



Estimación de intervalos biológicos de referencia del hemograma en niños y jóvenes de 2 a 18 años utilizando los métodos percentil empírico, bootstrap, Harrell & Davis, y el estimador robusto de horn

Estimation of biological reference intervals of the hemogram in children and young people aged 2 to 18 years using empirical percentile, bootstrap, Harrell & Davis, and Horn's robust methods

Jannet Zapata Bailarín*

RESUMEN

Introducción: los resultados de laboratorio clínico deben interpretarse a la luz de intervalos biológicos obtenidos de individuos de referencia, en estos juega un papel muy importante la variación intra e interindividual de las magnitudes biológicas y de factores como la nutrición y el origen geográfico, entre otros. Dichos valores generalmente son calculados con herramientas estadísticas a las que no se les comprueba los supuestos estadísticos, o no se tiene en cuenta el tamaño muestral requerido afectando su validez.

Métodos: este estudio utilizó los métodos percentil empírico, Bootstrap, Harrell & Davis, y el estimador robusto de Horn de acuerdo a la clasificación por edad y sexo recomendada por Soldin et al. en 2003 en población pediátrica, para estimar intervalos de referencia biológicos de 20 parámetros del hemograma de 842 personas entre 2 y 18 años. Los intervalos propuestos de los siguientes mensurandos: leucocitos, glóbulos rojos, hemoglobina y plaquetas, fueron comparados frente a los propuestos por dichos autores, para determinar si habían cambios sustanciales en las poblaciones estudiadas y establecer cuál de los métodos evaluados determinaría un Intervalo con el que el clínico pudiera apoyar el estado hematológico de la población estudiada.

Resultados y conclusiones: los métodos Bootstrap y estimador robusto de Horn producen intervalos más amplios que el estimador de Harrell & Davis y percentil empírico, en la mayoría de los casos. El límite inferior calculado con el estimador Robusto de Horn se alejó mucho más del valor de la mediana, y el método Bootstrap produjo el límite superior más alto. Al comparar cada intervalo con los propuestos por Soldin et al., se observaron diferencias marcadas aun cuando la variabilidad intraindividual fue baja como en el caso de la hemoglobina. Estos resultados confirman la necesidad de que cada laboratorio estime sus propios intervalos biológicos utilizando protocolos estandarizados.

Palabras clave: Bootstrap, Harrell & Davis, Estimador robusto de Horn, Percentil empírico, hemograma, Intervalos biológicos de referencia, IBR.

* Microbióloga, docente, y gestora técnica del Laboratorio Docente, Asistencial e investigativo de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia. Contacto: jannet.zapata@udea.edu.co
Recepción: 29/08/2018 Aceptación: 21/04/2019
Cómo citar este artículo: Zapata-Bailarín J. Estimación de intervalos biológicos de referencia del hemograma en niños y jóvenes de 2 a 18 años utilizando los métodos percentil Empírico, Bootstrap, Harrell & Davis, y el Estimador Robusto de Horn. Hechos Microbiol. 2017; Vol8(Nº1-2):31-43

ABSTRACT

INTRODUCTION: Clinical laboratory results should be interpreted according to biological intervals obtained from reference individuals. Intra- and inter-variability of biological magnitudes and of other factors such as nutrition and geographical origin, play an important role. These values are usually calculated with statistical tools that are not tested for statistical assumptions, or without considering the required sample size for validity.

METHODS: Percentile, bootstrap, Harrell & Davis', and Horn's robust methods were used in this study to estimate biological reference intervals of 20 parameters of the hemogram from 842 young people aged between 2 and 18 years. The classification of pediatric populations by age and sex recommended by Soldin et al. (2003) was considered. Also, the intervals proposed by such authors were compared with those contained in this study for leukocytes, red blood cells, hemoglobin, and platelets in order to determine if there were substantial changes in the populations studied, and to establish which of the methods evaluated would provide an interval for the clinician to determine the hematological status of the population studied.

RESULTS AND CONCLUSIONS: In most cases, bootstrap and Horn's robust methods provided wider intervals than those obtained with empirical percentile and Harrell & Davis' methods. The lower limit calculated with the robust estimator was far below the median value, and the bootstrap method produced the higher upper limit. Marked differences were observed after comparing each interval with those proposed by Soldin et al., even when intra-individual variability was low, as in the case of hemoglobin. These results confirmed the need for each laboratory to estimate its own biological intervals using standardized protocols

KEYWORDS: bootstrap, Harrell & Davis, Horn's robust method, empirical percentile, hemogram, biological reference intervals, BRI.

INTRODUCCIÓN

El intervalo biológico de referencia (IBR) es definido por la Organización Internacional para estandarización en la norma ISO 15189:2012, como el intervalo

especificado de la distribución de valores tomados, a partir de una población de referencia biológica.¹ Por su parte, el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI), en la guía CLSI EP28-A3c de 2010, lo define como el intervalo de valores desde el límite inferior hasta el límite superior de referencia.² Se utilizan ampliamente en medicina para tomar decisiones acerca de la situación clínica en individuos y son construidos utilizando modelos matemáticos basados en la distribución de los datos.

En cuanto a los intervalos de referencia pediátricos, los niveles de la mayoría de indicadores biológicos tienen una variación muy marcada debida a la edad, el sexo y la etnia, además de la alta tasa de crecimiento y al desarrollo; por lo tanto, los valores de referencia específicos de edad y sexo son críticos para la interpretación apropiada de los resultados de la prueba.³⁻⁶ El uso de intervalos de referencia de adultos para la interpretación de los resultados de las pruebas pediátricas, es una práctica común en muchos centros de atención en salud de todo el mundo, esto se convierte en un riesgo muy grande para la determinación del estado de salud de los niños. Sumado a esto, muchos intervalos de referencia pediátricos actualmente utilizados se han derivado de muestras recogidas en lactantes y niños hospitalizados y pueden no reflejar los niveles adecuados en poblaciones sanas.

Además de la variabilidad natural y ambiental descrita de los indicadores biológicos que afecta la estimación de los IBR, se encuentra que los cálculos matemáticos o estadísticos que se utilizan para su estimación, no son acordes con la forma de distribución de los valores provenientes de la población, es muy común utilizar métodos paramétricos, asumiendo Gaussianidad,⁷ y no se siguen los protocolos matemáticos para identificar valores atípicos o no se utilizan las herramientas para hacer la clasificación por edad o sexo cuando es requerida. Es habitual encontrar en la literatura científica la estimación de los intervalos utilizando cuantiles y otros métodos paramétricos y no paramétricos, destacándose los que utilizan la media, y la desviación estándar $[s]$ del conjunto de datos, utilizando el modelo $\bar{X} \pm [Z\alpha/2 * [s/\sqrt{n}]$, asumiendo normalidad de las variables;⁸ también se utilizan los métodos denominados "robustos", que resisten la influencia de valores extremos al reducir los valores

a medida que se alejan del centro de la muestra, son eficientes para datos provenientes de distribuciones Gaussianas y en casos en los que la distribución subyacente sea de cola pesada.⁹ Recientemente, algunos autores han utilizado la técnica de remuestreo, como el método bootstrap para crear intervalos de confianza o pruebas de hipótesis;^{10,11} instituciones dedicadas a la estandarización de los laboratorios clínicos recomiendan esta técnica para estimar intervalos biológicos de referencia.²

Otra práctica muy común, es importar IBR extraídos de poblaciones con características diferentes a las evaluadas pero que fueron obtenidos con sistemas de medición similares y por eso se asume que pueden utilizarse para discriminar el estado de salud de la población atendida.

