

Intervalos de referencia biológicos¹

Xavier Fuentes Arderiu
Laboratori Clínic
Hospital Universitario de Bellvitge
L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)
Cataluña, España

Introducción

Para poder interpretar con fines diagnósticos un valor medido de una magnitud biológica de un paciente es imprescindible conocer uno o más valores de esa magnitud medidos en individuos similares y compararlos. Debido a esta necesidad surge el concepto de valor de referencia biológico. [Atención: también existen *valores de referencia metrológicos*, que no tienen nada que ver con los biológicos.]

Un *valor de referencia biológico* es un valor medido de una magnitud particular obtenido con fines comparativos en un individuo —llamado *individuo de referencia*— que cumple unos requisitos preestablecidos. Estos requisitos pueden ser muy diversos, dependiendo de la finalidad de los valores de referencia biológicos; así, se pueden establecer valores de referencia biológicos de individuos sanos o afectados de una enfermedad concreta, lo imprescindible es que la descripción de dichos individuos no sea ambigua. No obstante, los más usados son los correspondientes a individuos presuntamente sanos; tanto es así que habitualmente, si no se indica lo contrario, al hablar de valores de referencia biológicos se supone que se trata de una población de individuos sanos, que si realmente es así se denominan *valores de referencia fisiológicos*.

Los valores de referencia biológicos dependen, obviamente, de la población de referencia. Esta perogrullada debe tenerse siempre en cuenta, ya que es posible que, por ejemplo, los valores de referencia biológicos de cierta magnitud biológica observados en individuos sanos de los países escandinavos, sean diferentes de los observados en individuos sanos de los países mediterráneos. Por otro lado, los valores de referencia biológicos de una magnitud biológica dependen del procedimiento empleado para la medida de la misma: no todos los procedimientos de medida de que se dispone para medir una magnitud están sometidos a la misma variabilidad metrológica, por lo que la mayoría de procedimientos de medida conducen a resultados diferentes entre si.

Por las dos razones dadas en el párrafo anterior, se puede afirmar que, en general, los intervalos de referencia biológicos que aparecen en los libros u otras publicaciones, incluso en los más prestigiosos, no deben utilizarse con fines diagnósticos. Sólo pueden utilizarse con cierta fiabilidad aquellas publicaciones en las que conste, sin ninguna ambigüedad, la descripción de la población de referencia y el procedimiento de medida utilizado, siempre y cuando, tanto la población como el procedimiento de medida coincidan con los que afectan al paciente en estudio.

¹ Este artículo se ha publicado previamente en NOTICONAQUIC 2011;54:46-51

Queda claro, pues, que en el proceso diagnóstico un valor observado en un paciente sólo debería compararse con los límites de referencia biológicos suministrados por el mismo laboratorio que ha efectuado la medición de la magnitud biológica en cuestión. En todo laboratorio clínico se debería incluir en los informes los intervalos de referencia biológicos correspondientes a las magnitudes biológicas medidas en cada paciente.

Los intervalos de referencia pueden estimarse a partir de valores de referencia producidos por el propio laboratorio, de forma individual, o formando parte de un equipo de laboratorio, producción multicéntrica. Si no dispone de intervalos de referencia propios debe adoptar unos de ajenos. Los intervalos ajenos sólo debería adoptarse después de validarlos en el propio laboratorio, pero, desgraciadamente, en la mayor parte de los casos esto no es así.

Producción de valores de referencia biológicos y estimación de los intervalos correspondientes

La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha elaborado recomendaciones para la producción de valores de referencia biológicos poblacionales. (Este texto está basado en esas recomendaciones.)

Siguiendo las recomendaciones de la IFCC, para la obtención de valores de referencia biológicos poblacionales es necesario, por un lado, disponer de un procedimiento de medida de calidad suficiente y de un procedimiento de obtención, traslado y manipulación de especímenes normalizado a tenor de la variabilidad premetrológica de la magnitud en estudio. Por otro lado, deben conocerse los factores de variabilidad biológica que permitirán definir inicialmente los criterios de exclusión y partición. Los criterios de exclusión servirán para que en la muestra de referencia no exista variabilidad iatrogénica ni variabilidad nosológica (patológica), mientras que los criterios de partición permitirán la selección de individuos de referencia que formen grupos homogéneos, es decir, grupos en los que la variabilidad biológica interindividual sea la menor posible.

