



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química**

**Valores de Referencia de Calcio y Fósforo en  
Pacientes de Ingreso en el Instituto Nacional  
de Nutrición.**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**

**Ma. de la Luz Rocío Salas Montiel**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

Paginas

1.- Introducción. Teoria de valores de referencia	1
I. Nomenclatura	1
II. La producción de valores de referencia	3
III. Uso y presentación de los valores de referencia	4
IV. Selección de individuos sanos para la producción de valores de referencia	5
V. Recolección de la muestra biológica	9
VI Control de calidad de la medición	10
VII. Determinación de los límites de referencia	10
2.- Objetivos	13
3.- Material y metodos	14
4.- Resultados	18
5.- Discusión	23
6.- Conclusiones	31
7.- Bibliografía	33

## INTRODUCCION.

### = TEORIA DE VALORES DE REFERENCIA =

Por tradición los valores de referencia ( antiguamente llamados valores normales ) se obtienen al analizar un lote de muestras biológicas de un grupo de individuos aparentemente sanos. Este enfoque posee una falla; hay dudas de qué se debe llamar "salud" puesto que su función aún no está completa y unívocamente establecida ( ver -- más adelante ).

Los componentes químicos del organismo humano están sujetos a cambios por diversas causas: por efectos de procesos fisiológicos y por diferencias de genes, de "estatus" económico, de medio ambiente, de situación geográfica, etc. De allí surge la necesidad de que cada laboratorio obtenga sus propios valores de referencia, necesidad que se puede ver aumentada cuando se maneja un nuevo método o cuando el laboratorio quiere comparar sus valores de referencia con los de otro. Desafortunadamente, en países de poco desarrollo hay tendencia a usar límites de referencia establecidos en otros países, - en poblaciones diferentes y a veces, con metodología diferentes.

En las siguientes páginas analizaremos aspectos diversos en relación al establecimiento de valores de referencias, basándonos en una serie de 6 documentos que están siendo elaborados por la IFCC. ( International Federation of Clinical Chemistry ) ( 1-6 ). Hasta mayo de 1982, sólo uno de los 6 trabajos ha sido publicado ( 1 ), - y sólo contamos con 2 de las 5 versiones en elaboración ( 2,5 ).

### 1. NOMENCLATURA.

La nomenclatura usada actualmente para referirse a los valores de referencia es frecuentemente ambigua. Por ello es necesario pugnar para que los términos sean universales, claros, concisos y --- bien definidos.

La IFCC ( 1 ) recomienda los siguientes términos en el área de la teoría de valores de referencia:

1. Individuo de referencia. Es un individuo seleccionado usando un criterio bien definido.
2. Población de referencia. Puede estar formada de todos los posibles individuos de referencia. Generalmente tiene un número desconocido de miembros, y por lo tanto es una entidad hipotética.

Nota. Una población de referencia puede estar formada de un sólo miembro, por ejemplo, un sólo individuo puede servir de referencia a él mismo o a otro individuo.

3. Muestra de referencia. Es un grupo de individuos de referencia, en número adecuado y seleccionado para representar a la población de referencia.

4. Valor de referencia. Es el valor obtenido por observación o medición en un individuo de referencia.

Nota. Los valores de referencia deben ser obtenidos de una muestra de referencia.

5. Distribución de referencia. Es la distribución de los valores de referencia.

Nota. Cualquier hipótesis referente a una distribución de referencia puede ser evaluada usando la distribución de referencia de una muestra de referencia y un método estadístico adecuado.

6. Límite de referencia. Es un valor derivado de una distribución de referencia. Se usa con fines descriptivos de los valores de referencia.

Nota 1. Es una práctica común obtener un límite de referencia tal que haya una probabilidad conocida de que un valor de referencia pueda ser menor o igual al límite de referencia escogido.

Nota 2. El límite de referencia es descriptivo de los valores de referencia; y puede ser diferenciado de otros límites usados con fines interpretativos.

7. Intervalo de referencia. Es el intervalo comprendido entre los límites de referencia ( incluidos éstos ).

8. Valor observado. Es un valor de tipo cuantitativo, obtenido por observación o medición, que va a ser comparado ya sea con valores de referencia, distribuciones de referencia, límites de referencia o intervalos de referencia.

## II. LA PRODUCCION DE VALORES DE REFERENCIA.

Los valores de referencia de un individuo o de un grupo de individuos tiene valor sólo cuando el individuo o individuos, así como los métodos de producción de los valores de referencia, son descritos adecuadamente ( 2 ). En tal descripción es importante incluir los siguientes aspectos:

- A) Las características de la población de referencia con respecto a edad, sexo, factores genéticos, socioeconómicos, etc.
- B) Los criterios usados para incluir o excluir individuos de la muestra de referencia.
- C) Las condiciones fisiológicas y el medio ambiente bajo los cuales la muestra de referencia es estudiada, v.gr.:
  - 1) Fecha y hora de la colección de la muestra.
  - 2) Ingesta de alimentos y drogas ( incluyendo alcohol ).
  - 3) Postura ( incluyendo el tiempo que estuvo en tal postura ).
  - 4) Si fumó en las últimas semanas.

---

\* El original en inglés de la nota 2 se nos antoja críptica, y dice textualmente: "The reference limit is descriptive of the reference values and may distinguished from various types of decision limits used for interpretative purposes" ( 1 ).

- 5) Grado de obesidad.
- 6) Embarazo o día del ciclo menstrual.
- 7) Si tiene alguna enfermedad conocida.

D) El modo de colección de la muestra, incluyendo su preparación y - manejo.

E) El método analítico usado, incluyendo detalladamente datos de su precisión y exactitud. Debe dársele énfasis especial a la existencia de variaciones muy grandes del método, y si la población fue estudiada durante un período muy largo.

F) La definición de salud de la población de referencia o de los individuos de referencia investigada. Esto es problemático pues ninguna definición es completamente satisfactoria, incluyendo la de la OMS ( Organización Mundial de la Salud ): " Un estado de bienestar físico, mental y social; y no meramente la ausencia de enfermedad".