Este estudio utiliza las herramientas estadísticas no paramétricas como el percentil empírico, Bootstrap, estimador Harrell & Davis, y el estimador Robusto de Horn, para construir los cuantiles 2,5 y 97,5 de veinte parámetros del hemograma en población infantil y juvenil que asistieron al laboratorio Docente, Asistencial e Investigativo de la Universidad de Antioquia, en Medellín entre enero de 2015 y octubre de 2016.

El objetivo general de este estudio fue estimar los IBR correspondiente a los cuantiles 2,5 y 97,5 de los parámetros del hemograma en niños y jóvenes de 2 a 18 años utilizando las herramientas estadísticas percentil empírico, Bootstrap, el estimador de Harrell & Davis y el estimador robusto de Horn, de acuerdo a la clasificación por edad y sexo propuesta por Soldin et al., en 2003 en población pediátrica.

MATERIALES Y MÉTODOS

CONDICIONES PREANALÍTICAS Y ANALÍTICAS

Se realizó un estudio observacional analítico de corte transversal basado en la información de la base de datos del Laboratorio Docente, Asistencial e Investigativo de la Universidad de Antioquia, Colombia.

Se tomó una submuestra de 1229 resultados de hemogramas de niños y jóvenes entre uno y dieciocho años cumplidos, que provenían de diferentes lugares del departamento de Antioquia, principalmente del área metropolitana, recolectados entre enero de 2015 y octubre de 2016, remitidos para realizarse exámenes

dentro del marco del programa de promoción de la salud y prevención de la enfermedad, otros remitidos para control, seguimiento o diagnóstico clínico, o previo a cirugías menores, y que asistieron al laboratorio en horario diurno para la recolección de la muestra de sangre venosa. A dicha información se le aplicó la metodología propuesta por Dixon¹² y observación gráfica para identificar valores atípicos, estos valores, fueron analizadas a la luz de la clínica, se indagó el motivo de consulta y en la mayoría se encontró que había sido por situaciones como infecciones o seguimiento a medicamentos de control, o por sospecha de patología identificada por el clínico, por lo que se excluyeron 387 resultados. Finalmente se realizó este estudio con 842 observaciones que se clasificaron por sexo y edad según lo descrito por Soldin et al. en 2003 en población pediátrica.¹³

Los resultados de los niños menores de dos años no fueron tenidos en cuenta debido a que solo fueron 9 entre hombres y mujeres y no cumplían con la cantidad de datos requeridos para estimar los IBR.

Aunque en este estudio no se utilizaron muestras, cabe resaltar los métodos preanalíticos y analíticos que utilizó el laboratorio clínico para obtener los resultados, antes de tomar la muestra, se tiene como protocolo preguntar al tutor o acompañante de los niños y jóvenes la condición de ayuno, el consumo de medicamentos y la razón de realizarse los exámenes; además, se emplea un método estandarizado para obtener entre 3 y 5 mL de sangre utilizando el sistema cerrado en tubos con anticoagulante EDTA dipotásico; los que se procesaron bajo un protocolo acorde con las guías propuestas por el consenso para la estandarización en hematología,¹⁴ que recomienda procesar las muestras antes de que se cumplan cuatro horas de su recolección para evitar alteraciones en los parámetros por los efectos del anticoagulante, y bajo condiciones controladas de temperatura entre 18 °C y 25 °C. Su análisis se realizó en el analizador hematológico Advia 2120i, asegurando previamente su desempeño en términos de precisión y veracidad frente a los límites propuestos por Ricos et al.¹⁵

HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

Inicialmente a la base de datos se le realizó a un examen exploratorio para determinar la presencia de valores atípicos que pudieran afectar la estimación de los

cuantiles. Este análisis se realizó con una modificación del estadístico propuesto por Dixon¹² y por análisis gráfico utilizando el diagrama de cajas y bigotes. A la base de datos depurada se le hizo análisis descriptivo a partir de medidas de frecuencia, proporción, mediana, rango intercuartílico y simetría, este último se estimó con el coeficiente de asimetría de tercer orden para cada uno de los grupos clasificados. Por último, se estimaron los IBR, utilizando los métodos no paramétricos, percentil empírico, estimador bootstrap, estimador de Harrell & Davis, y estimador robusto de Horn.

La programación de las funciones para estimar los estadísticos se hizo en el software R[®] utilizando las librerías Stats, Hmisc, y Apply [R Development Core Team, 2016]. La identificación de valores atípicos se hizo en el programa de Office[®], Excel 2010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de realizar las clasificaciones correspondientes, se obtuvo resultados del hemograma de 842 individuos, 76 niños y 64 niñas entre 2 y 6 años, 112 niños y 124 niñas entre 7 y 12 años y 199 hombres y 267 mujeres entre 13 y 18 años.

ANÁLISIS DE ALGUNOS PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA

Se realizó el análisis a través de la mediana, coeficiente de asimetría y el rango intercuartílico; además, se compararon los IBR reportados por Soldin et al. en 2003, frente a los estimados en el presente estudio. Se tuvieron en cuenta solo los siguientes mensurandos: cantidad de leucocitos, glóbulos rojos, hemoglobina y plaquetas en la sangre de los individuos, debido a que son los más consultados por los clínicos para la toma de decisiones.

SOBRE LA CANTIDAD DE LEUCOCITOS

Los leucocitos son células nucleadas de la sangre encargadas de reconocer y eliminar cualquier agente extraño que ingresa al organismo. Su recuento suministra información importante, no solo en procesos hematológicos, sino también, en general para detectar y seguir la evolución de enfermedades infecciosas y

cuadros linfó— y mieloproliferativos¹⁶. Para definir sus valores de referencia debe tenerse en cuenta las siguientes variables fisiológicas: al nacer el número de leucocitos puede oscilar entre $9,0$ y $30,0 \times 10^9$ por litro de sangre, disminuye progresivamente y alcanza en la adultez un valor aproximado entre $4,5$ a $11,0 \times 10^9$ por litro de sangre. Se ha encontrado, además, que en los individuos de raza negra presentan una leve disminución. En los niños, una semana después del nacimiento empiezan a decaer de forma rápida. Se mantienen estables durante el primer año de vida para luego seguir un descenso paulatino a lo largo de la infancia hasta llegar a las cifras del adulto.¹⁶

El diagrama de cajas y bigotes para los leucocitos se muestra en la figura 1, se observó que tanto en niños y niñas de 2 a 6 años la mediana es ligeramente mayor comparado con los demás grupos y que van disminuyendo con la edad, aunque en el grupo de las jóvenes entre 13 y 18 años se observó un leve aumento. Todos los grupos tenían simetría positiva (dato no mostrado) y el rango intercuartílico fue similar en todos los grupos oscilando entre 2,005 y 2,71 para el grupo de hombres entre 2 a 6 años y 13 a 18 años respectivamente. Esto muestra una variación similar de la cantidad de leucocitos en cada una de las subpoblaciones estudiadas. En el diagrama de cajas y bigotes desde el segundo grupo se observa presencia de valores atípicos que no fueron detectados por el filtro propuesto por Dixon.