Definición de la población de referencia y selección de individuos de referencia

Para seleccionar los individuos de referencia es necesario que previamente se haya definido la población de referencia de forma inequívoca. Para ello es preciso especificar el estado de salud y las propiedades biológicas que más suelen influir en los valores de las magnitudes biológicas, como el sexo, la edad o la raza, que podrán dar lugar o no a la división de la población de referencia, como se verá en el apartado siguiente. También deben especificarse claramente cuales son los criterios que se seguirán para excluir a un posible individuo de referencia; los *criterios de exclusión* más frecuentes —aunque, lógicamente, no son los mismos para todas las magnitudes biológicas— son: enfermedades antiguas o recientes, embarazo, lactancia, ingesta de alcohol, tabaquismo, ingesta de medicamentos, ingesta de drogas, intoxicación laboral subclínica, hipertensión, dietas especiales, obesidad, ingesta reciente de alimentos, ejercicio intenso reciente.

Criterios de partición

El conocimiento de la variabilidad biológica permite establecer los criterios iniciales de partición (o estratificación) en grupos biológicamente homogéneos. Los factores que deben tenerse más en cuenta para el establecimiento de particiones son: ayuno, dieta, edad, ejercicio, fase del ciclo menstrual, grupo sanguíneo, hora de la obtención del espécimen, localización geográfica, origen étnico, postura durante la extracción sanguínea, ritmo circadiano, sexo, tabaquismo, tiempo de embarazo. Pero en la práctica,

para cada magnitud biológica, sólo hay que tener en cuenta aquellos factores de variación de los que se sabe por la bibliografía que son lo suficientemente importantes como para dar lugar a particiones (o estratificaciones).

Para decidir si vale la pena establecer una partición, E. K. Harris y J.C. Boyd describieron un método estadístico que ayuda a tomar esta decisión. Este método se aplica a dos grupos de valores de referencia biológicos con el mismo número de datos (60 o más cada uno) para decidir si deben mantenerse separados o pueden mezclarse. El método tiene en cuenta dos criterios, el segundo de los cuales se aplica según el resultado de aplicar el primero:

Primer criterio.— Si el cociente entre las desviaciones típicas de cada grupo, usando la mayor de ellas como numerador, es superior a 1,5 es aconsejable mantener separados los dos grupos.

Segundo criterio.— En el caso de que el cociente anterior sea igual o inferior a 1,5, calcular los estadísticos

$$z = (\bar{x}_2 - \bar{x}_1)n^{0,5} / (s^2_2 + s^2_1)^{0,5} \text{ y } z^* = 3(n/120)^{0,5}$$

donde z y z^* son los estadísticos que deben calcularse para la prueba, \bar{x}_1 y \bar{x}_2 las medias de los dos grupos, s^2_1 y s^2_2 las variancias de los dos grupos y n en número de datos de ambos grupos. La decisión es que si $z > z^*$, es aconsejable mantener separados los dos grupos

Establecimiento del tamaño de la muestra de referencia.

Como se verá más adelante, para la estimación de los límites de referencia biológicos se usan distintos métodos estadísticos dependiendo de que la distribución de los valores de referencia biológicos, o de alguna transformación matemática de los mismos, siga la ley de Laplace-Gauss (método paramétrico) o no la siga (método no paramétrico). Cuando se utiliza el método paramétrico, el número de individuos de referencia seleccionados para cada grupo homogéneo —para cada partición, si la hay— debe ser de 30 como mínimo, pero si se utiliza el método no paramétrico, 120 es el número mínimo. Por lo tanto, es razonable seleccionar inicialmente 30 como mínimo y estudiar si los datos siguen la ley de Laplace-Gauss (como se indica más adelante). Si los datos siguen esa ley, 30 valores (no aberrantes) ya es suficiente; si no hay que obtener un mínimo de 120 valores (no aberrantes). En cualquier caso, cuanto mayor sea el número valores de referencia biológicos obtenidos, mejor será la estimación del intervalo de referencia.

También hay que tener en cuenta que si se debe aplicar el método de Harris y Boyd para decidir si hay que hacer alguna partición, entonces el mínimo de 30 pasa a ser un mínimo de 60 valores (no aberrantes) por cada posible partición.

