ahí radica la diferencia en la dieta de la población mexicana y la de otro país.

c) CREATININA

Intervalo de referencia obtenido con MCD: Mujeres 0.5886 – 1.0108 mg/dl

Hombres 0.6999- 1.257 mg/dl

Valores atípicos eliminados estadísticamente: Mujeres: 26 valores

Hombres 16 valores

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica: 169 hombres y mujeres.

Intervalo utilizado en el laboratorio: Mujeres 0.6 – 1.013 mg/dl

Hombres 0.7 – 1.36 mg/dl

El intervalo obtenido para hombres y mujeres es casi igual al utilizado en el laboratorio, pero estas diferencias no son muy significativas por lo que pueden utilizarse en el laboratorio pues los valores obtenidos no son indicativos de ninguna patología. Las posibles causas de falta de coincidencia pueden ser:

En estudios realizados en nuestro país, señalan que los valores de referencia obtenidos para estos componentes en la población mexicana son ligeramente inferiores a los incluidos en los reactivos. Esto se debe a que la depuración de creatinina por el riñón está relacionada con la masa corporal y por lo tanto la población mexicana difiere mucho en este aspecto a los países donde se fabrican los reactivos .

Para utilizar el estimador MCD hubo necesidad de hacer una transformación a los datos utilizando el inverso de cada valor para que los datos se ajustaran a una distribución normal. La mayoría de los valores atípicos eliminados son elevados y solamente algunos son muy bajos. Los valores atípicos altos eliminados son claramente indicativos de un daño renal que apenas se hace evidente, y por lo tanto no fueron eliminados anteriormente siguiendo los criterios clínicos pues el paciente dice ser una persona sana; pero al evaluar este componente bioquímico se observa que ya existe un daño renal que inicia, pues los individuos eliminados con criterios clínicos por presentar nefropatías ya

diagnosticadas, tienen valores de creatinina muy superiores a los valores altos aberrantes eliminados en este estudio.

d) ACIDO URICO

Intervalo de referencia obtenido con MCD: Mujeres 2.16- 8.653 mg/dl

Hombres 3.352 – 10.932 mg/dl

Valores atípicos eliminados estadísticamente: Mujeres: 1 valor atípico

Hombres: 3 valores atípicos

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica: 40 hombres y mujeres

Intervalos de referencia utilizados en el laboratorio: Mujeres 2.5 – 6.0mg/dl

Hombres 3 – 7mg/dl

En este caso, con el método MCD es necesario transformar los datos utilizando el logaritmo natural para que los datos sigan una distribución normal. Estos intervalos obtenidos no pueden utilizarse en el laboratorio pues a partir de 6 a 7 mg/dl se han reportado patologías asociadas a estos incrementos; por lo tanto, solamente pueden emplearse como intervalos de prevalencia. El problema en este caso es que los individuos dijeron ser sanos, pero al evaluar este componente bioquímico, se encontraron valores muy elevados de ácido úrico sin que la persona presentara síntomas de enfermedad (gota).

El intervalo obtenido para hombres y mujeres es más amplio que el utilizado en el laboratorio. La diferencia significativa se observa en el intervalo superior en el cual es más alto el obtenido que el utilizado. En el trabajos realizados en nuestro país, señalan que la población mexicana tiende a mostrar niveles más altos de ácido úrico que la de los países donde se fabrican los reactivos. El ácido úrico es un producto final del metabolismo de las purinas, por lo tanto las fallas metabólicas influyen más que la dieta del individuo (Alva S.I., 1995).

Las causas de falta de coincidencia pueden ser:

- Se observa que los niveles más altos de ácido úrico tanto en hombres como en mujeres los presentan personas diabéticas en su mayoría pero al revisar la bibliografía, se ha reportado que esa enfermedad solamente provoca un comportamiento irregular al interior del intervalo y entonces no es necesario eliminar estas personas. La causa de que sólo algunos de los diabéticos presenten valores altos de ácido úrico es por un posible daño renal que provoque disminución de la filtración glomerular y por lo tanto se elimine deficientemente el ácido úrico de su organismo. Pero esto no nos indica que se deben excluir.
- Los valores altos de ácido úrico se asocian con gota, por lo tanto nuestros límites obtenidos no pueden utilizarse en la práctica, pues se considera que hay hiperuricemia cuando se rebasa la concentración de 6.1 mg/dl el cual es el índice de saturación del ácido úrico y es mayor el riesgo de que se presente la gota cuanto mayor es el valor. De la población estudiada (157 individuos) 46 individuos presentan valores superiores a 7 mg/dl que es lo considerado como indicador de riesgo de tener gota y de ellos, 19 individuos son aparentemente sanos, 20 son diabéticos y 7 presentan diversas patologías (hipertensión, embarazo, etc.). Esto nos indica que hay que evaluar si la diabetes influye de manera importante en este componente bioquímico aún si el individuo no presenta daño renal.
- La mayor concentración de ácido úrico observada sugiere que en México pudiera haber una mayor prevalencia de gota, sin embargo existe información de que la concentración de ácido úrico es mayor en algunas poblaciones, sin que se presente una mayor prevalencia de gota y, en todo caso, surge la necesidad de realizar un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia de esa enfermedad (la gota es un error metabólico transmitido genéticamente)
- La frecuencia de hiperuricemia es mayor en los individuos de origen filipino que en los de raza caucásica. Si tomamos en cuenta la teoría de que la población indígena del continente americano proviene del continente asiático, podemos

considerar que genéticamente tenemos tendencia a expresar la hiperuricemia de los asiáticos.

- En nuestro país se consumen una cantidad considerable de vísceras las cuales son ricas en nucleoproteínas.
- En estudios realizados, se ha observado el Síndrome de Resistencia a la insulina es un estado previo en los individuos que posteriormente manifestarán Diabetes Mellitus (la prevalencia de la Diabetes Mellitus en nuestro país es del 7.2%, según la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas). En este síndrome, se destacan niveles elevados de Colesterol, triglicéridos y ácido úrico, lo cual influye en los resultados obtenidos en este estudio (Reaven G.M., 1988) (Rull J. et al., 1995).

Los intervalos obtenidos son muy altos como para utilizarlos en el laboratorio, pues reflejan una patología determinada (gota) y esto es consecuencia, probablemente, de las características genéticas y del estilo de vida de la población.

e) COLESTEROL

Intervalo de referencia obtenido con MCD: 129.32 - 275.42 mg/dl.

Intervalo de referencia unilateral obtenido con MCD: Hasta 263.72 mg/dl

Valores atípicos eliminados estadísticamente: 17 valores atípicos.

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica: 237

Intervalo utilizado en el laboratorio: Menos de 200 mg/dl

El valor obtenido para este componente es notablemente más alto que el utilizado en el laboratorio, pues difiere en 75 unidades. Estos niveles altos de colesterol en sangre indican que:

- La cantidad de esta sustancia depende de la herencia, nutrición, función endocrina, integridad de hígado y riñón, caracteres étnicos, etc. y por eso varían los intervalos de referencia de una población a otra.