Soldin et al., compilaron los resultados de la cantidad de leucocitos en niños y adolescentes entre 1 y 18 años, estimados en diferentes poblaciones y por diferentes metodologías de análisis. Para 4071 niños y 3575 niñas entre 2 y 6 años los autores reportaron un intervalo comprendido entre $5,97$ - $10,49 \times 10^3$ /L para los primeros y en niñas de $5,98$ - $10,8 \times 10^3$ /L, resultados obtenidos utilizando el mismo fabricante del analizador automatizado en este estudio. Se observan diferencias importantes en los dos grupos evaluados comparando con los datos descritos en la tabla 1, los percentiles empíricos para los niños de la misma edad fueron $5,06$ - $11,33 \times 10^3$ /L y para las niñas $4,20$ - $13,196 \times 10^3$ /L. Las otras tres herramientas estadísticas tampoco estimaron intervalos parecidos a los reportados por dichos autores. Para las demás poblaciones la situación fue similar.

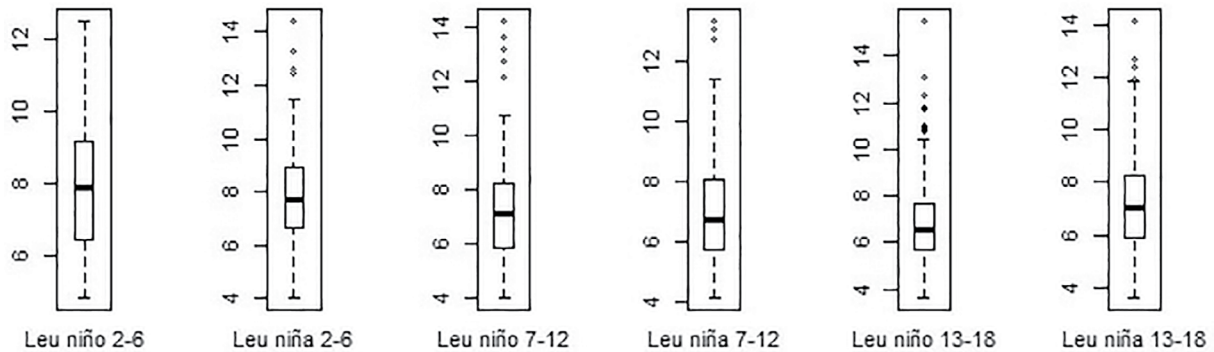


Figura 1. Diagrama de cajas y bigotes. Cantidad Leucocitos en niños y jóvenes de acuerdo a los grupos propuestos por Soldin et al.¹³

SOBRE LA CANTIDAD DE GLÓBULOS ROJOS

Los Glóbulos rojos son células que contienen la proteína llamada hemoglobina que es la encargada del transporte del oxígeno hacia los tejidos. Se ha afirmado que sus recuentos presentan ciertas variaciones fisiológicas, tales como la fluctuación diurna y las consecutivas a la ingesta de alimentos. Según Miale y Bloom, cinco factores tienen un efecto estadísticamente significativo en su recuento: la postura, la excitación o el ejercicio físico intenso, la edad, el sexo y la altitud sobre el nivel del mar.¹⁶ Por ejemplo, la actividad física intensa produce recuentos más altos que los conseguidos en condiciones basales. Aunque la excitación es rara vez un factor importante en los adultos, lo es en los niños. Con respecto a la edad, el recuento de glóbulos rojos del recién nacido es mayor que el del adulto. El valor desciende rápidamente después del nacimiento y llega a sus valores más bajos entre el segundo y cuarto mes de vida. Se advierte, entonces, un aumento gradual hasta alcanzar el índice normal del adulto a los 14 años. En lo referente al sexo, las mujeres tienen un recuento más bajo que los hombres, pero la diferencia no es tan importante antes de la pubertad ni en la vejez, es posible que la diferencia refleje el efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la hormona estimulante de la producción de glóbulos rojos denominada eritropoyetina. La altitud sobre el nivel del mar marca diferencias. Las personas que viven en grandes altitudes presentan, en general recuentos de glóbulos rojos e índices de hemoglobina más altos que los residentes al nivel del mar.¹⁷ Miale y

Bloom advierten que cuanto es mayor la altitud, menor será la tensión de oxígeno, la disminución de oxígeno en los tejidos resultante estimula su producción. En la figura 2, se observa que el recuento de glóbulos rojos va aumentando de manera gradual a través del tiempo en cada una de los grupos o subpoblaciones estudiadas, excepto en el grupo de las jóvenes entre 13 y 18 años. Los valores en los niños del sexo masculino siempre fueron más altos comparados con el de las mujeres, de igual forma la variabilidad de los datos se mantiene constante en cada uno de los grupos; sin embargo, en las jóvenes de 13 a 18 años, el rango intercuartílico fue mayor, comparada con las demás.

Dado que los valores de las medianas obtenidas de hombres y mujeres en cada uno de los grupos etarios fueron muy similares, excepto en el grupo de los jóvenes de 13 a 18 años en el que se podría decir que no es necesario agrupar por sexo antes de los trece años para estimar los IBR de los glóbulos rojos.

Para Soldin et al., los IBR de los glóbulos rojos de los hombres entre 13 y 18 años, son de 3,74-4,93 x 10⁶/mm³ de sangre y para las mujeres de la misma edad 3,79-4,6 x 10⁶/mm³ de sangre. En la tabla 3 se describen los percentiles empíricos para los hombres de la misma edad, y corresponden al IBR 4,71-6,05 x 10⁶/mm³ y para las mujeres 4,23-5,4 x 10⁶/mm³, es decir, para ambas poblaciones los IBR son mayores. Las otras tres herramientas estadísticas tampoco estimaron intervalos parecidos a los reportados por dichos autores. Para las demás poblaciones la situación fue similar.