El estado de salud es conceptualmente diferente en un mismo individuo a diferentes edades, en un mismo individuo en diferentes países, o en el mismo país en diferentes épocas. O sea, el estado de salud es relativo, y no un estado absoluto. Todo ello complica el establecimiento de un criterio que nos permita declarar que una persona es completamente sana, sobre todo si tiene una edad avanzada ( se dificulta más establecer si el individuo está enfermo, o simplemente tiene un achaque propio de su edad ) . Por ello es recomendable seguir otros criterios de salud para la obtención de valores de referencia en ancianos.

### III. USO Y PRESENTACION DE LOS VALORES DE REFERENCIA.

El análisis de los valores de referencia puede requerir una descripción y un análisis. Debe de recordarse que la estadística es sólo una herramienta, y debe tomarse sólo como ayuda para resolver el problema. La mayoría de los datos biológicos no están simétricamente distribuidos, por lo cual se requiere frecuentemente de los métodos estadísticos libres de distribución ( ver adelante ).

Un aspecto, frecuentemente olvidado, es que la estrategia que se use para obtener los valores de referencia depende de cual sea el objetivo que perseguimos. Los requerimientos de nuestros valores de referencia dependerán del tipo de estudio que estemos realizando, v.gr.:

- Detección de una enfermedad
- Diagnóstico diferencial
- Control de respuesta a la terapia
- Estudio de cambios fisiológicos
- Estudio de los efectos e influencias del medio ambiente.

Un aspecto final del uso y presentación de los límites de referencia es que una cosa es la significancia estadística, y otra es la significancia clínica. La significancia estadística es sólo descriptiva, pero su importancia interpretativa debe basarse en consideraciones fisiológicas y clínicas, y no en el valor de las p.

#### IV. SELECCION DE INDIVIDUOS SANOS PARA LA PRODUCCION DE VALORES DE REFERENCIA.

Los factores que contribuyen a la variabilidad de una distribución de referencia son numerosos, y se dividen en dos grupos:

- A. Los que llevan a la exclusión de individuos de la población de referencia.
- B. Los que llevan a una partición de la población de referencia.

##### A. Criterios de Exclusión.

Dependiendo del propósito que se dé al uso de los valores de referencia, algunos o varios de los criterios siguientes pueden ser aplicados para excluir:

##### 1. Sujetos con enfermedades patológicas.

Los sujetos que padecen alguna enfermedad deben ser excluidos, v.gr., el Scandinavian Committee of Reference Values preconiza la exclusión de la gente enferma para la obtención de valores de referencia.



## **2. Sujetos que toman drogas farmacéuticas activas.**

Estas drogas pueden estar presentes por el tratamiento de una enfermedad o por terapia de reemplazo hormonal. También se debe incluir entre las drogas al alcohol, el tabaquismo y el abuso de drogas energéticas. El alcohol ingerido puede afectar los metabolitos del suero, - por lo cual es preferible hacer exclusión de los tomadores. Si se incluyen, se debe especificar la frecuencia y el volumen de su consumo - de alcohol.

## **3. Sujetos en estado fisiológico especial.**

- a) Mujeres embarazadas.
- b) Personas inmediatamente después de hacer ejercicio.
- c) Gente bajo estrés.

También se incluyen en esta categoría a gente que no ayunó ( esta - contribución a la variación es muy difícil de evaluar ya que depende - de la naturaleza del alimento y del lapso transcurrido entre la comida y la toma de muestra ).

## **4. Sujetos con factores de riesgo.**

Se recomienda excluir a personas con obesidad, hipertensión o con resultados anormales de laboratorio o gabinete, ya que pueden estar indicando propensión a enfermar o enfermedad.

## **B. Criterios de Partición.**

La necesidad de partición en grupos de referencia puede ser necesaria en ciertos metabolitos o bien dependiendo del uso que se va a dar a los valores de referencia. Pero si el análisis de partición no muestra diferencias significativas, ni en la localización central, ni en la distribución de valores, puede hacerse un sólo conjunto.

Los criterios de partición son numerosos, y aquí sólo se indican los principales:

### 1. Edad y Sexo.

La edad no necesariamente debe ser categorizada en intervalos iguales. Se pueden escoger intervalos pequeños, v.gr., 2 a 5 años y aún subdividir estos intervalos en subclases como prepubertad 1, - premenopausia 1, pubertad 1 y menopausia 1, etc. Talla y peso pueden ser criterios para categorizar niños.

### 2. Criterios genéticos.

Se pueden usar una subclasificación de acuerdo al origen étnico, hábitos, morfotipo, pigmentación de piel, etc. Otros marcadores pueden ser los grupos sanguíneos, los antígenos de histocompatibilidad, los fenotipos de proteínas plasmáticas ( haptoglobinas, transferrinas, inmunoglobinas ) y las enzimas celulares ( glucosa 6- fosfato deshidrogenasa, fosfatasa ácida ).

### 3. Factores socioeconómicos y del medio ambiente.

La adaptación del individuo a su "status" socioeconómico y a su medio ambiente pueden originar diferencias. Ejemplo: se ha observado que el colesterol aumenta en los japoneses que emigran a los Estados Unidos.

Los criterios de selección son consecuentemente múltiples y variados. Es relativamente fácil excluir individuos enfermos o individuos bajo tratamiento, pero es más difícil escoger criterios pertinentes para la clasificación de la población en subgrupos homogéneos. La clasificación será por lo tanto diferente, dependiendo de los objetivos que se persiguen.

## C. Criterios Frácticos.

### 1. Selección de individuos de referencia.

La selección de individuos de referencia debe ser lo más rigurosa posible de modo que estén presentes todos los posibles elementos de la población que se pretende estudiar, v.gr.; que haya en la muestra los mismos proporciones de individuos de áreas rurales, áreas urbanas, clases socioeconómicas, grupos étnicos, etc., que en la población a estudiar. Se necesita una población grande ( v.gr.: población general o gente invitada a centros de salud ) para participar en un programa que permite coleccionar un número significativo de datos que permitan una evaluación de diversos criterios de selección y/o una partición de la población por características que pudieran causar variación biológica.

### 2. Selección de una muestra al azar.

En el mejor de los casos, los individuos deben ser seleccionados al azar, de la población que se pretende estudiar. Ver para ello las estrategias usadas por Munan ( 7-8 ), Gardner y Scott ( 9,10 ) y Bertel Jerg ( 11 ). Por otra parte, se puede restringir la selección al azar una parte de la población, limitada a sujetos del área urbana, cuando se pretende medir un fenómeno urbano.