- El obtener valores de referencia mayores a 200 no indican que esos individuos no sean sujetos con riesgo de sufrir enfermedad cardiaca. Más bien indica que esos valores elevados son comunes en la población, pero sí son sujetos de riesgo. En los 296 individuos estudiados, el 20.6% presenta hipercolesterolemia tomando como criterio diagnóstico una concentración sérica de colesterol mayor a 240 mg/dl. Este porcentaje no coincide con el obtenido en la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, en la cual se obtuvo un porcentaje de hipercolesterolemia de 8.9%. La causa puede deberse a que la encuesta estudió una mayor cantidad de individuos y era población abierta, mientras que en nuestro estudio los individuos estudiados son aquéllos que acudieron a un laboratorio clínico a realizarse estudios, muchas veces debido a que no se encontraban bien de salud. Además, como podemos observar en el Cuadro 3, los estudios realizados a excepción de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC), estudiaron poblaciones definidas, ejecutivos, empleados, burócratas, etc.; y un dato importante que nos proporciona la ENEC es que el porcentaje de hipercolesterolemia aumenta con el nivel de estudios de las personas, es decir, en los individuos con estudios de primaria únicamente, este porcentaje es de 9.5%, en los individuos con estudios de Licenciatura, el porcentaje es de 10.2%; y en los individuos con estudios de Posgrado, el porcentaje es de 11.7 %. Lo cual refleja que los individuos con más estudios, tienen un nivel socioeconómico más elevado lo cual determina un tipo de alimentación rica en grasas animales y carbohidratos ; así como una vida más sedentaria, factores que intervienen en la hipercolesterolemia (Rull J. et al., 1995).
- Las causas de estos valores altos de colesterol se deben a que la población Mexicana atraviesa en la actualidad por un proceso de transición epidemiológica y demográfica que se caracteriza por una urbanización e industrialización acelerada. Durante las últimas décadas se ha presentado un proceso migratorio en el que parte de la población rural se ha trasladado a núcleos urbanos

alterando su condición de vida, hábitos alimenticios, costumbres, etc. (Rull J. et al., 1995).

- Estos valores altos de colesterol son frecuentes en las zonas urbanas, pues en las zonas rurales los hábitos alimenticios y la actividad física son diferentes, pero la cada vez mayor migración de individuos del campo a la ciudad hace que se incremente el porcentaje de personas en nuestro país que tienen hipercolesterolemia.
- Por lo tanto, el obtener estos valores es simplemente una descripción de las concentraciones prevalentes en nuestra población pero no pueden cambiarse los utilizados en el laboratorio, pues además está aceptado internacionalmente que el riesgo de sufrir enfermedades coronarias, es mayor conforme aumenta el colesterol y se considera: a) De bajo riesgo las cifras inferiores a los 200 mg/dl, b) De riesgo moderado las cifras 200 a 239 mg/dl, y c) De alto riesgo las que sobrepasen los 240 mg/dl. Esto se estableció en base a un estudio realizado en comunidades de 7 países (Japón, Holanda, Yugoslavia, Grecia, Italia, Finlandia y Estados Unidos) y se encontró en dicho estudio que mientras mayor era el porcentaje de hombres con niveles de colesterol en suero por arriba de 250 mg/dl , también era mayor la prevalencia de enfermedad coronaria en los sitios donde radicaban tales personas, en otras palabras, a mayor prevalencia de hipercolesterolemia, mayor frecuencia de enfermedades coronarias en esa época (década de los ochenta) (Zorrilla E., 1991)
- El punto que si es bueno retomar es la obtención de límites bilaterales y no unilaterales, ya que el colesterol es importante en diversos procesos biológicos y puede verse disminuido en hepatitis, enfermedades genéticas como la enfermedad de Gaucher, hipertiroidismo, desnutrición, etc. y la obtención de valores bajos de colesterol son de utilidad clínica.

También se obtuvo la concentración media de colesterol para el total de la población estudiada cuyo valor fue de 190.6 mg/dl. Este valor concuerda con estudios realizados durante la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas,

en donde se obtuvo una concentración media de colesterol en la población estudiada, de 182.7 mg/dl, y con otro realizado en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán en 1985 donde se obtuvo la concentración media de colesterol en mujeres en edad reproductiva, cuyo valor fue de 189.04 mg/dl (Rull, J. et al., 1995) (Juárez J., 1985).

El surgimiento de la aterosclerosis como un problema de salud pública "nuevo" en México, es un fenómeno complejo cuyas condiciones no están bien estudiadas. Con respecto al estilo de vida, uno de los cambios más importantes en relación con la hipercolesterolemia, es el de los hábitos de alimentación. Estudios realizados por Zorrilla (1991) encontró que en 1960 el consumo de cereales y leguminosas predominó y el consumo de grasa representó el 22.9% del total de las calorías en promedio. El consumo de colesterol en esa época fue de 120.4 mg/día y el de grasas saturadas de 21.9 g/día. Para 1978, la misma población consumía 36% de calorías a partir de grasas; un promedio de 408 g/día de colesterol y 34.3 g de grasa saturada por día.

Actualmente, se han realizado varios estudios para conocer la prevalencia de hipercolesterolemia en nuestro país, en el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos en dichos estudios y en el presente trabajo para poder compararlos:

Cuadro 3.- Prevalencia de hipercolesterolemia en México.

Autor	Tipo de población	Número de individuos estudiados	Nivel diagnóstico de colesterol(mg/dl)	Prevalencia de hipercolesterolemia %
Zorrilla, 1972	Empleados	311	>250	17.0
Lerdo, 1984	Ejecutivos	420	>250	16.6
Zúñiga, 1987	Ejecutivos	320	>250	33.4
Cueto, 1989	Empleados	1934	>240	18.0
	Burócratas	962	>240	26.2
Guillén, 1989	Burócratas	1826	>240	20.0
Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC), 1995	Población abierta en zona centro, sur, norte y área metropolitana de la República Mexicana	13859	>240	8.9
Ruiz, 1999	Población que acude al laboratorio clínico	296	>240	20.6

(Rull J. et al., 1995) (Zorrilla E., 1991).

Por lo antes mencionado, no pueden utilizarse los valores de referencia obtenidos y se siguen utilizando los valores recomendados internacionalmente.

f) TRIGLICERIDOS

Intervalo de referencia obtenido con MCD: 69 – 328.38 mg/dl

Intervalo de referencia unilateral obtenido con MCD: 290.06 mg/dl

Valores atípicos eliminados estadísticamente: 5 valores atípicos.

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica: 164 individuos

Intervalo utilizado en el laboratorio: Menos de 200 mg/dl

Es necesario transformar los datos utilizando el logaritmo de ellos para que sigan una distribución normal y aplicar el método MCD.

En este componente es conveniente también obtener límites bilaterales y no unilaterales, ya que existen ciertas patologías como la enfermedad de Tangier, la Abetalipoproteinemia, enfermedades parenquimatosas hepáticas, entre otras; en las cuales los niveles séricos de triglicéridos se ven disminuidos y es importante tener valores de referencia bilaterales para estos casos. De la misma manera que en el caso del colesterol, la población estudiada produjo intervalos de referencia muy amplios y los intervalos de referencia tanto bilaterales como unilaterales obtenidos son demasiado altos para poder utilizarse en el laboratorio, por lo que se tomarán como una descripción de la prevalencia en la población y no es conveniente cambiar los utilizados en el laboratorio. Hay gran cantidad de individuos sanos con valores mayores a 200 mg/dl lo cual provoca estos intervalos tan amplios. Aunque los niveles de triglicéridos tienen una relación positiva con el riesgo de enfermedad cardiovascular, éstos no se consideran como predictores independientes de dicho riesgo. Las causas de estos elevados valores son:

- Al igual que en el caso del colesterol la dieta de nuestra población influye de manera muy importante en la obtención de límites de referencia elevados.
- La dieta alta en hidratos de carbono y grasas tanto vegetales como animales y la vida sedentaria provocan esa acumulación .