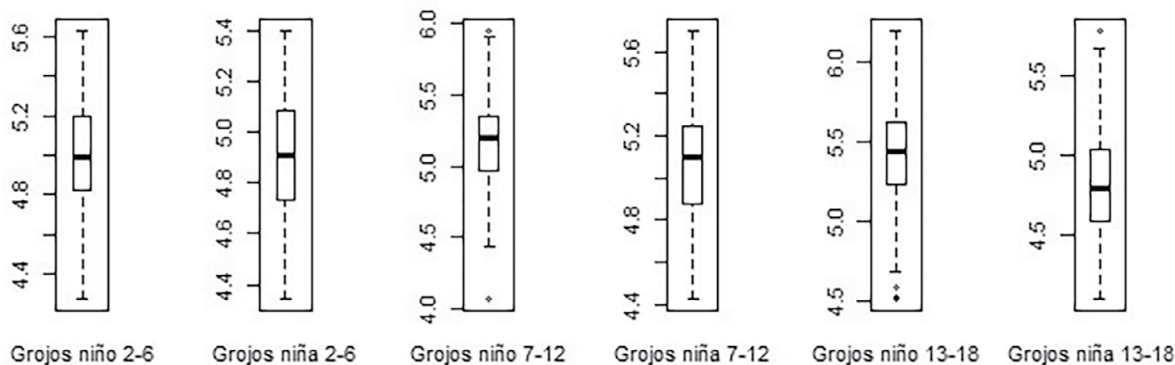


Figura 2. Diagrama de cajas y bigotes. Cantidad de Glóbulos rojos en niños y jóvenes de acuerdo a la clasificación propuesta por Soldin et al.¹³

SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina es el mejor parámetro para valorar los estados de anemia. En este estudio, los valores de hemoglobina presentan un patrón similar al reportado en los glóbulos rojos, esto tiene que ver, a que la hemoglobina se encuentra dentro de dichas células. Se observa similitud en la mediana de los niños (13,4 g/dL) y niñas (13,3 g/dL) de 2 a 6 años; en los niños de 7 a 12 esta situación es parecida, la mediana es 14,1 g/dL para ambos. Pero en los jóvenes de 13 a 18 años, si hay diferencia entre la mediana en la hemoglobina de hombres (15,7 g/dL) y mujeres (13,9 g/dL). El rango intercuartílico (entre 1,0 y 1,3 para toda la muestra) indica la poca variación que tiene la hemoglobina entre los individuos.

Los IBR de hemoglobina reportados por Soldin et al. en 5095 adolescentes entre 13 y 18 años fue

11-14,3 g/dL y en 5349 mujeres de la misma edad 11,3-13,4 g/dL. En la tabla 3, se muestran los IBR obtenidos en este estudio para las mismas poblaciones utilizando el percentil empírico con valores de 13,2-17,3 g/dL en hombres y 12,32-15,47 g/dL en mujeres; estos son IBR con límites mayores a los reportados por los autores de referencia. Si un resultado de hemoglobina de un hombre joven que consulte a este laboratorio, y que haya obtenido un valor cercano al límite superior, se comparara frente a los propuestos por Soldin et al. se correría el riesgo de interpretar a favor de enfermedades que cursan con incremento de la hemoglobina. Las otras tres herramientas estadísticas tampoco estimaron intervalos parecidos a los reportados por dichos autores. Para las demás poblaciones la situación es similar.

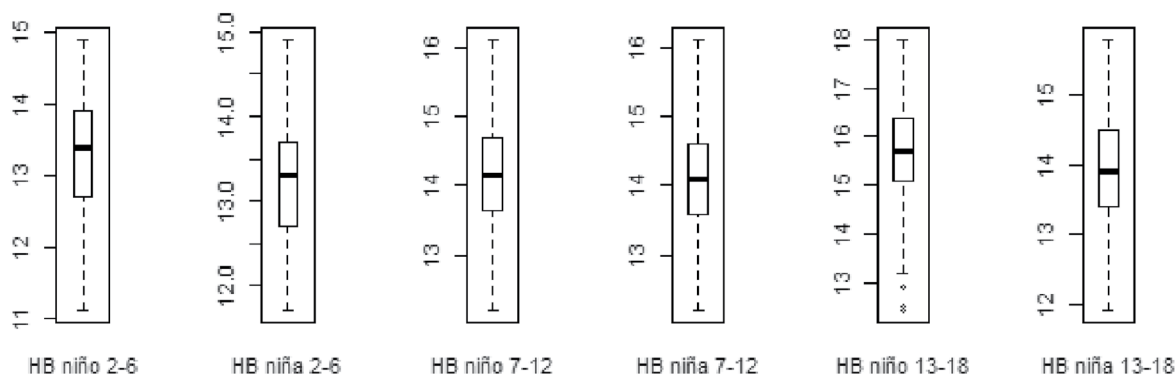


Figura 3. Diagrama de cajas y bigotes. Concentración de hemoglobina en niños y jóvenes entre 2 y 18 años, de acuerdo a la clasificación propuesta por Soldin et al.¹³

SOBRE LA CANTIDAD DE PLAQUETAS

Las plaquetas constituyen el elemento forme más pequeño de la sangre; su función principal es la de participar en la hemostasia primaria, ayudando a la formación del tapón hemostático deteniendo el sangrado. La cifra normal de plaquetas en sangre en un individuo adulto oscila entre $150-450 \times 10^9/L$ de sangre. En la figura 4 se observa similitud en los valores de los niños entre 2 y 12 años, y entre 13 y 18 años estos valores disminuyen. Se resalta el rango intercuartílico, en todos los grupos o subpoblaciones descritas, estos valores son considerablemente mucho más altos que los reportados para el conteo de leucocitos, glóbulos rojos, y concentración de hemoglobina en este estudio y muestran una variación interindividual muy

marcada, valores entre 75 y 98. Ricós et al. en 2011, reportaron un coeficiente variación entre individuos de 21,9%, lo que supone la alta variabilidad que tienen estos elementos formes en la sangre,¹⁵ lo que coincide con lo reportado en este estudio. Soldin et al., de igual forma reportaron conteos de plaquetas en 4163 niños entre 7 y 12 años de $227-350 \times 10^3/mm^3$ de sangre y en 3324 niñas de la misma edad entre $219-339 \times 10^3/mm^3$. En la tabla 2, los percentiles empíricos de las plaquetas para las mismas poblaciones muestran IBR entre $212,5-436 \times 10^3/mm^3$ en niños y $200,4-479 \times 10^3/mm^3$ en niñas. Las otras tres herramientas estadísticas tampoco estimaron intervalos parecidos a los reportados por dichos autores. Para los demás grupos poblacionales la situación fue similar.

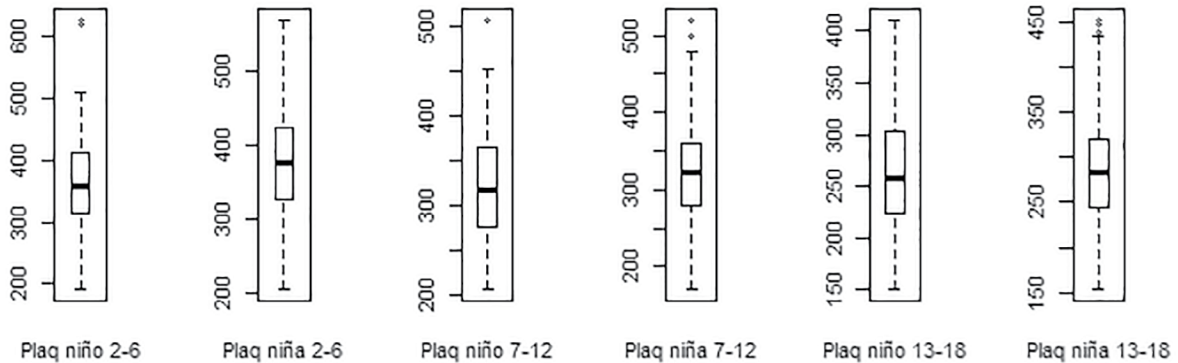


Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes. Cantidad de Plaquetas en niños y jóvenes entre 2 y 18 años, de acuerdo a la clasificación propuesta por Soldin et al.¹³

SOBRE LOS INTERVALOS BIOLÓGICOS DE REFERENCIA

En las tablas 1 a 3 se muestran los resultados de los cuantiles 2,5 y 97,5 de veinte parámetros del hemo-

grama en 842 niños y adolescentes, utilizando las herramientas estadísticas percentil empírico, Bootstrap, Harrell & Davis, y el estimador Robusto de Horn.