La muestra idealmente debe ser grande para permitir la exclusión y partición de individuos. La exclusión inicial se puede hacer por medio de un cuestionario.

### 3. Selección de muestras que no son al Azar.

Las personas que son invitadas a centros de salud o que participan en programas de salud, pueden ser seleccionadas como individuos de referencia. Es importante mencionar que tal muestra está frecuentemente sesgada ya que representa solamente a ciertos elementos de la población general, y no a toda la población general. Por ello debe hacerse una descripción cuidadosa de las características de la población de la muestra.

La mayoría de los laboratorios en la práctica no pueden hacer una selección de muestra grande ( al azar o no ), ya que habitualmente sólo cuentan con un número reducido de datos. Por otra parte, los laboratorios en tal situación pueden hacer su análisis basándose en criterios de exclusión y partición obtenidos en estudios de gran volumen hechos en otros laboratorios.

#### V. RECOLECCION DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Las gentes de laboratorio han aprendido que cualquier esfuerzo para obtener exactitud y precisión es inútil si no se logra una obtención adecuada de la muestra biológica que se va a analizar.

La obtención de la muestra debe ser estandarizada, ésto es, -  
conducida siempre de la misma manera de modo que se minimice el -  
efecto de variables que pueden afectar las características de la -  
muestra ( v.gr.: postura, ayuno y reposo previo del paciente, técnica de toma, anticoagulantes y aditivos usados, contactos con medio ambiente, tipo de recipiente, manipulación al momento de tomarla y posteriormente al analizarla, condiciones de temperatura, tiempo de arribo al laboratorio y tiempo antes del procesamiento, etc. )

Se debe tratar de obtener información del sujeto en el momento de tomar la muestra. La información puede ser obtenida a base de un cuestionario a ser llenado por el individuo de referencia mismo o por el personal del laboratorio. Hay publicaciones que proponen formatos de cuestionarios con tales fines ( E Panek & Petit-Clerc, 13 ), ( Alström T, Gräbeck R & Skandsen, 12 ).

La información debe ser lo más completa posible en relación a antecedentes familiares y personales, hábitos nutricionales, ingesta de drogas y medicamentos, y existencia de síntomas.

## VI. CONTROL DE CALIDAD DE LA MEDICION.

Como mínimo el laboratorio debe tener establecido un programa - interno de control de calidad ( con muestras control de concentra-- ciones conocidas y desconocidas ), e incorporando, tan pronto como sea posible, un promedio de enfermos que garantice la precisión en las muestras problema y por ende, que los límites de referencia que se establezcan sigan siendo válidos posteriormente.

La partición simultánea o previa en un buen programa externo de control de calidad ( en que el laboratorio pueda evaluar la exactitud ) le dará mucha más solidez al intervalo de referencia que se - establezca.

Para las mediciones de química sanguínea, exclusivamente, la - IFCC ha publicado también una serie de recomendaciones sobre diver- sos aspectos del control de calidad ( 14-19 ).

## VII. DETERMINACION DE LOS LIMITES DE REFERENCIA..

En la serie de manuscritos por editar de la IFCC ( 1-6 ), exis- te uno dedicado a las estrategias para establecer los límites de re- ferencia ( 5 ).

Los procedimientos para establecer límites de referencia pueden ir desde la valoración intuitiva hasta el empleo de técnicas esta- dísticas muy complejas. Más aún, es importante recordar que frecuen- temente es más productivo comparar un dato de laboratorio de un en- fermo contra los valores de la misma medición hechas en fechas pre- vias en el mismo enfermo, que compararlo contra un intervalo de re- ferencia.

Naturalmente que antes de decidir la estrategia de análisis pa- ra establecer límites de referencia, es necesario haber llenado los otros requisitos de validez que hemos venido discutiendo:

- 1) Selección adecuada de individuos normales.
- 2) Recolección estandarizada de las muestras biológicas.
- 3) Control adecuado de la medición propiamente dicha.

En todo manejo estadístico intervienen en forma importante dos aspectos:

1. El tipo de distribución de los valores.
2. El número de datos.

Actualmente se ha acumulado evidencia de que los valores de referencia raramente muestran en la práctica una distribución gaussiana ( llamada también distribución normal o distribución de campana ). Es por ello que no se deben usar en forma mecánica los datos de la estadística paramétrica habitual ( v.gr.; media y desviación estándar ) para establecer los límites de referencia.

Actualmente se recomienda el empleo de los intervalos fractilares\* para establecer un intervalo de referencia ya que se pueden usar tanto en distribuciones gaussianas como en las no gaussianas. Winkel & Statland ( 20 ) han discutido los pros y contras de diversos tipo de intervalos de referencia aplicados en la literatura.

La convención más usual plantea que el intervalo de referencia debe contener al 95% de la distribución central de la distribución de referencia, o sea, se deben tomar los fractiles 0.025 y 0.975 ( percentiles de 2.5 y 97.5% ) para lograr esta convención ( 97.5 - 2.5 = 95% de la distribución ):\*\*

---

\*Se les llama intervalos percentilares cuando se transforman a % v.gr.; ( fractilar ) 0.95 = 95% ( percentilar ).

\*\* A pesar de esta convención hay en la literatura autores que usan otros percentiles para establecer sus límites de referencia, v.gr.; percentiles 3 y 97; 5 y 95; 10 y 90; etc.

Los fractiles se pueden estimar por dos tipos de métodos:

1. Los métodos paramétricos. Estos exigen una distribución gaussiana de los datos o alternativamente, la transformación a una distribución gaussiana por manipulación de los datos ( por ejemplo, usando los logaritmos de los valores ).
2. Los llamados métodos libres de distribución ( "distribution free statistical methods" ) que se refieren a técnicas estadísticas que pueden ser aplicadas a cualquier tipo de distribución.

La selección de uno u otro tipo de método para calcular el intervalo de referencia depende además, en parte, del número de datos: los métodos paramétricos son teóricamente mejores para muestras pequeñas ( siempre y cuando tengan realmente una distribución gaussiana ) que los libres de distribución. Por otra parte, con pocos casos es precisamente cuando mayores problemas hay para establecer con cierto grado de certeza, que se trata realmente de una distribución gaussiana. Los métodos libres de distribución pueden emplearse con unos 40 casos, pero se consideran ya confiables si se cuenta con 60 individuos de referencia.