Eliminación de los valores aberrantes

Una vez obtenidos los valores de referencia biológicos, hay que eliminar, si los hay, los valores aberrantes. Un *valor aberrante* en un conjunto de valores de referencia biológicos es un valor extremadamente alto o bajo que se sitúa fuera de un intervalo de tolerancia definido con todos los valores del conjunto.

Una vez obtenidos los valores de los individuos de la muestra de referencia, se debe verificar que entre los resultados obtenidos no haya ningún valor aberrante. Para la detección de valores aberrantes se han descrito diversos métodos estadísticos; uno de los más simples y efectivos es una modificación del método de Dixon:

En una serie de resultados ordenados de menor a mayor se considera que

x_n es aberrante si $x_n - x_{n-1} > (x_n - x_1)/3$ y x_1 es aberrante si $x_2 - x_1 = (x_n - x_1)/3$.

Distribución de frecuencias de los valores de referencia biológicos

Los valores de referencia biológicos no se distribuyen necesariamente siguiendo la ley de Laplace-Gauss; los de algunas magnitudes si lo hacen, los de otras se distribuyen de forma logaritmo-gaussiana, mientras que los de la mayoría de magnitudes biológicas siguen otros tipos de distribución de frecuencias. Considerar que los valores de referencia biológicos (incluidos los de individuos sanos) se distribuyen siempre siguiendo la ley de Laplace-Gauss es un grave error que conduce, en numerosas ocasiones, a la obtención de límites de referencia biológicos equivocados. No obstante, puede suceder que los valores de referencia biológicos obedezcan la ley de Laplace-Gauss después de transformarlos matemáticamente. Las transformaciones matemáticas aconsejables son:

— si en el histograma de frecuencias se observa una mayor dispersión por la derecha, estudiar las transformaciones $y = \log(x+c)$ e $y = \sqrt{x+c}$;

— si en el histograma de frecuencias se observa una mayor dispersión por la izquierda, estudiar las transformaciones $y = 10^{(x+c)}$ e $y = (x+c)^2$.

Se ha descrito varias pruebas estadísticas para verificar si un conjunto de valores de referencia biológicos se distribuye siguiendo la ley de Laplace-Gauss. En los documentos de la IFCC se considera que de estas pruebas una de las más adecuadas es la de Anderson-Darling, aunque posteriormente diversos autores argumentan a favor de la prueba de Shapiro-Wilk.

Estimación de los límites de referencia biológicos

Como se ha indicado anteriormente, los límites de referencia biológicos poblacionales son los valores extremos del intervalo de referencia que comprende habitual y convencionalmente el 95% central de todos los valores de referencia biológicos; es decir los límites de referencia biológicos poblacionales son los fractiles 0,025 y 0,975 de los valores de referencia biológicos. Estos fractiles se estiman de formas distintas dependiendo de si la distribución de los valores de referencia biológicos, o una transformación matemática de los mismos, sigue o no la ley de Laplace-Gauss: si sigue la ley se aplica un método paramétrico; si no la sigue se aplica un el método no paramétrico.

Estimación paramétrica

La estimación paramétrica de los fractiles 0,025 y 0,975 se basa en la propiedad que tiene las distribuciones de Laplace-Gauss de que el intervalo definido por $\bar{x} \pm 1,96 s$ contiene el 95% central de los valores y que, por lo tanto, $\bar{x} - 1,96 s$ y $\bar{x} + 1,96 s$ coinciden con los fractiles citados. Así, cuando la distribución de los valores de referencia biológicos, o los de una transformada matemática de los mismos, sigue la ley de Laplace-Gauss, la estimación de los límites de referencia biológicos queda reducida esencialmente al cálculo de la \bar{x} y la s de los valores de referencia biológicos, después de eliminar los valores aberrantes si los hubiera. Es preciso resaltar que si este método se aplica a valores de referencia biológicos transformados matemáticamente (logaritmos, raíces, etc.), una vez obtenidos los límites de referencia biológicos de los valores transformados, no antes, deben ser reconvertidos (antilogaritmos, cuadrados, etc.).