Tabla 1. Estimación de los intervalos de referencia del 95% para los leucocitos, globulos rojos, constantes corpusculares y plaquetas utilizando los métodos de percentil empírico, bootstrap, Harrell y Davis, y el estimador robusto de Horn, del hemograma de 76 niños y 64 niñas entre 2 y 6 años que asistieron al Laboratorio Docente, Asistencial e Investigativo de la Universidad de Antioquia entre 2015 y 2016

Parámetros hemograma /Unidades	n	76 individuos				64 individuos			
	Sexo	Masculino				Femenino			
	Edad	2 a 6 años				2 a 6 años			
	Cuantil	Percentiles empíricos	Harrell & Davis	Bootstrap	Estimador robusto de Horn	Percentiles empíricos	Harrell & Davis	Bootstrap	Estimador robusto de Horn
Leucocitos x 10 ³ /mm ³	2,5	5,059	5,002	4,790	3,920	4,200	4,365	4,000	2,090
	97,5	11,333	11,556	12,480	11,780	13,196	13,496	14,400	13,350
PNN abs x 10 ³ /mm ³	2,5	1,277	1,220	0,960	-0,091	1,295	1,125	0,640	-1,037
	97,5	6,507	6,567	7,180	6,371	8,369	8,147	8,470	7,697
PNN rel %	2,5	21,275	21,130	19,000	15,046	20,030	19,314	16,000	17,624
	97,5	70,258	69,604	72,300	66,954	67,180	66,920	68,000	67,276
Mono abs x 10 ³ /mm ³	2,5	0,100	0,108	0,100	-0,007	0,152	0,130	0,070	-0,253
	97,5	0,833	0,834	0,910	0,777	1,129	1,134	1,240	0,973
Mono rel %	2,5	1,425	1,388	1,000	1,049	2,000	1,704	1,000	0,164
	97,5	9,000	9,198	10,000	8,951	9,900	9,688	10,000	9,536
Lin abs x 10 ³ /mm ³	2,5	1,778	1,681	1,360	0,658	1,704	1,677	1,430	1,133
	97,5	6,582	6,584	7,110	6,162	5,773	6,022	6,630	5,827
Lin rel %	2,5	21,013	20,940	19,300	21,099	20,040	19,651	18,000	22,872
	97,5	65,390	65,372	67,000	68,901	66,600	65,972	67,700	67,328
PNB abs x 10 ³ /mm ³	2,5	0,000	0,001	0,000	-0,005	0,000	0,006	0,000	-0,019
	97,5	0,106	1,113	0,130	0,105	0,119	1,200	0,130	0,119
PNB rel %	2,5	0,000	0,021	0,000	-0,089	0,000	0,114	0,000	0,177
	97,5	1,058	1,312	2,000	1,289	1,000	1,040	1,100	1,223
PNE abs x 10 ³ /mm ³	2,5	0,020	0,019	0,000	-0,324	0,000	0,001	0,000	-0,339
	97,5	0,912	0,895	1,020	0,764	0,770	0,766	0,800	0,689
PNE rel %	2,5	0,200	0,240	0,000	-2,577	0,000	0,018	0,000	-2,136
	97,5	9,773	9,582	10,000	8,577	6,090	6,409	7,000	6,736
G. rojos x 10 ⁶ /mm ³	2,5	4,362	4,353	4,270	4,446	4,437	4,421	4,340	4,362
	97,5	5,527	5,541	5,630	5,544	5,388	5,385	5,400	5,458
HB g/dL	2,5	11,643	11,549	11,100	11,860	12,100	11,967	11,700	11,754
	97,5	14,858	14,839	14,900	14,940	14,700	14,751	14,900	14,846
Hto %	2,5	34,243	34,295	33,200	35,267	35,400	35,575	35,200	35,022
	97,5	42,673	42,750	43,100	43,133	43,560	43,641	44,100	43,978
ADE %	2,5	12,743	12,759	12,700	12,204	12,410	12,411	12,300	12,460
	97,5	15,400	15,470	15,800	15,396	14,490	14,532	14,700	14,540
MCV fL	2,5	69,583	69,545	67,600	70,095	74,530	73,006	70,100	73,721
	97,5	86,330	86,209	86,700	86,005	86,470	86,942	88,200	87,379
MCH pg	2,5	23,598	23,312	22,000	24,318	24,810	23,796	22,000	25,051
	97,5	29,000	29,004	29,100	29,282	29,490	29,598	30,000	29,349
MCHC g/dL	2,5	31,583	31,573	31,200	31,770	31,350	31,282	30,800	31,354
	97,5	36,415	36,418	36,600	36,430	35,870	35,787	35,900	35,846
Plaquetas x 10 ³ /mm ³	2,5	214,150	217,273	191,000	169,534	214,500	219,991	204,000	220,745
	97,5	573,250	577,580	625,000	547,466	553,700	546,888	567,000	531,255
MPV fL	2,5	6,543	6,429	6,100	6,278	6,420	6,437	6,300	5,990
	97,5	9,273	9,400	10,000	9,122	9,090	9,054	9,100	9,210

Tabla 2. Estimación de los intervalos de referencia del 95% para los leucocitos, glóbulos rojos, constantes corpusculares y plaquetas utilizando los métodos de percentil empírico, bootstrap, Harrell y Davis, y el estimador robusto de Horn del hemograma de 112 niños y 124 niñas entre 7 y 12 años que asistieron al Laboratorio Docente, Asistencial e Investigativo de la Universidad de Antioquia entre 2015 y 2016