El detalle de los métodos recomendados para establecer un intervalo de referencia fractilar, tanto intuitivamente como por métodos estadísticos paramétricos o libres de distribución, se detallan en la publicación de la IFCC mencionada ya ( 5 ).

## **I. OBJETIVOS.**

Prácticamente todos los laboratorios clínicos de los países desarrollados aceptan la recomendación actual de establecer sus propios límites de referencia ( antiguamente llamados límites normales). Esta aceptación, por otra parte, no está muy difundida en países como México: en ellos hay más tendencia a usar los límites de referencia establecidos en otros países, ésto es, en poblaciones diferentes y con metodologías que pueden, al ser implementadas con reactivos locales, diferir sistemáticamente de la metodología original.

Por ello es importante comenzar a dar los primeros pasos para establecer nuestros propios límites de referencia, aunque sean inicialmente aplicables sólo a nivel institucional.

Los datos de los propios pacientes para establecer los límites de referencia han sido usados exitosamente por varios investigadores ( 21-23 ). Esta estrategia ofrece la ventaja de no aumentar los costos, y si bien no es la manera actualmente preconizada por los organismos internacionales ( ver capítulo I ), creemos que puede ser la primera aproximación de gran utilidad a laboratorios que tienen un volumen grande o mediano de trabajo: en poco tiempo pueden establecer si hay congruencia entre los datos que informan y los límites de referencia que emplean ( sean tomados de la literatura o establecidos por ellos mismos en un grupo de sujetos sanos).

Esta comunicación tiene como objetivo presentar los límites habituales de calcio y fósforo séricos obtenidos en una población seleccionada a partir de una población de nuevo ingreso al Instituto Nacional de Nutrición de la Ciudad de México. Como objetivo secundario está las repercusiones de usar los límites habituales versus los límites de referencia de la misma institución.



## MATERIAL Y METODOS.

Se revisaron 836 expedientes de los caso que ingresaron entre el 1o. de marzo y el 10 de mayo de 1960 al " Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran ". La información de calcio y fósforo se encontró anotada en 583 caso de los 836 expedientes ( 70% del total ). En tres de los 583 casos con calcio y fósforo no estaban los datos de edad y sexo: la distribución por sexo y edad de los 580 casos restantes se puede observar en la tabla 2.

De los 580 casos, hubo 476 que además tenían dato de urea, 393 el de creatinina y 316 el de albúmina.

El calcio y el fósforo se midieron en un aparato automatizado ( Coulter Chemistry ) utilizando los métodos de cresulfataleína y el de Fiske-Subbarow, respectivamente. El coeficiente de variación interdías para las mediciones de calcio y fósforo en una muestra control fueron de 2.6 y 2.9% respectivamente, es decir, ambas mediciones estaban dentro de límites aceptables de precisión.

La urea y la creatinina se midieron en sangre utilizando un aparato automatizado ( Technicon Auto Analyzer I ) y los métodos de la acetil-monoxima y el de picrato alcalino de Jaffé, respectivamente. La albúmina se midió con el método de verde de bromoresol en el aparato automatizado Coulter Chemistry.

Para evaluar diferencias de medias entre grupos se utilizó la prueba t para grupos separados:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{DE_1^2}{N_1} + \frac{DE_2^2}{N_2}}}$$

en que:  $\bar{X}_1$  y  $\bar{X}_2$  son las medias de los grupos 1 y 2 que se comparan  
 $DE_1^2$  y  $DE_2^2$  son los cuadrados de las desviaciones estándares de los grupos 1 y 2: y

$N_1$  y  $N_2$  son el número de observaciones en los grupos 1 y 2.

Para las diferencias de distribuciones por edad y sexo se usó - la prueba chi cuadrada ya que evalúa diferencias de distribución de datos cualitativos colocados en columnas comparativas:

$$\chi^2_{g1} = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

en que:

- $\sum$  = símbolo de sumatoria.
- O = número de casos observados.
- E = Número de casos esperados.
- g1 = grados de libertad.

$$g1 = ( \text{No. de líneas} - 1 ) \times ( \text{No. columnas} - 1 )$$

## DETERMINACION DE CALCIO Y FOSFORO.

### Determinación de calcio.

**Fundamento:** En solución alcalina la cresulfaleína forma un cromóforo con el calcio, el cual forma un compuesto colorido que absorbe a 550 nm.

#### Reactivos:

##### Reactivo A.

Cresulfaleína	50.2 mg
Sulfóxido de dimetilo	110.0 g
B-Quinoleína	2.5 g
Ac. clorhídrico	2.19 g
Agua cbp	1000 ml

##### Reactivo B.

Etiléndiamina	47.5 g
Monoetanolamina	53.5 g
Agua cbp	1000 ml

#### Sustancias que interfieren:

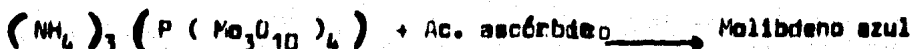
1. Las muestras lipémicas dan valores falsamente altos.
2. La presencia en el suero de oxalato de amonio, citrato, EDTA, inulina y sulfato disminuye los valores de calcio.

### Determinación de fósforo.

**Fundamento:** El fósforo inorgánico del suero reacciona con el molibdato de amonio en solución ácida formando el fosfomolibdato:



El fosfomolibdato es reducido por el ácido ascórbico, formando el molibdato azul:



La absorción del molibdeno azul a 680 nm es directamente proporcional a la concentración del fósforo inorgánico. El color es estable por 20 minutos.

**Preparación de reactivos:**

**Reactivo A**

Ac. ascórbico	30 g
Bisulfito de sodio	1 g
Agua cbp	1000 ml

**Reactivo B**

Molibdato de amonio	5 g
Ac. sulfúrico	115 g
Agua cbp	1000 ml

**Nota:** La formación de un color café amarillento en el reactivo B indica deterioro.

**Sustancias que interfieren:**

El suero de pacientes con mieloma múltiple o con otras anomalías en proteínas que dan turbidez debido a la precipitación de las mismas, dan valores falsos altos de fósforo. En tales casos es recomendable repetir el procedimiento usando una dilución 1:1 del suero con agua. Evitar los anticoagulantes y los sueros hemolizados.