Estimación no paramétrica

Si los valores de referencia biológicos, o sus transformadas matemáticas, no siguen la ley de Laplace-Gauss, se debe recurrir a la estimación no paramétrica de los fractiles 0,025 y 0,975, utilizando para ello un mínimo de 120 datos. Esta estimación se realiza ordenando los valores de referencia biológicos y tomando el valor con número de orden igual a $0,025(n+1)$, correspondiente al fractil 0,025, y el valor con número de orden igual a $0,975(n+1)$, correspondiente al fractil 0,975.

Producción multicéntrica de valores de referencia biológicos

La producción de valores de referencia biológicos para cada magnitud por parte de cada laboratorio clínico es difícil y cara. Incluso, si se hiciera, en algunos casos podría ser un despilfarro inútil, como sucedería si dos laboratorios que atienden a una misma población y utilizan procedimientos de medida intercambiables produjeran cada uno de ellos, por separado, sus propios valores de referencia biológicos.

La alternativa compatible con las recomendaciones internacionales es la producción multicéntrica de valores de referencia biológicos. Para ello diversos laboratorios de una misma región geográfica y con procedimientos de medida intercambiables o de calidad metrológica muy parecida, se reparten la consecución de individuos de referencia y la producción de los valores de referencia biológicos correspondientes, con el consiguiente ahorro de esfuerzos y dinero. De entre los laboratorios participantes se selecciona uno como referencia. Para verificar si se pueden mezclar, los diversos conjuntos de valores obtenidos se comparan con el conjunto obtenido por el laboratorio de referencia, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Se hace también una comparación estadística con los resultados de control obtenidos por cada laboratorio usando un mismo lote de material de control.

Una vez se ha demostrado que la calidad metrológica es la misma y que se pueden mezclar los valores de referencia biológicos producidos en los diversos laboratorios (es posible que para una magnitud en particular se deba excluir algún laboratorio), el conjunto de valores de referencia biológicos se trata como si perteneciera a un solo laboratorio y se estiman los límites de referencia biológicos según se ha descrito en el apartado 2.5 de este texto.

Adopción de intervalos de referencia biológicos

Los intervalos de referencia biológicos estimados por un laboratorio para una magnitud biológica dependen de las características socio-biológicas de la población de referencia y de las características metrológicas del procedimiento de medida utilizado. Pero, a pesar de las recomendaciones de las instituciones científicas sobre la producción de valores de referencia biológicos, la realidad enseña que son pocos los laboratorios clínicos que producen sus propios valores de referencia biológicos para cada magnitud. Esto se debe, principalmente, a que es difícil conseguir voluntarios que sirvan como individuos de referencia y al elevado coste económico derivado de las mediciones destinadas a la producción de valores de referencia biológicos. En tales casos, los laboratorios suelen adoptar límites de referencia biológicos obtenidos por otros laboratorios, aunque esta adopción sólo debería realizarse tras la validación de esos límites.

Por otro lado, en el laboratorio clínico es frecuente tener que comparar dos procedimientos de medida de una misma magnitud para saber si los resultados generados por ambos procedimientos son intercambiables, hecho que implicaría que límites de referencia biológicos estimados con uno de ellos sirviesen para el otro, es decir fuesen transferibles. Esta situación se da, por ejemplo, al cambiar un analizador o cuando

una misma magnitud se mide con procedimientos distintos en el "laboratorio programado" y en el "laboratorio de urgencias".

La *transferibilidad* es la propiedad por la que unos límites de referencia biológicos se pueden considerar como propios de un procedimiento de medida y de una población particulares, cuando en realidad se han obtenido con otro procedimiento de medida, ya sea en el mismo laboratorio o en un laboratorio distinto, utilizando la misma o distinta población de referencia.

Para validar unos límites de referencia adoptados se debe demostrar su transferibilidad y para ello deben distinguirse los dos casos generales que se exponen a continuación:

Los valores de referencia biológicos a adoptar han sido producidos por otro laboratorio

El proceso para decidir sobre la validación o rechazo de un intervalo de referencia adoptado se realiza como se indica a continuación: se seleccionan 20 individuos de referencia y se realizan las mediciones de que convengan (si el laboratorio clínico tiene resultados de trabajadores en activo sometidos a una revisión de medicina preventiva, pueden aprovecharse para este fin):

Si 2 o menos resultados están fuera del intervalo de referencia biológico candidato, este intervalo puede adoptarse.