- Un nivel elevado de triglicéridos (Hipertrigliceridemia) se justifica con más de 200 mg/dl. Según la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC), el 16.3% de la población que estudiaron presenta niveles altos de triglicéridos, mientras que en nuestro estudio, el 12.4% de los individuos estudiados está en este caso. La concentración media de triglicéridos obtenida por la ENEC es de 158.2 mg/dl y la obtenida en nuestro estudio es de 198 mg/dl. La diferencia radica en que nuestro estudio es en individuos que acuden al laboratorio clínico y la ENEC lo realizó en una gran población abierta (Rull J. et al., 1995).
- Las personas con valores plasmáticos de triglicéridos en ayunas entre 250 y 500 mg/dl tienen mayor riesgo de presentar enfermedad cardiovascular.
- Por último, los pacientes con valores por arriba de 500 mg/dl tienen hipertrigliceridemia y existe el riesgo de pancreatitis y deben recibir tratamiento (Zorrilla E., 1989).

Por lo antes mencionado, los límites obtenidos no deben utilizarse en el laboratorio y sólo pueden usarse para describir a nuestra población y ver qué porcentaje padece hipertrigliceridemia según lo descrito anteriormente; y seguir utilizando los valores recomendados internacionalmente para triglicéridos.

g) HEMOGLOBINA Y HEMATOCRITO

Intervalo de referencia obtenido con MCD: Hemoglobina

Mujeres:9.77-14.5g/dl.

Hombres:11.23-16.22

g/dl.

Hematocrito:

Mujeres:35.12-46.54 %

Hombres:38.11-51.99%

Valores atípicos eliminados estadísticamente: Hemoglobina:

Mujeres:23 valores

Hombres:20 valores

Hematocrito:

Mujeres: 38 valores

Hombres:32valores

Individuos eliminados por patología o condición fisiológica:

Hemoglobina:

Mujeres:268

Hombres:38

Hematocrito:

Mujeres:269

Hombres:38

Intervalo utilizado en el laboratorio:

Hemoglobina

Mujeres: 12 – 16 g/dl

Hombres: 14-18 g/dl

Hematocrito

Mujeres: 37 – 48 %

Hombres: 42 - 52

Como se puede observar, los intervalos obtenidos con MCD son inferiores a los utilizados en el laboratorio. A pesar de estar considerablemente por debajo de los utilizados en el laboratorio, sí podemos usarlos, pues son específicos para nuestra población estudiada y reflejan su modo de vida, alimentación, estatura, masa corporal, etc., y no son indicativos de alguna patología de acuerdo al conocimiento actual. Para hemoglobina de hombres y mujeres y hematocrito de hombres fue necesario transformar los datos utilizando cada valor elevado al cubo y en el hematocrito de las mujeres elevado al cuadrado para que siguieran una

distribución gaussiana.

Estos dos componentes se relacionan íntimamente y por eso se discuten juntos, pues no se puede hablar de cada uno por separado, ya que de uno depende el otro y viceversa.

Se observan amplios intervalos de referencia y los intervalos inferiores son muy bajos. En estos casos se observó lo siguiente:

- En el caso de hombres, de los 354 individuos estudiados, 71 son diabéticos, y solamente 25 presentan valores menores a 13 g/dl y la mayoría de los individuos restantes que presentan valores inferiores a 13 son individuos sanos pero de edad avanzada.
- En el caso de las mujeres las que presentan valores inferiores a 12 la mayoría son sanas y sólo algunas son diabéticas (17 de 467) por lo que se descarta la posibilidad de que la diabetes causara interferencia en la obtención de estos intervalos de referencia.
- La observación de los diabéticos se hizo por considerar que al tener un posible daño renal pudieran tener una disminución de producción de eritropoyetina y ocasionar bajos niveles de hemoglobina
- La dieta juega un papel importante en estos tipos de componentes. Y como en el caso de la creatinina, la estatura y masa corporal de las personas influye en estos valores, así como la posición geográfica, altura sobre el nivel del mar (a mayor altura, mayor producción de eritrocitos), etc.
- Otro factor que provoca una considerable disminución de estos parámetros es el alto grado de medicación que recibe nuestra población, pues como la mayoría acude instituciones de salud pública, les recetan dosis altas y por tiempo prolongado de antibióticos, por ejemplo el cloranfenicol que produce aplasia medular (disminución en la capacidad de la médula ósea para formar células hematopoyéticas), o los medicamentos desparasitantes, etc.
- La elevada prevalencia de las parasitosis intestinales en nuestro país es otra causa de obtención de valores tan bajos, pues ciertos parásitos como la Giardia

lamblia (la amiba más frecuente en nuestro país), provoca mala absorción de sustancias tales como vitamina B6 y B12 así como de ácido fólico los cuales son indispensables en la eritropoyesis.

- Relacionado con lo anterior, en nuestro país son muy comunes la tifoidea, parasitosis e infecciones gastrointestinales lo cual provoca una ingesta elevada de antibióticos y desparasitantes que como se mencionó anteriormente afectan la producción de eritrocitos y por lo tanto de hemoglobina.

Por lo mencionado anteriormente, podemos considerar que los valores obtenidos pueden utilizarse en el laboratorio, pues las condiciones físicas, geográficas, fisiológicas y socioeconómicas de la población de nuestro laboratorio, difieren mucho del país donde se fabrica el reactivo(Alemania). Además se ha observado en los pacientes del laboratorio, que tener estos niveles bajos de hemoglobina no les provocan malestares o molestias físicas pues el organismo de estas personas ha compensado bien la probable anemia (McKenzie S.B., 1991).

Una recomendación que dan para la realización de este tipo de estudios, es el utilizar solamente como individuos de referencia a sujetos menores a 40 años para evitar intervalos muy amplios y una mayor dispersión (Alva S.I., 1995).

2.- Obtención de una región de referencia multivariada para hemoglobina y hematocrito

El intervalo de referencia viene a ser definido por los límites que encierran una proporción específica de la población, generalmente el 95%. Estos intervalos de referencia, se realizaron primero de manera univariada, es decir, para un componente bioquímico en particular, pero recientemente esta definición de intervalo de referencia univariada, se ha extendido a una región de referencia multivariada. Para obtener una región de referencia multivariada, se toma en cuenta, no a cada uno de los componentes bioquímicos por separado, sino que se

construye con la información de varios componentes bioquímicos correlacionados (Albert A. y Harris E.K., 1987).

Para obtener retrospectivamente los intervalos de referencia univariados o las regiones de referencia multivariadas, es necesario tener una base de datos que incluyan además de la concentración o actividad del componente bioquímico medido, el género, la edad y datos de diagnóstico clínico para poder excluir personas en este tipo de estudios.

En este caso particular, se obtuvieron primero intervalos de referencia de manera univariada para hemoglobina y hematocrito tanto para mujeres como para hombres, todos ellos mayores de 14 años que es la edad a la cual se alcanzan las concentraciones propias de un adulto para estos dos componentes bioquímicos. Tanto en el análisis univariado como en el multivariado, se excluyeron del estudio personas que presentan patologías en las que se ven afectados estos dos parámetros.