## RESULTADOS:

### Características de la población de referencia.

Solamente se recabaron 3 datos generales: el diagnóstico presuntivo, la edad y el sexo: casi todos eran adultos con edades entre - 15 y 79 años exceptuando unos pocos individuos en los intervalos extremos de edad ( 10 a 14 años y 60 a 69 años ) ( ver tabla 3 ).

### Criterios de exclusión.

Los criterios utilizados para excluir individuos de la población de referencia fueron los siguientes:

1. Se encontró que de los 580 casos que tenían el valor de calcio y fósforo, sólo 478 casos tenían el dato de urea, 393 el de creatinina, y 318 el de albúmina.

Se excluyeron 262 casos que, aún cuando contaban con el valor de calcio y fósforo, carecieron de los 3 datos de los otros metabolitos ( urea, creatinina y albúmina ).

2. Se excluyeron 162 casos que tuvieran: o un valor de urea mayor de 50 mg/dl, o uno de creatinina mayor de 1.5 mg/dl, o uno de albúmina menor de 4 g/dl.

Estos valores de exclusión se obtuvieron al correlacionar los valores de calcio y fósforo con los de urea, creatinina y albúmina. Para ello se hicieron grupos de sujetos con diferentes niveles de cada uno de los metabolitos ( urea, creatinina y albúmina ) y para cada grupo se obtuvo una estadística ( N, media y desviación estándar ) de los datos de calcio y fósforo ( ver tabla 1 ).

En cada metabolito se escogió un grupo de referencia cuyos niveles de metabolitos fueron: urea de 8 a 29 mg/dl; creatinina 0.5 a 0.9 mg/dl; y albúmina de 4.5 a 4.9 g/dl ( ver tabla 1 ). Estos grupos fueron escogidos arbitrariamente, si bien coinciden gruesamente con los valores de referencia reportados en la literatura para estos

metabolitos. En la misma tabla 1 se pueden ver que los grupos con niveles de urea mayor de 50 mg/dl, de creatinina mayor de 1.5 mg/dl o de albúmina menor de 4 g/dl, tenían valores de calcio y fósforo que difirieron significativamente del grupo de referencia. En base a este hallazgo se eliminaron estos casos, aunque sólo tuvieran fuera de los límites de exclusión a uno cualquiera de los 3 datos de urea, creatinina y albúmina.

Quedó finalmente un remanente de 156 casos que tenían los valores de urea y creatinina por abajo y el de albúmina por arriba de los límites de exclusión, a este grupo de 156 casos se le designó como la población seleccionada para la obtención de límites habituales.

#### Obtención de los límites habituales.

Se procedió a observar la distribución de los datos de calcio y fósforo de la población seleccionada ( 156 casos ). En vista de que esta distribución fue gaussiana, se utilizó un método paramétrico que abarcara el 95% de la distribución ( usando el método paramétrico tradicional de media y múltiplos de la desviación estándar ): se usó la media  $\pm$  2 desviaciones estándar, para obtener los límites habituales de calcio y fósforo que se muestran en la tabla 2.

#### Representatividad de la población seleccionada.

Al comparar la distribución de edad y sexo de la población seleccionada con la distribución de edad y sexo de la población total ( tabla 3 ), no se encontró globalmente diferencia estadística de distribución ( prueba chi cuadrada ). Solamente se observó un déficit de individuos mayores de 80 años: de un total de 16 casos presentes de la población total, solamente uno ingresó a la población seleccionada ( debieron ser 4 ó 5 casos ). Si bien este déficit de ancianos comprende a un número pequeño de casos concuerda con lo reportado en la literatura ( 24 ) de que constituyen otro tipo de población, y de que con ellos se necesitan otras estrategias de obtención de límites de referencia.

TABLA 1. Media y DE ( desviación estándar ) de calcio y fósforo séricos en función del nivel de otros metabolitos sanguíneos.

Metabolito	Nivel	No. de casos	Ca (mg/dl)		P ( mg/dl )	
			Media	DE	Media	DE
Urea (mg/dl)	2 - 7	10	8.94	0.96 NS	3.58	2.31 NS
	8 - 29	307	9.44	0.81 NS	3.69	0.67 NS
	30 - 49	119	9.46	0.76 NS	3.80	0.60 NS
	50 - 99	21	8.89	1.24 *	4.78	2.50 *
	100 -428	21	8.26	1.27 **	7.44	4.27 **
Creatinina (mg/dl)	0.5 - 0.9	354	9.64	0.54 NS	3.73	0.64 NS
	1.0 - 1.4	19	9.65	0.98 NS	3.87	0.76 NS
	1.5 - 4.9	8	8.94	0.98 **	4.35	0.68 **
	7 - 25	12	8.56	1.19 **	8.63	4.72 **
Albúmina (g/dl)	1.3 - 2.4	15	7.91	0.85 **	5.16	3.01 NS
	2.5 - 2.9	45	8.28	0.92 **	4.36	2.22 NS
	3.0 - 3.4	32	8.51	0.76 **	3.89	1.60 NS
	3.5 - 4.0	44	9.11	0.68 *	3.75	0.86 NS
	4.0 - 4.4	91	9.45	0.58 NS	3.74	0.64 NS
	4.5 - 4.9	71	9.84	0.59 NS	3.85	0.49 NS
	5.0 - 5.4	20	10.08	0.39 NS	3.86	0.57 NS

Se encuadra el grupo contra el cual se comparan los otros grupos para ver si había diferencia intergrupo significativa usando la prueba t - ( a coles ): NS = no significativa; \* p menor de 0.5 y \*\* p menor de 0.01 .

Tabla 2. Niveles séricos de calcio y fósforo en la población total de 582 casos y en una subpoblación seleccionada de la anterior por tener urea menor de 50 mg/dl, creatinina menor de 1.5 mg/dl y albúmina mínima de 4.0 g/dl.