Si 2 o más resultados están fuera del intervalo de referencia biológico candidato, deben medirse otras deben obtenerse 20 nuevos valores en otros 20 individuos de referencia diferentes a los primeros.

Si de estos nuevos 20 resultados, 2 o menos resultados están fuera del intervalo de referencia biológico candidato, este intervalo puede adoptarse; en caso contrario, intervalo de referencia biológico candidato debe rechazarse.

Hay que destacar que este proceso de validación tiene un grave inconveniente, ya que identifica con bastante seguridad (error $\alpha \approx 95\%$) cuando un intervalo no debe adoptarse, pero da garantías cuando se decide la adopción (error β desconocido). Por ejemplo, si la imprecisión interdiaria o el sesgo del procedimiento de medida del laboratorio adoptante son mayores que los del procedimiento de medida con que fueron producidos los valores de referencia biológicos, el intervalo de referencia biológico candidato no debe adoptarse pero el proceso de validación lo dará (erróneamente) por válido.

Existen valores de referencia biológicos producidos por el propio laboratorio pero con distinto procedimiento de medida

En este caso se recurre al estudio de la intercambiabilidad de resultados, comparando el sesgo y la variancia experimental de los dos procedimientos de medida mediante la regresión lineal no paramétrica de Passing-Bablok.

No obstante, el criterio estadístico usado para decidir si las diferencias observadas entre los dos procedimientos son significativas puede ser demasiado estricto teniendo en cuenta el uso clínico de los resultados, ya que cualquier diferencia que exista realmente, por pequeña que sea, podrá ponerse de manifiesto si el tamaño de la muestra es lo suficientemente grande. Por esta razón, cuando se observen diferencias significativas al aplicar la regresión, puede tenerse en cuenta un criterio adicional basado en el error de medida máximo tolerado:

- Sean X e Y los procedimientos de medida comparados, $y = a + bx$ la ecuación de la recta de regresión, s_x y s_y las desviaciones típicas interseriales de los

procedimientos, x_i el resultado observado en el i -ésimo espécimen, \hat{y}_i el valor del i -ésimo espécimen obtenido al aplicar a x_i la ecuación de la recta de regresión.

- El sesgo del procedimiento Y respecto al procedimiento X introducido por el uso de la ecuación de la recta de regresión es $|\hat{y}_i - x_i|$, mientras que el error aleatorio propio del procedimiento Y es $2s_Y$, con lo que el error total es $2s_Y + |\hat{y}_i - x_i|$.
- Cuando se busca la intercambiabilidad de resultados, lo principal es que el sesgo del procedimiento en estudio sea el mismo que el del procedimiento en uso. por lo tanto, el error de medida máximo tolerado puede considerarse igual a $2s_X$.
- El criterio para aceptar la intercambiabilidad de los resultados, es:

$$2s_Y + |\hat{y}_i - x_i| \leq 2s_X$$

No debe olvidarse que para que la intercambiabilidad exista realmente, los procedimientos de medida deberían estar sujetos a las mismas interferencias, inespecificidades y contaminaciones.

Fiabilidad de los valores de referencia biológicos procedentes de la bibliografía

Pese a las recomendaciones internacionales, no siempre es posible la obtención de valores de referencia biológicos propios, debido al elevado coste económico y a la dificultad de conseguir una muestra de referencia. Por esta razón, en la mayoría de los casos se recurre a la adopción de intervalos de referencia biológicos bibliográficos sin demostrar su transferibilidad.

Si el sesgo que puede afectar los resultados de los pacientes es diferente del sesgo que afectó a los valores de referencia biológicos adoptados, se producirá una interpretación de los resultados incorrecta (falsos positivos o falsos negativos, según el caso). Basado en ésto, una manera indirecta de conocer el peligro de interpretar erróneamente los resultados de los pacientes al compararlos con unos límites de referencia biológicos tomados de la bibliografía es saber si los diversos procedimientos de medida usados para medir de la magnitud en cuestión generan errores sistemáticos muy diferentes entre si. Para cada magnitud, esta información la da el coeficiente de variación *interlaboratorial* observado en un programa de control de la calidad interlaboratorial, ya que este coeficiente de variación refleja la dispersión de los errores sistemáticos de todos los laboratorios.