La importancia de evaluar estos dos parámetros juntos, radica en que ambos son muy importantes en el proceso diagnóstico de anemia, la cual es un síndrome clínico y de laboratorio caracterizado por palidez, astenia, disnea, acompañado de disminución en los niveles normales de hemoglobina en la sangre. Aquí es donde surge la necesidad de saber qué valores son "normales" para una población en particular, pues no podemos comparar una persona que vive en Alemania con una que vive en México. Además en la literatura también existen muchas diferencias al momento de definir qué valores son normales para hemoglobina y hematocrito (Carrillo J. y Pérez S., 1997)

Se dice que la anemia es un síndrome porque tiene muchas causas. De hecho, existen aproximadamente 500 causas del proceso y en casa paciente la etiología debe ser determinada con exactitud si se quiere administrar

un tratamiento apropiado. Por ejemplo: la administración de vitamina B12 no cura la anemia por deficiencia de hierro, y el hierro no cura la anemia hemolítica autoinmune. A primera vista podría parecer muy difícil establecer el diagnóstico etiológico existiendo tantas posibilidades, sin embargo esto no es tan complicado si se sigue un orden preciso en los estudios. Para fines prácticos se pueden clasificar casi todas las anemias en tres grandes grupos morfológicos que son los siguientes:

- I.- Anemias hipocrómicas (generalmente microcíticas)
- II.- Anemias normocíticas normocrómicas.
- III.- Anemias macrocíticas normocrómicas

Para identificar a qué grupo pertenece una anemia, se deben evaluar tres parámetros: hemoglobina, hematocrito y número de eritrocitos y de esta manera obtener los índices eritrocitarios tales como volumen globular medio (para evaluar si es normocítica, microcítica o macrocítica), concentración media de hemoglobina globular (para evaluar si es hipocrómica, normocrómica o hipercrómica) y la hemoglobina globular media (Carrillo J. y Pérez S., 1997)

Por lo antes mencionado, es importante evaluar los intervalos de referencia para hemoglobina y hematocrito, pues de ello depende que digamos si la persona tiene una cantidad de hemoglobina menor a lo esperado para su edad, género, altura sobre el nivel del mar a la que vive, administración poco controlada de antibióticos hábitos alimenticios (los cuales se ven influenciados por la cultura, religión y estilo de vida, por ejemplo), masa corporal, etc. Todos estos factores deben tomarse en cuenta para construir los intervalos de referencia o las regiones de referencia, pues los valores obtenidos, serán específicos para la población estudiada.

De esta manera, al obtener los intervalos de referencia o regiones de referencia para nuestra población podremos establecer los criterios diagnósticos apropiados que el médico necesita para evaluar si el paciente tiene o no anemia y de qué tipo de anemia se trata, pues a partir de los valores de hemoglobina y hematocrito obtenemos la Concentración Media de Hemoglobina Globular (CMHG) lo cual determina si la anemia es hipocrómica, normocrómica o hiperocrómica.

Tanto para el análisis univariado como multivariado, se estudiaron 358 individuos masculinos, se eliminaron con el estimador MCD los valores atípicos y se obtuvo como intervalo de referencia de hemoglobina para este grupo de individuos de 11.997-16.445 mg/dl y de hematocrito de 39.799-52.6345%. Estos intervalos obtenidos son más bajos que los que se utilizan en el laboratorio (hemoglobina para hombres de 14 a 18 mg/dl y hematocrito de 42 a 52%), pero como mencionamos anteriormente no podemos comparar nuestra población con la de Alemania donde se fabrica el reactivo y por lo tanto estos intervalos obtenidos son de mayor utilidad diagnóstica que los incluidos en los reactivos o los mencionados en la literatura.

Después se realizó el análisis multivariado para estos dos parámetros tomando en cuenta que éstos guardan cierta relación entre sí (según la literatura, la relación normal entre hemoglobina y hematocrito es de 1:3) y no deben evaluarse por separado sino en conjunto pues uno se relaciona con el otro y no podemos darle mayor importancia a uno por separado y subestimar al otro. Al realizar este análisis multivariado se graficaron los pares de datos (hemoglobina y hematocrito) para cada individuo y podemos observar que sí existe una fuerte correlación positiva entre la hemoglobina y el hematocrito ($r = 0.818$) y confirmamos que uno depende del otro pero no siempre se cumple estrictamente la relación 1:3 por lo que debemos decir que la relación entre hemoglobina y hematocrito es "aproximadamente" 1:3 y no querer que se cumpla estrictamente

esta relación. Por lo tanto los valores de hemoglobina y hematocrito no se deben calcular uno a partir del otro. Esto es una práctica en algunos laboratorios, en donde solamente determinan analíticamente uno de los dos y a partir de ese valor obtienen el otro asumiendo que guardan una relación 1: 3; pero como esto no es exacto, pueden dificultar el diagnóstico de una patología donde esta relación no se cumple. Por eso es importante determinar analíticamente cada uno y no querer que entre ellos exista estrictamente la relación 1:3, pues cuando esto no ocurre, muchas veces el analista piensa que estuvo mal hecha la determinación y lo repite. Por supuesto, para que esto no ocurra y podamos confiar plenamente en nuestros resultados obtenidos, se debe tener un control de calidad que abarque desde la fase pre-analítica, fase analítica y fase post-analítica del estudio realizado para garantizar que las determinaciones fueron correctamente determinadas.

Con el análisis multivariado se construyó una región de referencia elipsoidal la cual se convierte en la región de referencia para los pares de datos de los dos componentes bioquímicos estudiados de esta población definida de individuos y que presentan una distribución normal. Esta elipse se construye para que estadísticamente contenga un porcentaje específico del total de la población estudiada (95%). Con este análisis multivariado se eliminaron 52 pares de datos atípicos los cuales se pueden observar en la gráfica y se distinguen porque se encuentran fuera de la elipse y se nota que no se ajustan a la relación que guardan entre sí los demás pares de datos. En esta gráfica también se detectan 9 individuos con valores falsos positivos. Sobre esta elipse se sobrepone un polígono cuyos vértices son los límites inferior y superior de los intervalos de referencia obtenidos de manera univariada. De esta manera podemos detectar los valores falsos positivos, los cuales son pares de datos que se encuentran dentro de la elipse que es nuestra región de referencia pero que, acuerdo con los intervalos de referencia univariados, detectan al menos a uno de los dos parámetros (hemoglobina o hematocrito) fuera de ellos.

Al evaluar en conjunto los resultados obtenidos tanto en el análisis univariado como el análisis multivariado, podemos concluir que la obtención de intervalos de referencia, o regiones de referencia multivariada que incluye valores más bajos que los indicados en las técnicas de los reactivos o en la literatura, se debe a la diferencia existente entre la población estudiada por nosotros y la estudiada en otros países y confirma la necesidad de construir cada laboratorio clínico sus propios intervalos o regiones de referencia para establecer los criterios diagnósticos adecuados, en este caso particular, para anemia. Además, puede llegar a pensarse que la población estudiada está tan acostumbrada a tener este tipo de valores que no presentan los síntomas clínicos de la anemia como disnea, palidez, etc., y nos atreveríamos a decir que los valores obtenidos son normales para nuestra población.

Es importante mencionar, que el organismo tiene dos mecanismos de adaptación a la anemia que pueden explicar cómo los individuos cuyo valor de hemoglobina y hematocrito se encuentran dentro de los intervalos de referencia o en la región de referencia y que según la literatura son bajos, no presentan los síntomas de la anemia.

Los mecanismos de adaptación a la anemia son:

- Incremento en el flujo de sangre oxigenada

El flujo de sangre oxigenada a los tejidos puede ser mayor por incremento de la frecuencia cardíaca, del gasto cardíaco y de la velocidad de la circulación. Mientras el nivel de hemoglobina se mantiene por encima de los 8 g/dl, el volumen cardíaco es normal si el paciente está en reposo(Platt, W.R., 1982).

- Incremento en el empleo de oxígeno por los tejidos

Hasta que el nivel de hemoglobina no se encuentra bastante por debajo de los 10 g/dl, los síntomas de anemia no resultan evidentes. En este momento es cuando un mecanismo compensatorio importante a nivel celular, que permite al tejido

extraer más oxígeno de la hemoglobina, comprende un incremento en 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) dentro del eritrocito(Platt, W.R., 1982).

La sintomatología de la anemia depende de la gravedad de la hipoxia, la intensidad del ejercicio físico, la duración del proceso anémico y de cómo el paciente ha compensado fisiológicamente la anemia (McKenzie S.B.,1991).