Parámetros hemograma	n	112 individuos				124 individuos			
	Sexo	Masculino				Femenino			
	Edad	7 a 12 años				7 a 12 años			
	Cuantil	Percentiles empíricos	Harrell & Davis	Bootstrap	estimador robusto de Horn	Percentiles empíricos	Harrell & Davis	Bootstrap	estimador robusto de Horn
Leucocitos x 10 ³ /mm ³	2,5	4,224	4,279	4,111	2,259	4,382	4,349	4,185	1,976
	97,5	13,098	13,141	13,791	12,071	11,878	12,118	13,020	11,474
PNN abs x 10 ³ /mm ³	2,5	1,406	1,436	1,383	-0,608	1,362	1,359	1,290	-0,836
	97,5	7,532	7,935	9,081	7,058	7,748	7,514	7,860	6,936
PNN rel %	2,5	28,580	28,930	28,233	25,103	26,680	26,635	26,000	25,684
	97,5	67,000	67,566	70,295	65,697	66,560	66,711	68,278	66,616
Mono abs x 10 ³ /mm ³	2,5	0,170	0,165	0,144	0,061	0,138	0,138	0,110	0,047
	97,5	0,749	0,748	0,797	0,709	0,630	0,641	0,660	0,633
Mono rel %	2,5	3,120	3,069	2,775	1,573	2,600	2,438	2,000	2,601
	97,5	9,000	9,281	10,000	8,827	7,200	7,462	8,000	7,399
Lin abs x 10 ³ /mm ³	2,5	1,645	1,610	1,496	1,099	1,722	1,713	1,673	1,092
	97,5	5,053	4,967	5,213	4,631	4,504	4,491	4,600	4,388
Lin rel %	2,5	20,210	20,235	18,550	24,717	23,920	23,639	21,000	24,012
	97,5	54,480	55,219	57,468	56,683	60,400	60,773	62,758	59,288
PNB abs x 10 ³ /mm ³	2,5	0,000	0,002	0,000	-0,022	0,000	0,001	0,000	-0,001
	97,5	0,140	0,141	0,150	0,122	0,098	0,108	0,130	0,101
PNB rel %	2,5	0,000	0,043	0,000	-0,253	0,000	0,020	0,000	0,062
	97,5	1,670	1,606	1,700	1,453	1,300	1,395	1,578	1,338
PNE abs x 10 ³ /mm ³	2,5	0,046	0,046	0,030	-0,373	0,048	0,040	0,021	-0,298
	97,5	0,898	0,921	1,007	0,913	0,766	0,754	0,799	0,698
PNE rel %	2,5	0,800	0,708	0,478	-2,093	0,540	0,493	0,300	-3,695
	97,5	9,370	9,371	9,523	10,393	9,580	9,585	9,978	9,695
G. rojos x 10 ⁶ /mm ³	2,5	4,469	4,450	4,347	4,707	4,502	4,513	4,451	4,624
	97,5	5,667	5,745	5,910	5,693	5,572	5,589	5,650	5,576
HB g/dL	2,5	12,390	12,421	12,200	12,640	12,620	12,570	12,400	12,374
	97,5	15,500	15,633	15,800	15,660	15,840	15,856	15,993	15,826
Hto %	2,5	36,140	36,198	35,578	37,201	37,760	37,752	37,600	36,015
	97,5	45,540	45,510	45,702	45,599	46,260	46,344	46,900	46,285
ADE %	2,5	12,400	12,311	12,100	12,399	12,220	12,176	12,000	11,833
	97,5	14,200	14,209	14,290	14,201	14,280	14,351	14,600	14,167
MCV fL	2,5	73,160	73,219	72,900	72,833	75,960	75,604	74,500	75,220
	97,5	87,910	88,061	89,043	87,067	87,860	88,371	89,400	88,380
MCH pg	2,5	24,950	24,993	24,778	25,451	25,460	25,373	25,100	25,787
	97,5	29,470	29,674	30,225	29,549	29,940	29,977	30,100	30,013
MCHC g/dL	2,5	32,660	32,594	32,375	32,680	32,360	32,236	31,800	32,158
	97,5	35,870	35,955	36,158	35,920	35,680	35,716	35,800	35,842
Plaquetas x 10 ³ /mm ³	2,5	212,500	214,167	206,775	186,230	200,400	195,305	180,000	176,297
	97,5	436,900	444,309	463,375	447,770	479,000	482,747	499,000	469,703
MPV %	2,5	6,500	6,449	6,300	6,480	6,460	6,333	6,000	6,120
	97,5	8,400	8,497	8,723	8,420	8,740	8,837	9,200	8,680

Tabla 3. Estimación de los intervalos de referencia del 95% para los leucocitos, glóbulos rojos, constantes corpusculares y plaquetas utilizando los métodos de percentil empírico, bootstrap, Harrell y Davis, y el estimador robusto de Horn del hemograma de 199 niños y 267 niñas entre 13 y 18 años que asistieron al Laboratorio Docente, Asistencial e Investigativo de la Universidad de Antioquia entre 2015 y 2016

Parámetros hemograma/ Unidades	n		199 individuos				267 individuos			
	Sexo		Masculino				Femenino			
	Edad		13 a 18 años				13 a 18 años			
	Cuantil	Percentiles empíricos	Harrell y Davis	Bootstrap	estimador robusto de Horn	Percentiles empíricos	Harrell y Davis	Bootstrap	estimador robusto de Horn	
Leucocitos $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	4,404	4,424	4,310	2,189	4,512	4,515	4,340	2,675	
	97,5	11,381	11,505	12,330	10,931	11,400	11,487	11,900	11,405	
PNN abs $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	1,884	1,829	1,620	0,011	1,895	1,843	1,560	0,552	
	97,5	6,824	7,014	7,840	6,429	7,330	7,216	7,490	7,068	
PNN rel %	2,5	31,895	31,431	29,000	35,388	36,175	36,191	35,000	39,411	
	97,5	65,905	66,016	67,100	66,412	68,248	68,506	70,000	6,939	
Mono abs $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	0,220	0,218	0,200	0,011	0,200	0,201	0,183	0,082	
	97,5	0,886	0,868	0,920	0,789	0,717	0,731	0,784	0,698	
Mono rel %	2,5	4,000	3,952	3,700	2,732	3,518	3,487	3,400	2,526	
	97,5	9,905	10,023	11,000	9,468	8,300	8,374	8,800	8,274	
Lin abs $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	1,344	1,317	1,110	0,599	1,462	1,460	1,380	0,865	
	97,5	4,062	4,139	4,600	4,081	3,938	3,986	4,220	3,895	
Lin rel %	2,5	23,228	22,518	20,705	18,242	21,288	21,193	20,030	17,022	
	97,5	53,578	53,808	56,000	53,158	50,613	50,543	52,000	50,578	
PNB abs $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	0,000	0,002	0,000	-0,025	0,000	0,002	0,000	-0,018	
	97,5	0,115	0,112	0,120	0,105	0,100	0,103	0,120	0,098	
PNB rel %	2,5	0,000	0,046	0,000	-0,004	0,000	0,023	0,000	-0,295	
	97,5	1,500	1,535	1,700	1,404	1,300	1,322	1,435	1,295	
PNE abs $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	0,050	0,048	0,040	-0,138	0,050	0,049	0,047	-0,305	
	97,5	0,571	0,592	0,710	0,538	0,730	0,744	0,820	0,685	
PNE rel %	2,5	0,695	0,678	0,490	-1,505	0,700	0,639	0,500	-3,423	
	97,5	7,953	7,841	8,200	7,305	9,000	8,865	9,500	8,623	
G. rojos $\times 10^6 \text{mm}^3$	2,5	4,710	4,709	4,590	4,819	4,232	4,231	4,210	4,127	
	97,5	6,051	6,067	6,140	6,061	5,400	5,434	5,544	5,473	
HB g/dL	2,5	13,248	13,213	12,900	13,988	12,318	12,315	12,200	12,357	
	97,5	17,353	17,363	17,500	17,412	15,465	15,396	15,500	15,443	
Hto %	2,5	39,248	39,118	38,600	41,233	36,718	36,695	36,400	36,846	
	97,5	50,758	50,787	51,300	50,767	45,383	45,330	45,600	45,354	
ADE %	2,5	12,200	12,170	12,100	11,571	12,018	12,042	11,900	11,481	
	97,5	15,200	15,006	15,300	14,629	15,030	15,009	15,470	14,719	
MCV fL	2,5	74,348	74,136	72,800	75,901	77,700	77,236	75,900	76,861	
	97,5	93,053	92,973	93,300	92,499	93,500	94,004	95,515	93,539	
MCH pg	2,5	24,695	24,756	24,300	26,358	25,300	25,369	24,800	25,937	
	97,5	31,453	31,517	31,800	31,442	31,900	31,927	32,100	31,863	
MCHC g/dL	2,5	32,600	32,563	32,400	32,430	32,100	32,088	31,800	31,701	
	97,5	36,000	35,998	36,100	35,970	35,783	35,798	35,870	35,899	
Plaquetas $\times 10^3 \text{mm}^3$	2,5	171,900	169,048	157,000	125,894	184,000	183,435	182,000	162,161	
	97,5	393,675	393,341	399,000	388,106	403,950	408,545	434,000	403,839	
MPV %	2,5	6,400	6,377	6,200	6,059	6,700	6,642	6,530	5,855	
	97,5	9,000	9,006	9,115	8,941	9,383	9,564	10,400	9,345	