Para una magnitud determinada, cuanto mayor es el coeficiente de variación interlaboratorial, mayor es la probabilidad que el intervalo de referencia no sea el apropiado; contrariamente, cuanto menor es el coeficiente de variación interlaboratorial (observado en los programas de control de la calidad interlaboratorial), no resulta tan peligrosa la adopción de un intervalo de referencia bibliográfico. A partir de los coeficientes de variación interlaboratoriales ($CV_{interlab.}$), las magnitudes se pueden clasificar arbitrariamente en tres categorías:

$CV_{interlab.}$ (%)	Categoría de los intervalos de referencia biológicos
<3	Fiabiles
3-10	Moderadamente fiabiles
>10	Poco fiabiles

Esta clasificación puede ayudar a los laboratorios (I) a conocer el peligro que supone la adopción de un intervalo de referencia de la bibliografía, y (II) a establecer prioridades a la hora de decidir para cuales magnitudes convendría obtener intervalos de referencia biológicos propios o usar unos adoptados pero validados.

Seguimiento de los intervalos de referencia

Todo laboratorio clínico debería asumir (y declarar a los auditores y clientes que lo soliciten) unos requisitos metrológicos, esto es, unos requisitos para la imprecisión interdiaria y unos requisitos para el sesgo (error sistemático estimado). Si en el país los hay obligatorios, como sucede en Estados Unidos de América y en Alemania, se han de asumir, claro está. Pero, ¡atención!: para cada magnitud biológica el cumplimiento de los requisitos metrológicos ha de ser compatible con la idoneidad de los intervalos de referencia biológicos usados. Esto quiere decir que si la calidad metrológica actual no es la que afectó la producción de valores de referencia biológicos, aunque se cumplan los requisitos metrológicos, se han de modificar los intervalos de referencia biológicos o se ha de modificar la calidad metrológica.

La imprecisión interdiaria y el sesgo determinan el intervalo de referencia para una población de referencia particular: la imprecisión interdiaria es directamente proporcional a la amplitud del intervalo de referencia y el sesgo causa un aumento o una disminución de los valores de referencia biológicos según sea de signo positivo o negativo, respectivamente. Por esto, un laboratorio clínico que ha producido un intervalo de referencia siempre debería trabajar con la misma calidad metrológica que afectó la producción de los valores de referencia biológicos. Si la imprecisión interdiaria o el sesgo se modifican, ya sea mejorando o empeorando, se afectará la interpretación de resultados respecto al intervalo de referencia.

En la vida cotidiana del laboratorio clínico se puede observar que las fluctuaciones de las medias de los resultados de un mismo lote de material de control no son siempre aleatorias, probablemente debido a los cambios de lote de los calibradores. Estas fluctuaciones, en algunos casos podrían invalidar los intervalos de referencia biológicos vigente.

Así, en el proceso diagnóstico, considerando una magnitud biológica cuyos valores aumenten debido a cierta enfermedad, resulta que:

- Si la imprecisión interdiaria actual o el sesgo son mayores que los que afectaron la producción de los valores de referencia biológicos, el número de resultados falsos positivos será mayor del previsto, con lo que disminuirá la especificidad diagnóstica de la magnitud biológica.
- Si la imprecisión interdiaria actual o el sesgo son menores que los que afectaron la producción de los valores de referencia biológicos, el número de resultados falsos negativos será mayor del previsto, con lo que disminuirá la sensibilidad diagnóstica de la magnitud biológica.

Por lo que respecta al proceso de seguimiento de una enfermedad, aunque no se tengan en cuenta los intervalos de referencia biológicos, es obvio que las variaciones de la imprecisión interdiaria o del sesgo conducirán a interpretaciones falsas de los cambios en los resultados de los pacientes.

Teniendo en cuenta la influencia de los cambios de imprecisión interdiaria y de sesgo en la interpretación de los resultados, es conveniente establecer unos requisitos para los cambios máximos tolerados de estas características metrológicas. Así, para cada procedimiento de medida, y como mínimo para un valor fisiológico, el laboratorio clínico,

además de los requisitos para la imprecisión interdiaria y para el sesgo, debería establecer, los requisitos siguientes:

- cambio de imprecisión interdiaria máxima tolerada (respecto a la que afectó a los valores de referencia biológicos),
- cambio de sesgo máximo tolerado (respecto al que afectó a los valores de referencia biológicos).