El diagnóstico de la anemia y determinar su causa, se hacen por medio de una combinación de informes recibidos de la historia del paciente, el examen físico y la investigación del laboratorio que incluyen pruebas como medición de hemoglobina y hematocrito, cuenta de eritrocitos, reticulocitos, examen de un frotis sanguíneo, cálculo de índices eritrocitarios y valores de bilirrubina. Después de obtener la historia del enfermo y hace el examen físico, ordenará el médico pruebas de laboratorio si sospecha de anemia. En todos los casos los datos clínicos se integran con los resultados de laboratorio para un diagnóstico correcto. Es importante enfatizar que el diagnóstico de anemia no debe apoyarse en forma total en los hallazgos de laboratorio, sino que requiere también el aspecto fisiopatológico.

C.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio

Cuando a una persona se le realiza la medición de algún componente bioquímico en particular, esa medición aislada, no proporciona mucha información acerca del patrón de comportamiento de ese componente medido en el sujeto estudiado. Para obtener un punto de referencia, es necesario estudiar un grupo de individuos con las mismas características para comparar contra sus mediciones, la medición observada en un individuo en particular. Para ello necesitamos tener una serie de mediciones consecutivas de un mismo componente bioquímico a través de intervalos regulares de tiempo para un grupo de personas con las mismas características. A partir de esa información podemos obtener el

VII.- CONCLUSION

A.- Selección de individuos de referencia

La producción de intervalos de referencia de cualquier población de individuos requiere la selección adecuada y a menudo la partición. Esto sólo puede ser hecho mediante la cuidadosa descripción de las características de los individuos de referencia y mediante la aplicación de criterios claramente establecidos. Se pone énfasis en que dependiendo de los usos de los intervalos de referencia y el tipo de magnitud, deben ser usadas todas o una parte de las pautas esquematizadas en los documentos publicados por la IFCC.

B.- Obtención de intervalos de referencia univariados y regiones de referencia multivariadas

1.- Intervalos de referencia univariados.

- a) La diferencia en los intervalos de referencia de glucosa, entre nuestra población y los señalados en los instructivos de los reactivos que corresponden a otros países, se deben a los aspectos genéticos, tipo de alimentación, y estilo de vida, por lo que se consideran normales y no representan valores patológicos en los individuos.
- b) Para urea disminuye la amplitud del intervalo obtenido respecto al utilizado en el laboratorio lo cual conduce a criterios diagnósticos más específicos.
- c) En el caso de creatinina hay poca variación en los intervalos obtenidos y los utilizados en el laboratorio.
- d) Los intervalos de referencia obtenidos para ácido úrico son considerablemente más altos en nuestra población. Por lo tanto no se utilizan para fines diagnósticos sino simplemente como intervalos de prevalencia para estudiar la población.

- e) Los resultados de este trabajo coinciden con otros realizados en México, en donde se ha observado que la concentración promedio de colesterol en la población mexicana es mayor a 200 mg/dl. Por lo tanto, los intervalos de referencia para colesterol, aquí presentados sólo deben considerarse descriptivos de las concentraciones que presenta nuestra población.
- f) Algunas diferencias observadas en los intervalos de referencia de los 8 parámetros estudiados, respecto a los obtenidos en otros laboratorios podrían ser explicadas por diferencias en la exactitud; en el tratamiento pre-analítico de las muestras, o al tipo de población. Lo que confirma la sugerencia internacional de que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia

2.- Regiones de referencia multivariadas

La obtención de regiones de referencia multivariadas proporcionan un criterio diagnóstico integral, lo cual puede solucionar el problema de las falsas alarmas por valores altos de algún componente bioquímico observado en individuos que se realizan chequeos multifásicos de rutina. La causa de este fenómeno es la comparación por separado de los valores observados con intervalos de referencia para cada tipo de magnitud.

C.- Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio

Con este nuevo enfoque, podemos monitorear la salud de los individuos con características fisiológicas similares, y detectar oportunamente, un cambio estadístico y clínico de importancia que indique el comienzo de algún estado anormal temporal. De esta manera, no pasarán inadvertidos casos de personas que muestren valores que caen dentro de los intervalos de referencia utilizados en el laboratorio, pero en los cuales no se advierte la variación biológica tan grande entre esas mediciones que son indicadores de algún desorden metabólico o inicio de una patología.

Con este tipo de estudios, la atención médica que recibe el paciente, será oportuna, lo cual resulta beneficioso siempre ya que el problema se atacará en sus inicios y será más fácil para el médico devolver al sujeto a su estado inicial de salud.

VIII.- SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO

La obtención de intervalos de referencia, exige cada vez más la conjugación de los conocimientos tanto de los químicos clínicos como de los médicos, estadísticos, trabajadores sociales, etc., y sobre todo, la cooperación de los pacientes. Todo esto, con el único fin de producir datos útiles para el diagnóstico, monitoreo y prevención de enfermedades en nuestra población, lo cual beneficia la calidad de vida de los individuos que la forman. De esta manera, es necesario que las personas involucradas en este tipo de estudios, conozcan la terminología universal que proponen los documentos de la IFCC para uniformar los criterios en cuanto a intervalos de referencia se refiere y poder interpretar los valores observados en cada individuo,

Los resultados de los estudios realizados en este trabajo, confirman que existen muchos factores que pueden influir en la obtención de intervalos de referencia para el laboratorio clínico. Por ello, se recomienda utilizar cuestionarios como el propuesto aquí, para tener bases de datos confiables y realizar cualquier tipo de estudio que requiera el laboratorio.

También se recomienda que las instituciones de educación organicen cursos de actualización para el personal del laboratorio clínico, ya que está en sus funciones. Esto con el fin de divulgar más ampliamente este tipo de estudios que es indispensable los realicen en cada uno de los laboratorios de México y del mundo, pues forman parte del control de calidad que debe seguirse en todo laboratorio clínico. También es importante que en la currícula de las carreras afines a esta disciplina se profundice más en este tipo de métodos estadísticos utilizados para estudiar la población que acude a nuestros laboratorios, pues en resumidas cuentas, es precisamente esa población la que resultará beneficiada con estos estudios y a la que se debe atender de manera

prioritaria, ya que de la salud de nuestra población, se determinará en gran medida el desarrollo socioeconómico de México.

Una sugerencia propuesta en base a los estudios realizados en este trabajo, es la de promover en los laboratorio clínicos, la obtención de los intervalos de referencia a cada individuo.

Para los futuros trabajos relacionados con valores de referencia, es conveniente realizar cuestionarios que se apliquen a cada paciente que acuda al laboratorio, con el fin de obtener mayor información clínica de ellos y poder utilizar esta información en estudios más avanzados y tener una selección de individuos por medio de una clasificación adecuada de cada uno de ellos. Los cuestionarios pueden ser de la siguiente manera como se muestra en la Figura 21.

LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS "CLINI-LAB"

Prolongación corregidora # 32 Sur. Querétaro, Qro. Tel.:2-14-00-88

Nombre del Paciente: _____

Fecha _____ No. Expediente _____ Edad: _____ Sexo: _____

Estatura _____ Peso _____

Domicilio: _____

Teléfono: _____ Ciudad, municipio, _____ Edo. _____

Ocupación _____

Probable Diagnóstico: _____

Diagnóstico Confirmado _____

Terapia medicamentosa _____

Horas de ayuno antes de la punción venosa _____

Medicamentos ingeridos 24 hrs. antes de la punción _____

Alimentos ingeridos 24hrs. antes de la punción _____

¿Consumo alcohol? _____ Frecuencia _____ Cantidad _____

¿Fuma? _____ Frecuencia _____ Cantidad _____

Tipo sanguíneo (si lo conoce) _____

¿Toma anticonceptivos orales? _____

¿Realiza ejercicio frecuentemente? _____ ¿Antes de la punción? _____

Observaciones _____

Figura 21.- Cuestionario propuesto para selección de individuos de referencia.