SOBRE EL TAMAÑO DE LA MUESTRA Y LOS MÉTODOS UTILIZADOS

En muchas ocasiones se debe clasificar la población de referencia por edad y sexo, esto aumenta el número de la muestra requerida para obtener los intervalos, por ejemplo, si se requiere determinar los cuantiles 2,5 y 97,5 con una confianza de 95% y 4 grupos de edad, se requieren 960 individuos extraídos de la población de referencia hemodinámicamente “sanos”. Todo esto lleva cargas logísticas y de recursos que deben considerar los laboratorios clínicos.

Reed, Henry y Mason y el grupo de expertos del Comité Científico, de la sección Clínica del Panel de Expertos en los Valores de Referencia Teóricos (Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Referente Value [EPTRV]) recomiendan utilizar 120 sujetos como mínimo para estimar intervalos de referencia confiables con estimadores no paramétricos.¹⁸ Por su parte, Linnet (1987) propone que se obtengan hasta 700 sujetos para distribuciones altamente sesgadas.¹⁹ Este estudio cumplió lo establecido por el comité de expertos solo en la estimación de los IBR de las niñas entre 7 y 18 años y en los adolescentes entre 13 y 18 años. Sin embargo, dicho comité recomienda que en caso de no tener la población requerida se usen métodos no paramétricos reportando los percentiles apropiados al número de valores obtenidos. Como alternativa a estas situaciones recomiendan usar métodos robustos como el que utilizó este estudio, donde no se requiere un número mínimo específico de observaciones requeridas.²⁰ El inconveniente de utilizar menos observaciones es la incertidumbre estadística para los tamaños de muestras más pequeños, lo que se traduce en intervalos de confianza más amplios; en este estudio el estimador robusto de Horn estimó intervalos más amplios que el estimador de Harrell & Davis y el percentil empírico en la mayoría de los casos, además, el límite inferior calculado se alejó mucho más del valor de la mediana que en los otros estimadores.

Utilizando el método bootstrap, que utiliza un método de remuestreo con reemplazo, se obtiene un nuevo número de “*n*” observaciones, permitiendo así que algunas de estas aparezcan varias veces, mientras que otras pueden no aparecer en absoluto, este proceso se repite un gran número de veces, y esta información queda disponible para estimar intervalos de referencia por los métodos anteriormente descritos

como el percentil empírico.^{21,22} Este estimador también arrojó intervalos muy amplios como el estimador robusto de Horn, aunque el límite inferior estuvo más cercano a la mediana que el robusto. Cabe resaltar que el método Bootstrap produjo el límite superior más alto en todos los casos, comparado con los otros tres métodos evaluados. Guzmán recomienda utilizar este método en poblaciones con poco sesgo aún con bajos tamaños de muestra.¹⁰ Es importante mencionar que todas las distribuciones analizadas eran asimétricas.

El estimador de Harrell y Davis, tuvo un comportamiento similar al percentil empírico; Guzmán advierte que en muestras pequeñas y poblaciones muy sesgadas es recomendable usar este método combinado con el estimador robusto de Horn, dado que en la evaluación de su comportamiento, en las colas de algunas distribuciones, tiene un mejor desempeño comparado con los otros estimadores.^{10,23}

Con relación a la identificación de valores extremos, la metodología propuesta por Dixon no fue tan eficiente, al comparar con la observación de los diagramas de cajas y bigotes, donde cualquier punto por fuera de los límites se considera atípico.¹² Sin embargo, el análisis clínico que se hizo de todos los valores extremos le da validez a su inclusión, dado que correspondieron a valores de sujetos que al momento de la consulta no presentaron patologías importantes.

En este estudio se utilizaron las clasificaciones recomendadas por Soldin et al., para estimar intervalos de referencia apropiados; sin embargo, se observó que las clasificaciones por sexo de los niños, especialmente en los menores de 13 años no son necesarias, como se observó en el análisis exploratorio de los parámetros de glóbulos rojos, hemoglobina y plaquetas. Unir dichas poblaciones haría disponer de más observaciones para la estimación de los intervalos de referencia. Por lo tanto, antes de realizar el muestreo real de los sujetos de referencia, debería considerarse la posibilidad de intervalos de referencia de subclase o clasificación con respecto a los componentes biológicos afectados por el sexo, la edad u otra condición.

CONCLUSIONES

La selección de los individuos de referencia debe ser reflexiva, teniendo en cuenta previamente los criterios

de exclusión y clasificación, dado que, de esto dependerá la determinación de patologías o anomalías en la población de pacientes; para esto la evaluación del estado de salud de las personas de referencia debe documentarse y describirse como parte del estudio. Se recomienda un enfoque riguroso y sistemático para determinar cuándo son necesarios intervalos de referencia particionados o estratificados. Cuanto más se definen y describen los individuos de referencia, mayor será el valor de los estudios de este tipo. De igual forma, todos los procesos preanalíticos y analíticos relacionados con la medición de valores de referencia deben ser cuidadosamente considerados y controlados. Es esencial que estos factores sean tratados de la misma manera para los individuos de referencia que para la población de pacientes sometidos a prueba.

Los datos de laboratorio existentes pueden utilizarse para establecer Intervalos de referencia siempre y cuando se indague el estado de salud de la población estudiada, para esto se pueden utilizar métodos estadísticos que ayudan a determinar valores atípicos.^{24,25} Una ventaja de este enfoque es la capacidad de acumular un gran número de individuos para cada clasificación por edad y sexo.

Con el fin de tomar la mejor decisión acerca del método estadístico a utilizar para estimar los IBR, se debería utilizar, una vez recolectados los datos, herramientas básicas como el histograma de frecuencia, el diagrama de cajas y bigotes y los coeficientes de asimetría y curtosis.