Población	No. casos	Calcio (mg/dl)			Fósforo (mg/dl)		
		Media	DE	CV%	Media	DE	CV%
Total	582	9.43	0.82	8.7	3.88	1.34	34.5
Seleccionada	156	9.75	0.45	4.6	3.75	0.50	12.7
Límites normalidad en población seleccionada ( $\bar{x} \pm 2$ DE)		8.85 - 10.65			2.75 - 4.75		



**Tabla 3. Distribuciones de sexo y edad en la población total y en -  
seleccionada en base a tener urea menor de 50 mg/dl, crea-  
tinina menor de 1.5 mg/dl y albúmina mínima de 4 g/dl.**

Variable	Límites	No. de casos		% de casos	
		Total	Seleccionada	Total	Seleccionada
Edad (años)	10 - 14	5	1	0.9	0.7
	15 - 19	32	10	5.5	6.4
	20 - 29	88	25	15.2	16.0
	30 - 39	90	26	15.5	16.7
	40 - 49	116	30	20.0	19.2
	50 - 59	120	37	10.7	23.7
	60 - 69	79	19	13.6	12.2
	70 - 79	34	7	5.9	4.5
	80 - 89	16	1	2.7	0.6
	<b>Totales</b>	<b>580</b>	<b>156</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
Sexo	Femenino	234	93	57.6	59.6
	Masculino	246	63	42.4	40.4

No hay diferencia de distribución por edad o sexo entre total y se-  
leccionada por prueba chi cuadrada ( edad:  $\chi^2$  3.96 con 8 gl; sexo:  
 $\chi^2$  0.20 con 1 gl).

## DISCUSION.

Primeramente se discutirán comparativamente los aspectos que se recomiendan en la obtención de límites de referencia, y lo que de hecho se realizó en este estudio para la obtención de los límites habituales de nuestra institución.

Instituciones internacionales como la IFCC ( capítulo I, índice I ) hacen énfasis en que para obtener valores de referencia hay que caracterizar a la muestra en relación a factores que pueden afectar de alguna manera los niveles de calcio y fósforo, v.gr.: estrato socioeconómico, dietético, genético, antropométrico, o si había sujetos fumadores, tomadores, o en un estado fisiológico especial, etc., lo cual no se hizo en este estudio.

Pero aún cuando no se hizo todo lo anterior, no hay que olvidar qué es lo que se quiere saber con los límites buscados, y el uso que se les quiere dar. En nuestro caso, queremos encontrar una primera aproximación a los valores habituales de calcio y fósforo en la población del Instituto Nacional de Nutrición, para que sirvan como una primera aproximación a si son o no parecidos a los límites de referencia que usa la propia institución para hablar de "normales" y "anormales".

Esta inquietud de evaluar los límites de referencia de la institución surge del hecho de que la estrategia clásica de obtener valores de referencia a través de un número de personas "sanas", es un enfoque que puede tener fallas, v.gr.: incluir un número muy pequeño de personas, o que éstas no sean representativas de la población que se pretende estudiar. Queda además el problema de poder declarar con toda certeza que el material que se estudió para establecer los está formado exclusivamente por personas sanas: hay que recordar que salud es un término elusivo y difícil de precisar, y que incluso hay autores que declaran "El estado absoluto de salud no existe; existe algún grado de patología en todo individuo, similar a la entropía de todo sistema químico" (25).

Se ha recomendado que la toma de la muestra sea estandarizada, - es decir, que la toma de muestra se haga siempre de la misma manera de modo que se minimicen, en todo lo posible, las variables que pueden afectar a las características de la muestra ( ver capítulo I, - índice V ).

La toma de muestra en el presente estudio se efectuó bajo las condiciones usuales en nuestra institución:

1º El paciente debe estar en ayunas.

2º Al paciente se le hace sentar mientras se efectúa la toma de -- muestra, pero no es puesto en reposo previo. Algunos esperan su turno no sentados, y otros parados, e inclusive hay ocasionalmente pacientes que llegan prácticamente corriendo, ya que se retrasan a su cita de toma de muestra.

3º. Generalmente, la muestra de sangre es tomada de la vena central del brazo, si bien algunas veces se les toma de las venas colaterales del brazo o de la mano ( esto se hace sólo cuando el paciente - no tiene distinguible o está muy maltratada la vena central ). Se emplean jeringas de vidrio de 10 ó 20 ml y agujas desechables ( 20X 32 ó 21X32 ).

4º. A las muestras se le pone anticoagulante o no, según el estudio a realizar. Para las mediciones de urea y creatinina se utiliza EDTA en polvo, y se agita enérgicamente la mezcla sangre-anticoagulante. Las mediciones de calcio, fósforo y albúmina se realizan en suero, - esto es, no se utiliza anticoagulante, y la muestra permanece en reposo hasta el momento que se comienza la separación de suero en el - laboratorio.

5º. El tiempo desde la toma de muestra hasta el arribo al laboratorio es aproximadamente de 45 minutos, tiempo en el cual las muestras permanecen a temperatura ambiente. Ya en el laboratorio, se incuban aproximadamente una hora en baño maría a 37°C. El tiempo total desde la toma hasta el análisis de la muestra varía entre 2 y 3 horas.

En lo que respecta a control de calidad, sólo se contaba con un programa incipiente de control de calidad interno, durante el período de este estudio: se incluía diariamente una muestra control de concentración conocida ( suero comercial Labtrol ). El coeficiente de variación interdías para calcio fue de 2.6% y para fósforo de 2.5%, o sea, ambas mediciones presentaban una precisión aceptable, si bien la muestra control recibía muy probablemente un trato preferencial. No se contaba en ese entonces con ningún otro tipo de información de control que demostrara la exactitud del método v.gr. Un programa externo de control de exactitud, ni con índices de precisión menos sujetos a trato preferencial, v.gr., el promedio de enfermos ( 26 ).

Para el establecimiento de límites de referencia, actualmente se recomienda el uso de intervalos fractilares, ya que se utilizan tanto para distribuciones gaussianas como para no gaussianas ( ver capítulo I, índice VII ), pero esto no invalida la estrategia de análisis paramétrico usado por nosotros ya que los valores tenían una distribución gaussiana. Por ello se utilizó una estadística paramétrica rutinaria ( media y un múltiplo de la desviación estándar ) para establecer los límites habituales institucionales, los cuales pasamos ahora a discutir.

La comparación de los límites habituales de este estudio versus los límites de referencia de la propia institución así como los reportados por los fabricantes del aparato en que se hacen las mediciones de calcio y fósforo, se presentan en la tabla 4. En la tabla se pueden ver los siguientes hechos:

1. Hay un claro desplazamiento de los límites habituales de calcio hacia la "izquierda" ( tendencia a valores bajos ): ambos límites habituales de calcio ( inferior y superior ) son menores a los de las otras dos series.