IX.- ANEXOS

A.- Métodos estadísticos

A.1.- El estimador MCD

A partir de datos seleccionados de manera retrospectiva, la metodología que hemos seguido en la reconstrucción de límites de referencia para cada componente biológico, consta en general de tres etapas:

- Exclusión de individuos con patologías o circunstancias que afectan al (a los) componente (s) del (de los) se desea(n) construir en el intervalo la región de referencia.
- Detección de observaciones típicas por medio de métodos robustos de estimación
- Construcción del intervalo de referencia

En la segunda etapa es necesario contar con estimadores que resistan ante la presencia de atípicos y estimen de manera robusta la localización y la dispersión. Para ello por X al conjunto de n datos en p componentes bioquímicos, es decir X es una matriz

$$X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ x_n \end{bmatrix}$$

Donde x_i es el vector de p dimensiones que registran los valores de los p componentes bioquímicos sanguíneos para el individuo i -ésimo de la muestra. El enfoque que se ha dado para la construcción de regiones multivariadas

de referencia centra sus esfuerzos en individuos prospectivamente seleccionados y utilizando lo que se conoce como la distancia de Mahalanobis clásica:

$$\left[(x_i - \bar{x})^T S^{-1} (x_i - \bar{x}), i = 1, \dots, n \right]$$

donde \bar{x} es el vector que contiene a los promedios muestrales para cada componente bioquímico y S es la matriz de covarianzas muestrales. Si un x_i es tal que su distancia de Mahalanobis clásica no fuera una forma adecuada de obtener regiones de referencia. En este sentido es necesario usar estimadores que sean robustos ante una cantidad considerable de observaciones atípicas y a partir de ellos, usando la misma ecuación de la distancia de Mahalanobis pero con los estimadores robustos, obtener regiones de referencia robustas.

Un estimador robusto es el estimador llamado de covarianza con determinante mínimo, propuesto por Rosseeuw (1985). El algoritmo (llamado FAST MCD) para su cómputo práctico fue desarrollado por Rosseeuw y Van Driessen (1999):

Algoritmo FAST_MCD:

1. Repita digamos 500 veces los siguientes pasos:

- Construya un conjunto inicial de tamaño h denotado por J usando el siguiente método:
 - Seleccione aleatoriamente un conjunto de $(p + 1)$ observaciones de las n originales; compute su promedio aritmético T_o y su matriz de covarianzas S_o . Si el determinante de S_o es igual a cero, entonces extienda a J añadiendo otra observación de manera aleatoria, continúe añadiendo observaciones hasta que el determinante correspondiente sea mayor a cero. Compute las distancias cuadradas siguientes:

$$d_{old}^2(i) = (x_i - T_o)^T S_o^{-1} (x_i - T_o), i = 1, \dots, n.$$

- Construya un subconjunto denotado por H_1 conformado por las h observaciones cuyas distancias sean las h menores.
- Lleve a cabo en dos ocasiones lo siguiente:

$$d_{old}^2(i) = (x_i - T_{old})^T S_{old}^{-1} (x_i - T_{old}), i = 1, \dots, n.$$

- Dado un conjunto H_{old} (al inicio H_1) o el par (T_{old}, C_{old}) compute las distancias cuadradas. Conforme H_{new} con las h observaciones cuyas distancias sean las mas pequeñas entre las n distancias. Compute (T_{new}, S_{new}) .

2. Para los 10 mejores de los 500 generados en el paso 1 anterior, mejores en el sentido que el determinante de las matrices de covarianza empírica tengan los 10 menores determinantes, lleva a cabo lo siguiente hasta convergencia:

- Dado un subconjunto H_{old} (al inicio H_1) o el par (T_{old}, C_{old}) compute las distancias cuadradas

$$d_{old}^2(i) = (x_i - T_{old})^T S_{old}^{-1} (x_i - T_{old}), i = 1, \dots, n.$$

Conforme H_{new} con las h observaciones cuyas distancias sean las mas pequeñas entre las n distancias. Compute (T_{new}, S_{new}) .

3. Reporte la solución (T_{MCD}, S_{MCD}^*) tal que S_{MCD}^* tiene el determinante mas pequeño.

4. Para tener consistencia en el caso de muestreo de una población normal,

$$S_{MCD} = c_{n,p}^2 \left\{ \text{mediana} \left\{ (x_i - T_{MCD})^T S_{MCD}^{*-1} (x_i - T_{MCD}) \right\} / X_{p,0.5}^2 \right\} S_{MCD}^*$$

con $c_{n,p}^2 = \left(0.93 + \frac{18.47}{(n-p)} \right)^2$ (Castaño E., 2000).

5. Estimadores de un paso son entonces:

$$T_1 = \frac{\sum_{i=1}^n w_i x_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

$$S_i = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (x_i - T_i)^T (x_i - T_i)}{\sum_{i=1}^n w_i - 1}$$

$$w_i = \begin{cases} 1 & \text{si } d_{(T_{MCD}, S_{MCD})}(i) \leq \sqrt{X^2_{p,0.975}} \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases}$$

A.2.-Obtención del Límite de Referencia Para Un Cambio entre dos mediciones consecutivas de un sujeto

Este es un enfoque complementario al tradicional de límites de referencia; su objetivo sigue siendo el evaluar la condición de un individuo en un componente bioquímico, pero a través de establecer si la diferencia entre dos mediciones consecutivas del componente es significativamente diferente de cero a un nivel de confianza. Para tal evaluación es necesario calcular lo que se denomina límite de referencia para un cambio.

Este enfoque en general puede ser usado tanto en sujetos sanos como en pacientes, con la condición de que su estado sea estadísticamente estable. Sin embargo, se debe señalar que los datos a ser procesados para la obtención de un límite de referencia para un cambio entre dos mediciones, tienen características típicas.

- En sujetos, las serie de datos son grandes, en intervalos largos en el tiempo y con una periodicidad regular
- En pacientes los datos son series cortas, en intervalos cortos de tiempo y con periodicidad regular.

Denote por X al componente bioquímico de interés en un individuo; sean X_1 y X_2 dos mediciones consecutivas del mismo. El enfoque es establecer cuando la diferencia

$$D = X_1 - X_2$$

es chica o es grande. Un elemento esencial para lo anterior es la varianza de tal diferencia $V(D)$, que se calcula como

$$V(D) = \sigma^2(X_1) + \sigma^2(X_2) - 2\rho\sigma^2(X_1)\sigma^2(X_2),$$

Donde $\sigma^2(X_1)$ representa la varianza de X en el momento 1 de tiempo, y ρ el coeficiente de correlación entre X_1 y X_2 . Una suposición razonable es que

$$\sigma^2(X_1) = \sigma^2(X_2) = \sigma^2(X) \equiv \sigma^2,$$

Con lo que

$$V(D) = 2\sigma^2(1 - \rho) \quad (1)$$

En sujetos sanos, asumiendo que sus series de datos son tomadas a intervalos largos, se puede suponer que $\rho=0$, con lo que

$$V(D) = 2\sigma^2. \quad (2)$$

En cualquiera de las dos expresiones anteriores se necesita estimar a σ^2 , la varianza en X en el individuo bajo estudio. Para ello, denotemos por S^2 la varianza observada basada en t resultados de mediciones seriales en el individuo; la varianza y la media de S^2 las denotamos por $V(S^2)$ y $E(S^2)$, respectivamente. Si se puede suponer que X en el tiempo es aproximadamente descrita por la distribución Normal, entonces la distribución condicional de S^2 dado σ^2 es una distribución Gamma,

$$\Gamma_{S^2/\sigma^2}(S^2/\sigma^2) = \left(\frac{k}{2\sigma^2}\right)^{\frac{k}{2}} \frac{(S^2)^{\frac{k-2}{2}}}{\Gamma\left(\frac{k}{2}\right)} \exp\left(-\frac{kS^2}{2\sigma^2}\right),$$

donde $k=t-1$. Entonces la esperanza y la varianza de una variable Gamma se sabe que son, respectivamente,

$$E(S^2/\sigma^2) = \sigma^2, V(S^2/\sigma^2) = \frac{2\sigma^4}{k}.$$

De la distribución condicional S^2/σ^2 se puede obtener la distribución incondicional de S^2 si se conociera la distribución de σ^2 . En principio se sabe que

$$V(S^2) = E[V(S^2/\sigma^2)] + V[E(S^2/\sigma^2)] = \frac{2E(\sigma^4)}{k} + V[\sigma^2] \quad (3)$$