El percentil empírico resulta ser un método sencillo y confiable cuando se utiliza un tamaño adecuado de observaciones, por lo menos 120. Más importante aún, este método no requiere ninguna suposición específica acerca de la forma matemática de la distribución de probabilidad de la población estudiada.

Dada las limitaciones en la captura de la muestra de los individuos que participan en este tipo de estudios, se recomienda indagar la posibilidad de utilizar estudios multicéntricos que permitan la agrupación de datos de múltiples sitios. Al asegurar la comparabilidad de los métodos analíticos y adherirse a estrictos criterios de selección, las únicas razones que excluyen la puesta en común de datos podrían estar relacionadas con diferencias de población, como la raza y la región geográfica. En la actualidad los principales estudios en intervalos de referencia se basan en las

recomendaciones propuestas en los seis documentos descritos y en la guía CLSI EP28-A3c de 2010. Se destacan los estudios realizados por un equipo canadiense de investigadores que se reunieron para dirigir la creación de una base de datos confiable en todo el país con el fin de establecer datos de valores de referencia de laboratorio clínico que beneficien a todos los laboratorios clínicos canadienses y mundiales que atienden población pediátrica. Esta iniciativa nacional de investigación, trabaja bajo el nombre de Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference interval [Base de datos CALIPER].^{26,29}

Como conclusión general se pudo observar que los métodos Bootstrap y estimador robusto de Horn, producen intervalos más amplios que el estimador de Harrell & Davis y el percentil empírico. Es de anotar que ninguna de las poblaciones evaluadas según la clasificación es simétrica, lo cual explica el comportamiento de alguno de los métodos evaluados.

Estos resultados confirman la necesidad de que cada laboratorio estime sus propios intervalos biológicos de referencia utilizando protocolos estandarizados.

REFERENCIAS

1. **Standardization of Medical Laboratories.** Requirements for Quality and Competence. Ginebra: ISO; 2012.
2. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Defining Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Aproved. Guideline. 3ª ed. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards institute; 2010.
3. **Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al.** Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem.* 2012;58(5):854-868. doi:10.1373/clinchem.2011.177741
4. **Jaeger BA, Tauer JT, Ulmer A, Kuhlisch E, Roth HJ, & Suttorp M.** Changes in bone metabolic parameters in children with chronic myeloid leukemia on imatinib treatment. *Med Sci Monit.* 2012;18(12):CR721-728.
5. **Kelishadi R, Marateb HR, Mansourian M, Ardalan G, Heshmat R, Adeli K.** Pediatric-specific reference intervals in a nationally representative sample of Iranian children and adolescents: the CASPIAN-III

- study. *World J Pediatr.* 2016;12(3):335-342. doi:10.1007/s12519-015-0065-8.
6. **Wyness SP, Roberts WL, Straseski JA.** Pediatric reference intervals for four serum bone markers using two automated immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2012;415:169-172. doi:10.1016/j.cca.2012.10.036
 7. **Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux S.** Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood .Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2008.
 8. **Hoffmann RG, Waid ME.** The "Average of Normals" Method of Quality Control. *Am J Clin Pathol.* 1965;43:134-141.
 9. **Horn PS, Pesce AJ.** Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta.* 2003;334(1-2):5-23.
 10. **Guzmán PA.** Evaluación del Bootstrap para la estimación de percentiles extremos. Aplicación en intervalos de referencia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
 11. **Ledesma R.** Introducción al Bootstrap. Desarrollo de un ejemplo acompañado de un software de aplicación. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology.* 2008;4(2):51-60.
 12. **Dixon W.** Processing data for outliers. *Biometrics.* 1953; 9:74-89.
 13. **Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC.** Pediatric Reference Ranges. Washington: AACC Press; 2003.
 14. **Bull BS, Fujimoto K, Houwen B, Klee G, van Hove L, van Assendelft OW, et al.** International Council for Standardization in Haematology [ICSH] recommendations for "surrogate reference" method for the packed cell volume. *Lab Hematol.* 2003;9(1):1-9.
 15. **Ricós C, Ramón F, Salas A, Buño A, Calafell R, Morancho J, et al.** Minimum analytical quality specifications of inter-laboratory comparisons: agreement among Spanish EQAP organizers. *Clin Chem Lab Med.* 2011;50(3):455-461. doi:10.1515/CCLM.2011.787
 16. **Miale TD & Bloom GE.** The significance of lymphocytosis in congenital hypoplastic anemia. *J Pediatr.* 1975;87(4):550-553.
 17. **Vázquez-García JC, Pérez-Padilla R, Casas A, Schönfeldt-Guerrero P, Pereira, J, Vargas-Domínguez C, et al.** Reference Values for the Diffusing Capacity Determined by the Single-Breath Technique at Different Altitudes: the Latin American Single-Breath Diffusing Capacity Reference Project. *Respir Care.* 2016;61(9):1217-1223. doi:10.4187/respcare.04590
 18. **Reed AH, Henry RJ, Mason WB.** Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem.* 1971;17(4):275-284.
 19. **Linnet K.** Comparison of quantitative diagnostic tests: type I error, power and sample size. *Stat Med.* 1987;6(2):147-158.
 20. **Horn PS, Pesce AJ, Copeland BE.** A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem.* 1988;44(3):622-631.
 21. **Linnet K.** Nonparametric estimation of reference intervals by simple and bootstrap-based procedures. *Clin Chem.* 2000;46(6 Pt 1):867-869.
 22. **Linnet K.** Estimation of the limit of detection with a bootstrap-derived standard error by a partly non-parametric approach. Application to HPLC drug assays. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(4):394-399. doi:10.1515/CCLM.2005.071
 23. **Harrell FE, Davis CE.** A new distribution-free quantile estimator. *Biometrika.* 1982;69(3):635-640. doi:10.1093/biomet/69.3.635
 24. **Bock BJ, Dolan CT, Miller GC, Fitter WF, Harsell BD, Crowson N, et al.** The data warehouse as a foundation for population-based reference intervals. *Am J Clin Pathol.* 2003;120:662-70.
 25. **Shine B.** Use of routine clinical laboratory data to define reference intervals. *Ann Clin Biochem.* 2008;45:467-75.
 26. **Abou El Hassan M, Stoianov A, Araújo PA, Sadeghieh T, Chan MK, Chen Y, et al.** CLSI-based transference of CALIPER pediatric reference intervals to Beckman Coulter AU biochemical assays. *Clin Biochem.* 2015;48(16-17):1151-1159. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.05.002
 27. **Araújo PA, Thomas D, Sadeghieh T, Bevilacqua V, Chan MK, Chen, Y, Adeli K, et al.** CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals to Beckman Coulter DxC biochemical assays. *Clin Biochem.* 2015;48(13-14):870-880. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.06.002
 28. **Higgins V, Chan MK, Nieuwesteeg M, Hoffman BR, Bromberg IL, Gornall D, et al.** Transference of CALIPER pediatric reference intervals to biochemical assays on the Roche cobas 6000 and the Roche Modular P. *Clin Biochem.* 2016;49(1-2):139-149. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.08.018
 29. **Jung B, Adeli K.** Clinical laboratory reference intervals in pediatrics: the CALIPER initiative. *Clin Biochem.* 2009;42(16-17):1589-1595. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.06.025