2. Hay un desplazamiento menos claro de los límites habituales de fósforo hacia la "derecha" (tendencia a valores altos), pero es menos claro que el calcio, ya que sólo el límite superior de fósforo es mayor que el de las otras dos series, pero el límite inferior es intermedio.

En un intento de evaluar las repercusiones institucionales que hubiera tenido el emplear los límites habituales versus los límites de referencia, se reanalizaron los datos de calcio y fósforo de los 583 casos de nuevo ingreso, y se estableció el porcentaje de sujetos con datos fuera de límites habituales y fuera de límites de referencia. La tabla 5 muestra cómo se distribuyeron los 583 casos en las 9 combinaciones posibles que pueden darse de valores normales, combinados altos y/o bajos en función de los límites habituales y de los límites de referencia.

Como se puede observar, los límites de referencia tienen un 7% más de valores anormales que los límites habituales (72% vs 65%). Este exceso de 7% de sujetos se repartió en 4% que tienen sólo una de las dos mediciones fuera de límites de referencia, y en un 3% que tenían ambas fuera de los límites de referencia. Sobre la base de que todo resultado fuera de límites debe ser repetido, se hubieran tenido que repetir 259 mediciones fuera de límites de referencia vs sólo 207 fuera de límites habituales, ésto es, que habría una sobrecarga de 25% con el empleo de los límites de referencia en comparación con los límites habituales. Estos datos muestran que es económicamente importante aclarar la discrepancia entre los límites habituales y los límites de referencia ya que se traduce en un incremento substancial de costos de pruebas que pudieran estarse repitiendo innecesariamente.

Las diferencias entre los límites habituales y los de referencia pueden obedecer a tres causas:

1) La población estudiada es una población anormal, v.gr. con tendencia a calcio bajo y fósforo alto.

2) Problemas de exactitud de las mediciones.

3) Problemas de imprecisión.

En relación a la imprecisión, sabemos que las mediciones tenían un CV interensayo aceptable durante la realización del estudio, y - pueda razonablemente descartarse como explicación al fenómeno de -- desplazamiento de límites.

La anormalidad de la población de este estudio es un hecho indiscutible ya que es una población hospitalaria, y lo fácil sería asignar el desplazamiento de límites habituales a dicha causa, pero no - se puede descartar la posibilidad de que la exactitud hubiera participado en el fenómeno, ya que no se usó el mismo calibrador que cuando se establecieron los límites de referencia en 1976; y durante este estudio en 1980: se usaron como calibradores 2 lotes diferentes - de suero control de un mismo proveedor ( Coulter ).

A partir de diciembre de 1981, las mediciones de calcio y fósforo han estado incluidos en un programa externo de exactitud, el Programa Internacional de Control de Calidad de la OMS ( Organización - Mundial de la Salud ). Los resultados de dicho estudio han permitido establecer que el calibrador de 1982 tenía un error de exactitud en ambos metabolitos, éste es, el calibrador llevaba a mediciones falsamente altas: 5% para el calcio y 8% para el fósforo. Ello planteó la conveniencia de recalibrar el calibrador, lo cual obligó a que los - límites de referencia de calcio se cambiaran a partir de enero de - 1983: De 9 a 11, pasaron a 8.5 a 10.5 mg/dl, esto es, más parecido a los límites habituales de calcio de este estudio.

Por otra parte, tampoco sabemos si estos datos de la exactitud - del calibrador de 1982 sean equivalentes a los de los calibradores - de 1980, y los de 1976; por lo que parece que la mejor alternativa - para aclarar las discrepancias entre límites habituales y límites de

referencia, sería la de repetir este estudio ahora que la exactitud del calibrador está validada y de que el laboratorio cuenta con un programa interno adecuado de la precisión de calcio y fósforo ( 27 ).

Tabla 4. Comparación de límites en 3 series: límites habituales en la serie del presente estudio, límites de referencia en las series de Coulter e INNSZ ( Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán ).

Metabolito		Presente estudio N= 156 *	Coulter N= 120 **	INNSZ N= 102 ***
Calcio (mg/dl)	Límites	8.85 - 10.65	9.0 - 11.5	9.0 - 11.0
Fósforo (mg/dl)	Límites	2.75 - 4.75	2.5 - 4.4	3.0 - 4.5

\* Los 156 casos seleccionados de población de nuevo ingreso al INNSZ.

\*\* Obreros de Hialeah, Florida, EEUU.

\*\*\* Personal del INNSZ.



**Tabla 5. Porcentajes de casos normales y anormales de calcio y/o fósforo en una población de nuevo ingreso al IMMSZ de acuerdo a dos tipos de límites.**

<b>Ca / P</b>	<b>LIMITES Referencia</b>	<b>LIMITES Habituales</b>
<b>N / N</b>	<b>380 ( 65 % )</b>	<b>417 ( 72 % )</b>
<b>B / N</b>	<b>75</b>	<b>80</b>
<b>A / N</b>	<b>3</b>	<b>20</b>
<b>N / A</b>	<b>38</b>	<b>15</b>
<b>N / B</b>	<b>31</b>	<b>10</b>
<b>Subtotal</b>	<b>147 ( 25 % )</b>	<b>125 ( 21 % )</b>
<b>B / A</b>	<b>28</b>	<b>22</b>
<b>B / B</b>	<b>26</b>	<b>17</b>
<b>A / A</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>A / B</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Subtotal</b>	<b>56 ( 10% )</b>	<b>41 ( 7 % )</b>
<b>TOTALES</b>	<b>583 ( 100 % )</b>	<b>583 ( 100 % )</b>

**N = Dentro de Límites.**

**B = Abajo del Límite inferior.**

**A = Arriba del Límite superior.**

## CONCLUSIONES.

1. Utilizando varios criterios, se logró seleccionar una subpoblación de 156 casos a partir de una población de 583 casos que ingresaron al INNSZ ( Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán ) en 50 - días hábiles ( marzo a mayo de 1970 ).

2. La población seleccionada mostró ser representativa de la población total en los que respecta a edad y sexo, a excepción de los ancianos de 80 - 89 años que quedaron prácticamente excluidos de la población seleccionada.