Ahora, por definición de la varianza de cualquier variable aleatoria, se tiene que

$$E(\sigma^4) = V(\sigma^2) + (E(\sigma^2))^2 \quad (4)$$

Substituyendo(4) en (3), se tiene que

$$V(S^2) = \frac{2}{k} \{ V(\sigma^2) + [E(\sigma^2)]^2 \} + V(\sigma^2)$$

Por lo tanto,

$$V(S^2) = V(\sigma^2) \frac{k}{k+2} + \frac{2}{k} [E(\sigma^2)]^2$$

Despejando $V(\sigma^2)$ se tiene que

$$V(\sigma^2) = \frac{k}{k+2} \left(V(S^2) - \frac{2}{k} [E(S^2)]^2 \right)$$

Si estimamos $E(\sigma^2)$ se tiene que

$$V(\sigma^2) = \frac{k}{k+2} \left(V(S^2) - \frac{2}{k} [E(S^2)]^2 \right) \quad (5)$$

Para poder operar con la expresión anterior es necesario entonces estimar $V(S^2)$ y $E(S^2)$. Para ello se recurre a un grupo de m sujetos similares al individuo bajo estudio; para cada uno se computa su varianza de las mediciones seriales correspondientes; denote por s_1^2, \dots, s_m^2 , y así se tendrían estimaciones aceptables para $V(S^2)$ y $E(S^2)$; sin embargo se ha observado que en la práctica la distribución de s_1^2, \dots, s_m^2 , está bien aproximada por la distribución lognormal, es decir que en teoría $\log S^2$ es aproximadamente *Normal* ($E(S^2), V(S^2)$).

En este caso,

$$E(S^2) = \exp \left(M_{\{\ln(\sigma^2)\}} + \frac{1}{2} S_{\{\ln(\sigma^2)\}}^2 \right) \quad (6)$$

$$V(S^2) = [E(S^2)]^2 \left(\exp\left(\frac{1}{2} S_{\ln(\sigma_i^2)}^2\right) - 1 \right)$$

donde $M_{\{\ln(s_i^2)\}}$ y $S_{\{\ln(s_i^2)\}}^2$ es el promedio y la varianza de los logaritmos de las s_1^2, \dots, s_m^2 , respectivamente. Las expresiones en (6) al ser sustituidas en la expresión (5), permiten de manera operativa contar con un estimador de varianza de σ^2 mientras que la primera expresión de (6) es un estimador de la esperanza de σ^2 . Además la lognormalidad de las varianzas observadas s_1^2, \dots, s_m^2 , se tiene el resultado de que la distribución de las verdaderas varianzas $\sigma_1^2, \dots, \sigma_m^2$, es también lognormal aunque con una varianza menor. Entonces, ya conociendo $\hat{E}(S^2)$ y $V(S^2)$, las expresiones en (6) con $\sigma_1^2, \dots, \sigma_m^2$, en lugar de s_1^2, \dots, s_m^2 , pueden ser utilizadas para obtener valores de $M_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}$ y $S_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}^2$; despejando de (6), se tiene entonces que,

$$M_{\{\ln(\sigma_i^2)\}} = \ln(E(S^2)) - \frac{1}{2} S_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}^2$$

$$S_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}^2 = \ln\left(\frac{V(S^2)}{[E(S^2)]^2} + 1\right)$$

Así, si $2t_p$ representa al cuantil de orden p de las distribución de $\sigma_1^2, \dots, \sigma_m^2$, puede estimarse por

$$\text{lognormal}(M_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}, S_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}^2)$$

se tiene que

$$t_p = \exp\left\{M_{\{\ln(\sigma_i^2)\}} + \Phi^{-1}(p) \sqrt{S_{\{\ln(\sigma_i^2)\}}^2}\right\} \quad (7)$$

Donde $\Phi^{-1}(p)$ es el valor en donde se acumula p de probabilidad bajo una distribución *Normal* (0,1). Así, en un componente bioquímico dado, t_p puede pensarse como una varianza mayor al p por ciento de las varianzas de la población semejante al individuo de interés. Substituyendo (7) en la expresión (2), se tendría que

$$V(D) = 2t_p$$

Para obtener el límite de referencia para un cambio, sea D_p una diferencia tal que $|D_p| / 1.96$ es un cuantil de la distribución de la desviación estándar de D . Esto es, suponiendo que la autocorrelación es cero, entonces $D_p^2 = 2(1.96)^2 t_p$, donde t_p es el cuantil estimado de orden p de la distribución de σ^2 . Graficando $|D_p|$ en un gráfico probabilístico Normal, se obtiene una gráfica de la proporción estimada de individuos en los que un cambio de $|D_p|$ unidades entre el valor actual y el previo sería estadísticamente significativo (diferente de cero) a un nivel del 5% de probabilidad. Así, el límite de referencia para un cambio es

$$D_p = \sqrt{2(1.96)^2 t_p}$$

El valor recomendado en la literatura a la fecha es $p = 0.90$.

B.-CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLINICO

La razón por la cual hacemos resaltar la importancia del control de calidad dentro de un laboratorio clínico, radica en el hecho de que un resultado con mala calidad puede originarse a partir de las fuentes de variación mencionadas anteriormente y generar dos tipos de consecuencias igualmente indeseables:

☛ Falsos Positivos:

- * Retraso en el diagnóstico y tratamiento de padecimientos agudos.
- * No detección de enfermedades crónicas.

☛ Falsos Negativos:

- * Consultas innecesarias.
- * Estancia hospitalaria prolongada.
- * Series de pruebas innecesarias.
- * Riesgo de investigaciones "in vivo".
- * Terapia innecesaria.
- * Exposición a medicamentos potencialmente tóxicos.
- * Cirugía exploratoria innecesaria.

Las fuentes de variación, se dividen en general en tres tipos: pre-examen, durante el examen y post-examen; las cuales se describen a continuación:

Fuentes de variación pre-examen: Estas fuentes de variación pueden producir cambios reales en las concentraciones de los componentes que se miden. Si estas variaciones se consideran al establecer los valores de referencia, se disminuye su efecto al estudiar a los pacientes en condiciones semejantes, lo cual, al mismo tiempo, permite estudiar adecuadamente las variaciones debidas a las patologías. A su vez, estas variaciones pueden originarse en el paciente, en la muestra

biológica obtenida, o durante el manejo y conservación de la muestra como se señala a continuación:

Paciente:

Preparación del paciente (dieta, ejercicio, estrés, tiempo de ayuno, etc.).

Instrucciones previas al estudio.

Hora en que se colecta la muestra.

Tiempo que se tarda en la colección de la muestra.

Posición del paciente previa y durante la colección de la muestra.

Interferencia por medicamentos de tipo biológica.

Hemólisis intravascular.

Las variaciones cíclicas, diarias, estacionales o anuales.