En general, el establecimiento de estos requisitos es difícil, porque en la mayoría de casos no se conoce la imprecisión interdiaria ni el sesgo que afectaron la producción de los valores de referencia biológicos.

Paradoja de Rao y valores de referencia biológicos multivariados

Los límites de referencia biológicos convencionales sólo consideran, por definición, el 95% central de los individuos de una población. Esto significa que, al medir una magnitud biológica en un individuo sano, existe una probabilidad igual a 0,05 de que se obtenga un resultado fuera del intervalo de referencia biológico. por razones probabilísticas, si en un mismo individuo sano en lugar de medir una magnitud se miden n magnitudes independientes (no correlacionadas) entre sí, la probabilidad de observar al menos un resultado fuera del intervalo de referencia biológico correspondiente es $1-0,95^n$; este fenómeno, de forma generalizada, se conoce como la *paradoja de Rao*. Así, cuando a un paciente se le miden simultáneamente diez magnitudes biológicas independientes entre sí, cosa que sucede a menudo, hay una probabilidad de 0,40 (¡40%!), aproximadamente, de que al menos un resultado parezca "patológico" cuando en realidad no lo es. Aunque debe destacarse que cuando las magnitudes están claramente correlacionadas, como es el caso de las concentraciones de ion sodio y cloruro o calcio(II) y albúmina en el plasma, estas probabilidades son mucho menores.

Una de las maneras de evitar la paradoja del 95% es el uso de *valores de referencia biológicos multivariados*, obtenidos al considerar simultáneamente n magnitudes biológicas. Estos valores de referencia biológicos se obtienen mediante la transformación del conjunto de valores de las n magnitudes en un vector perteneciente a un espacio de n dimensiones.

No obstante, el uso de valores de referencia biológicos multivariados es muy poco habitual, ya que tiene el inconveniente que cada posible combinación de n magnitudes requiere un intervalo de referencia biológico multivariado particular, con lo cual el número de intervalos que se necesitan es enorme.

Bibliografía

Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; proposed guideline—Third Edition CLSI document C28-P3. Wayne: CLSI; 2008.

Cruz-Carlos L, Mogne-Azemar N, Fuentes-Arderiu X. Report of the II European symposium on clinical laboratory and in vitro diagnostics industry: "Physiological reference values: a shared business?" Clin Chim Acta 2003;338:165-9.

Fuentes Arderiu X. Analytical goals for transferability. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 1991;29:529-30.

Fuentes-Arderiu X, Ferré-Masferrer M, Álvarez-Funes V. Harris & Boyd's test for partitioning the reference values. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997;35:733.

Fuentes-Arderiu X, Ferré-Masferrer M. On the reliability of published reference limits. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:143.

Fuentes-Arderiu X, Mas-Serra M, Alumá-Trullás A, Martí-Marcet MI, Dot-Bach D. Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:778-82.

Fuentes-Arderiu X. Biological reference intervals and ISO 15189. *Clin Chim Acta* 2006;364:365-6.

Harris EK, Boyd JC. *Statistical bases of reference values in laboratory medicine*. New York: Dekker, 1995.

Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta* 2006;366:112–29.

Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X, et al. Need for revisiting the concept of reference values. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:589-95.

Horn PS, Pesce AJ. *Reference intervals. A user's guide*. Washington: AACCC Press; 2005.

International Federation of Clinical Chemistry, International Committee for Standardization in Hæematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:337-342.

International Federation of Clinical Chemistry, International Committee for Standardization in Hæematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individual los for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-644.

International Federation of Clinical Chemistry, International Committee for Standardization in Hæematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Stistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-656.

International Federation of Clinical Chemistry, International Committee for Standardization in Hæematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:657-662.

International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individual los and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:593-598.

International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:531-535.

Padró-Miquel A, Fuentes-Arderiu X. Lack of randomness of internal quality control data: an alert for the *in vitro* diagnostic industry. *Scand J Clin Lab Med* 2007; 67:253-5.