3. La distribución de los valores séricos de calcio y fósforo en la - población seleccionada fue de tipo gaussiano. Los parámetros de dicha distribución fueron:

	Media	Desv. Est.
Calcio ( mg/dl )	9.75	0.45
Fósforo ( mg/dl )	3.75	0.50

4. Con estos parámetros se calcularon ( Media  $\pm$  2 DE ) unos límites - designados habituales para diferenciarlos de los clásicos límites de referencia:

### Límites Habituales

Calcio ( mg/dl )	8.85 a 10.65
Fósforo ( mg/dl )	2.75 a 4.75

5. Al comparar los límites habituales con los límites de referencia - ( establecidos en 1976 en la propia institución ) se observó que los límites habituales de calcio mostraban un desplazamiento "a la izquierda" ( tendencia a valores bajos ) versus los límites de referencia, pero que los límites habituales de fósforo mostraban el fenómeno opuesto: un desplazamiento "a la derecha" ( tendencia a valores altos ).

6. La aclaración de la o las causas que provocan estas diferencias - entre uno y otro tipo de límites, tiene importancia: hay una disminución de 25% en el número de pruebas anormales a repetir si se emplean los límites habituales en lugar de los límites de referencia.

7. El desplazamiento de los límites habituales puede deberse a que la población estudiada es una población hospitalaria, pero no se puede descartar que la exactitud hubiera participado en causar el fenómeno: los datos de 1982 de un programa externo de exactitud, al que ingresó en diciembre de 1981, mostró que había problemas de exactitud para calcio y fósforo, pero no podemos saber si los datos de 1982 son aplicables al pasado.

8. Se concluye que es conveniente repetir la obtención de límites habituales ahora que las mediciones de calcio y fósforo están bajo un programa externo de exactitud y de un programa interno de precisión más adecuado.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gräsbeck R., Siest G., Wilding G.Z., Williams G.Z. & Whitehead T.P.: Provisional recommendation on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. Clin Chim. Acta, 87: 459 - 465, 1978.
2. Petit Clerc C.: The theory of reference values. Part 2. Selection of healthy individuals for the production of reference values. IFCC document Stage 1, Draft 4, 1981.
3. International Federation of Clinical Chemistry: The theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and specimen collection for the production of reference values. Citado en (2).
4. International Federation of Clinical Chemistry: The theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production and use of reference values. Citado en (2).
5. Solberg H.E.: The theory of reference values. Part 5. Treatment of collected reference values. Determination of reference limits. IFCC Document Stage 1, Draft 4, 1981.
6. International Federation of Clinical Chemistry: The theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. Citado en (2).
7. Munan L., Kelly A. & Petit Clerc C.: Population serum urate levels and their correlates; the Sherbrooke regional study. Amer. J. Epidemiol. 103: 369- 382, 1976.
8. Munan L.: Population based reference data. En: Logic and Economics of Clinical Laboratory Use, Editors Rubin M. & Benson E.S., Elsevier, Nueva York, 1976, pp. 117 - 128.
9. Gardner M. & Scott R.: Frequency distribution and reference values of plasma alkaline phosphatase activity in the adult population of a Scottish new town. J. Clin., 31: 1202 - 1206, 1978.

10. Gardner M. & Scott R.: Age- and sex-related reference ranges for eighth plasma constituent derived from randomly selected adults in a Scottish new town. *J.Clin. Path*, 33:380 -385, 1980.
11. Alstrom T., Grasbek R., Hjelm M. & Skandsen S.: Recommendation concerning the collection of reference values in clinical chemistry and activity report by the Committee on the Reference Values of the Scandinavian Society for clinical chemistry and clinical physiology. *Scand. J. Clin Lab. Invest.*, 35, suppl. No. 144, 1975.
12. Pnek E. & Petit Clerc.: Blood sampling of venous origin in view of establishing reference values. *Ann. Biol. Clin.*, 30:251 - 265, 1980.
13. Büttner J., Borth R., Boutwell, J.H. & Broughton P.M.: Approved recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology. *Clin Chem. Acta* 98: 129F-143F, 1979.
14. Büttner J., Borth R., Boutwell, J.H. & Broughton P.M.G.: Approved recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 2. Assessment of analytical methods for routine use. *Clin Chem. Acta*, 98: 145F - 162F, 1979.
15. Büttner J., Borth R., Boutwell J.H., Broughton P.M.G. & Bowyer R.C.: Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 3. Calibration and control materials. *Clin Chem. Acta* 75: 11F - 20F, 197
16. Büttner J., Borth R., Broughton P.M.G. & Bowyer R.C.: Quality control in clinical chemistry. Part 4. International quality control. *Clin. Chem Acta* 106: 109F - 120F, 1980.
18. Büttner J., Borth R., Boutwell J.H., Broughton P.M.G. & Bowyer R.C.: Approved recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 6. Quality requirements from the point of view of health care. *Clin. Chem. Acta*, 109: 115F - 124F, 1981.

17. Büttner J., Borth R., Boutwell J.H., Broughton P.M.G. & Bowyer R.C.: Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 5. External quality control. Clin. Chem. Acta, 83: 189F - 202F, 1978.
19. Winkel P. & Statland B.F.: Reference values in clinical diagnosis by laboratory methods. En: Text book in Clinical Pathology, Ed. J.B. Henry, Saunders, Philadelphia, 1979, pp. 29-52.
20. Glick Jr.: Statics of patient test values: Application to indirect normal range & quality control. Clin. Chem, 18: 1504 - 1506, 1972.
21. Little A.H.: Normal ranges from hospital out population. Clin Chem. Acta, 57: 91 - 94, 1974.
22. Neuman G.J.: The determination of normal ranges from routine laboratory data. Clin Chem. 14: 979 - 988, 1968.
23. Landahl S., Jøgenburg R. & Svanborg A.: Blood components in 70-year-old population. Clin Chem. Acta, 112: 301 - 304, 1981.
24. Gräsbeck R.: Types of reference groups. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29: suppl 126, 1972.
25. Loria A.: Control de calidad II. El promedio de enfermos en el control de calidad de mediciones electrolíticas en suero. Rev. Invest. Clin (Méx ), 34: 375 - 377, 1982.
26. Loria A.: Control de calidad I. El promedio de enfermos como índice de control de calidad. Rev. Invest. Clin. (Méx ), 34: 277 - 280, 1982.