Muestra:

Identificación del paciente y de la muestra.

Torniquete apretado y tiempo del mismo.

Aditivos (tipo, mezclado, cantidad, etc.).

Tipo de agujas y jeringas.

Manejo y conservación de la muestra.

Transporte (temperatura, tiempo, estabilizadores, vibración).

Exposición a la luz.

◇ Hemólisis.

◇ Ictericia.

◇ Lipemia.

◇ Interferencia por medicamentos, de tipo químico.

◇ Sangre venosa, arterial o capilar.

◇ Sangre, plasma o suero.

⇒ Manejo y conservación de la muestra

◇ Tiempo de separación del suero o plasma.

- ◇ Temperatura en que se mantienen las muestras.
- ◇ Identificación de tubos de una misma muestra.
- ◇ Forma de separación del coágulo (micro hemólisis).
- ◇ Condiciones de centrifugación.
- ◇ Forma de almacenaje: Evaporación, humedad, temperatura, luz, congelamiento/descongelamiento, mezcla previa a su utilización.

(Solberg H.E. and Stamm D., 1991, Part 4).

Fuentes de variación durante el examen: Son aquéllas que se producen durante el análisis de las muestras, éstas pueden considerarse aparentes, ya que son producidas por incapacidad para medir la concentración real del componente de interés. Estas variaciones pueden llegar a ser grandes y para disminuir su efecto, en la valoración de las variaciones debidas a las patologías, deberán seleccionarse los métodos de análisis, que basados en los criterios de practicabilidad (rapidez, costo, requerimientos, dependencia y seguridad) y veracidad (precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad), resulten mejores. También debe llevarse un control interno, riguroso y sistemático de la calidad analítica, comprobando los resultados a través de procedimientos de evaluación externa (Alva S.I., 1995).

A continuación se mencionan las principales fuentes de variación analíticas:

⇒ Reactivos:

- ◇ Incluyendo el agua.
 - ◆ Pureza.
 - ◆ Preparación.
 - ◆ Estabilidad y almacenamiento.
- ◇ Estándares y/o Calibradores

- ◆ Pureza.
- ◆ Preparación.
- ◆ Estabilidad y almacenamiento.
- ◇ Tipo de material y limpieza del mismo.
- ◇ Medición de volúmenes.
- ◇ Mezclado.
- ◇ Tiempo y temperatura de reacción.
- ◇ Interferencias / Especificidad metodológica.
- ◇ Instrumentos:
 - ◆ Mantenimiento.
 - ◆ Estabilidad electrónica.
 - ◆ Resolución óptica.
 - ◆ Manejo de instrumentos por los operadores.

(Solberg H.E. and Stamm D., 1991, Part 4).

Fuentes de variación post-examen: Son producto de prácticas posteriores al análisis de los especímenes y deben evitarse con buenas prácticas analíticas, ya que son difíciles de identificar y sólo se ponen de manifiesto cuando un resultado es incongruente o no hay correlación con el resultado de otros estudios y con el diagnóstico presuntivo del padecimiento (Alva S.I., 1995).

En general, estas variaciones son provocadas por errores que se cometen durante las siguientes etapas:

⇒ Errores en los cálculos:

- ◇ Anotaciones erróneas.
- ◇ Omisión del factor de dilución.
- ◇ Errores matemáticos.
- ◇ Unidades mal empleadas.
- ◇ Transposición de números.

⇒ Errores en los reportes:

- ◇ Confusión en el registro y/o nombre del paciente.

- ◇ Errores de transcripción.
 - ◇ Errores al reportar telefónicamente los resultados.
 - ◇ No utilización de valores de referencia adecuados para el método y la población.
- ⇒ Errores en la interpretación:
- ◇ Utilización de valores de referencia de un método diferente al utilizado.
 - ◇ No consideración de las unidades en que se reportan los resultados.
 - ◇ No consideración del efecto de medicamentos sobre el componente estudiado.
- (Solberg H.E. and Stamm D., 1991, Part 4).

X.-BIBLIOGRAFIA

Albert A. y Harris E.K.: Multivariate Interpretation of Clinical Laboratory Data. Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, 311 p.

Alva, S.I.: Estudio de la Calidad y algunos factores que la afectan, en los laboratorios clínicos mexicanos. México, D.F.: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional; 1995. 148p. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas.

Alva, S.I. y García, M.C.: Valores de Referencia para glucosa, urea, creatinina, ácido úrico y colesterol en la población mexicana. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 22/3: 449-467.1996

Castaño, Tostado E.: Small-sample correction factor of the minimum covariance determinant estimator. Communications in Statistics, Simulation and Comparison 29: Por aparecer, 2000.

Carrillo, J., Pérez S.: El concepto de Anemia. En: El atlas de hematología en video. Cyber-Cell, México, 1997, pp 48-51.

Chew, V.: Confidence, prediction, and tolerance regions for the multivariate normal distribution. J. Am. Stat. Assoc. 61: 605 – 617.1996.

Juárez, J.: Valores de Referencia para Lípidos y Lipoproteínas en mujeres mexicanas en edad reproductiva. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México: 1985. 136p. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico-Biólogo.

Krupp, M.A.: Diagnóstico clínico y de Laboratorio. Editorial Manual Moderno, México, 1986, 534 p.

McKenzie, S.B.: Hematología Clínica. Editorial Manual Moderno, México, 1991, 524p.

McPherson, K. Healy, M.J.R., Flynn, F.V., Piper, K.A.J., y García, P.: The effect of age, sex and other factors on blood chemistry in health. Clin Chem Acta 84:373-397, 1978.

PetitClerc, C.: Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 2. Selection of Individuals for the production of reference Values. Clin. Chem. 170: S3-S12, 1987.

Platt, W.R.: Atlas de Hematología. Editorial Jims S.A. de C.V., Barcelona, 1982, 645P.

Queraltó, J.M., Boyd, J. C. y Harris, E.K.: On the calculation of reference change values, with examples from a long-term study. CLIN-CHEM. 39/7: 1398-1403. 1993.

Reaven, G.M.: Role of insulin resistance in human disease. DIABETES. 37:1595-1607. 1988.

Rousseeaw, P.J.: Multivariate estimation with high breakdown point. In Mathematical Statistic and Applications, Vol. B. Eds. W. Grossmann, G. Pflug, I. Vincze, and W. Wertz. Dordrecht: Reidel, 283-297. 1985.

Rousseeaw, P.J. and Van Driessen, K.: Small-sample correction factor of the minimum covariance determinant estimator. Technometrics 41:212-223, 2000.

Rull, J., Olaiz, G., Valles, V., Tapia, R., Hernández, M., Alba, A., y cols.: Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Secretaría de Salud, Dirección Nacional de Epidemiología/Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México . 1995.

Solberg, H.E.: Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 1. The concept of Reference Values. Clin. Chem. Acta 45: 237-241, 1987.

Solberg, H.E. & PetitClerc C.: Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 3. Preparation of Individuals and Collection of Specimens for the Production of Reference Values. Clin. Chem. 26: 593-598, 1988

Solberg, H.E.: Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 5. Statistical Treatment of Collected Reference Values Chem. Determination of Reference Limits. Clin. Chim. Acta 170: S13-S32, 1987.

Solberg, H.E. and Stamm, D.: Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 4. Control of Analytical Variation in the Production, Transfer and Application of Reference Values. Clin. Chim. Acta 202: S5-S12, 1991.

Zorrilla, E.: Lípidos séricos en la clínica. Editorial Interamericana-McGrawHill, México, 1989,

Zorrilla, E.: Hipercolesterolemia: Diagnóstico y Tratamiento. Editorial Interamericana-McGrawHill, México, 1991, 185 p.