

Intervalos de referencia en pediatría. Una guía de sus formas de cálculo ordenadas según su fortaleza metodológica

► Eduardo Adrián Chaler

Bioquímico. Consultor Honorario del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Combate de los Pozos 1881, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: echaler@yahoo.com

Resumen

El objetivo de esta comunicación es proponer una guía de las formas de cálculo de los intervalos de referencia (IR) en la población pediátrica ordenándolas según su fortaleza metodológica. En primer lugar, el proceso recomendado para definir un IR es el enfoque "directo", en el que se evalúan muestras de sujetos considerados sanos. En segundo lugar, la convocatoria "indirecta", en la que a los resultados de las muestras de una base de datos, se aplican criterios de exclusión y procesamientos estadísticos (métodos de Hoffmann y de Bhattacharya). Estos IR presentan poca diferencia con los obtenidos por datos directos y se pueden considerar equivalentes, con la ventaja de su facilidad y sus costos más bajos. En tercer lugar, están los IR obtenidos de la bibliografía. La validación de los datos informados por el fabricante es la última opción a tener en cuenta. Se reafirma la importancia de contar con IR adecuados por sus aspectos clínicos y por la seguridad de los pacientes.

Palabras clave: Intervalos de referencia; Pediatría; Método de Hoffmann; Método de Bhattacharya

Pediatrics reference intervals. A guide of its calculation forms ordered according to their methodological strength

Abstract

The aim of this communication is to propose a guide on the ways of calculating reference intervals (RI) in the pediatric population, ordering them according to their methodological strength. First, the recommended process to define an RI is the "direct" approach, in which samples of subjects considered healthy are evaluated. Secondly, the "indirect" approach, in which exclusion criteria and statistical processing are applied to the results of the samples in a database (Hoffmann and Bhattacharya methods). These RIs show little differences with those obtained by direct data and they can be considered equivalent, with the advantage of their ease and with lower costs. Thirdly, there are RIs that can be obtained from the bibliography. The validation of the data reported by the manufacturer is the last option to consider. The importance of having adequate RIs for their clinical aspects and for the safety of patients is reaffirmed.

Keywords: Reference intervals; Pediatrics; Hoffmann method; Bhattacharya method

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Intervalos de referência em pediatria. Uma orientação de suas formas de cálculo ordenadas de acordo com sua força metodológica

Resumo

O objetivo desta comunicação é propor um guia sobre as formas de cálculo dos intervalos de referência (IR) na população pediátrica, ordenando os mesmos de acordo com sua fortaleza metodológica. Em primeiro lugar, o processo recomendado para definir um IR é a abordagem “direta”, na qual são avaliadas amostras de indivíduos considerados saudáveis. Em segundo lugar, a abordagem “indireta”, na qual critérios de exclusão e processamento estatístico (métodos de Hoffmann e Bhattacharya) são aplicados aos resultados das amostras em um banco de dados. Esses IR apresentam pouca diferença com os obtidos por dados diretos, podendo ser considerados equivalentes, com a vantagem de apresentarem facilidade e menor custo. Em terceiro lugar, os IR obtidos da bibliografia. A validade dos dados informados pelo fabricante é a última opção a ser considerada. A importância de termos IR adequados pelos seus aspectos clínicos e pela segurança dos pacientes é reafirmada.

Palavras-chave: Intervalos de referência; Pediatria; Método de Hoffmann; Método de Bhattacharya

El *College of American Pathologists* (CAP) y la nota técnica EP28-A3c del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (1) señalan la responsabilidad de definir intervalos de referencia (IR) propios para cada laboratorio respecto a la población asistida. Diferencias debidas a la composición étnica, estilos de vida, dietas e inclusive factores geográficos como clima y ciclos de las estaciones pueden afectar los niveles de los diferentes analitos y sus IR (2).

La problemática de tener un IR adecuado para el asesoramiento del equipo médico en el diagnóstico y tratamiento de pacientes es frecuente; su ausencia dificulta la interpretación de los resultados obtenidos, por lo que el laboratorio clínico debe dedicar una parte importante de los esfuerzos a la estimación de estos intervalos.

Las poblaciones pediátricas presentan una dificultad extra por la limitación para obtener muestras de voluntarios y por requerir un examen clínico más detallado y dinámico para definir normalidad para cada edad y género (talla, velocidad de crecimiento, evolución del peso, desarrollo sexual, etc.).

La interpretación de los resultados de un *test* utilizando IR inapropiados puede someter innecesariamente a bebés y niños a que se les extraiga una cantidad mayor de sangre, riesgo de infección, dolor y ansiedad, estadías más prolongadas y procedimientos de diagnóstico desagradables o invasivos. Peor aún, podría potencialmente resultar en un diagnóstico incorrecto o retrasado que conduzca a un tratamiento inapropiado y dañino. Por lo tanto, determinar los intervalos de referencia específicos por edad y sexo no sólo es esencial para la detección, el diagnóstico y el seguimiento de muchos trastornos pediátricos, sino que es fundamental para garantizar la seguridad del paciente.

El modelo de gestión que impuso la tecnología (3) implica que el desarrollo de la mayor parte de los dise-

ños de ensayos del laboratorio clínico esté en manos de las corporaciones tecno-científicas de la industria, lo que conlleva cambios de métodos, cambio de estándares de referencia y cambios de equipamiento impuestos por estos diseños. Si bien esto produjo un avance notable en la robustez, reproducibilidad y estándares de calidad de los resultados, al mismo tiempo generó un reacomodamiento frente a cada modificación metodológica en la interpretación de los resultados obtenidos, muchas veces sin el tiempo suficiente para su correcta evaluación técnica.

El objetivo de esta comunicación es proponer una guía de las formas de cálculo de los intervalos de referencia (IR) en la población pediátrica, ordenándolas según su fortaleza metodológica, haciendo algunas consideraciones sobre la forma de abordar esta problemática en el laboratorio clínico pediátrico y analizando los diferentes caminos disponibles.

Consideraciones.

¿Qué es un intervalo de referencia? y otras cuestiones a tener en cuenta

El concepto de IR está bien establecido y se basa en incluir un porcentaje de una población de referencia dentro del intervalo descrito por los límites de referencia superior e inferior. La población de referencia generalmente se compone de un número estadísticamente significativo de sujetos [CLSI EP28-A3c indica 120 individuos (1)] predefinidos, libres de afecciones. Por lo tanto, un IR es el intervalo en el que se encuentra el 95% de los resultados de los individuos sanos de una población dada para un analito determinado. Esto representa el rango entre los percentiles 2,5 y 97,5 (4)

de los resultados obtenidos de un número estadísticamente significativo de esa población para cada grupo de edad (y de género en caso de ser necesario).

Se debe tener en cuenta para la interpretación clínica que un 5% de los resultados obtenidos que corresponden a la población sana pueden estar fuera del IR. La probabilidad que un resultado normal esté fuera del IR aumenta potencialmente cuanto más resultados se evalúen, siguiendo la fórmula $p=(0,95^n)*100$, donde p es la probabilidad porcentual, 0,95 se corresponde con el 95% de los resultados dentro del IR y n es el número de analitos a evaluar (para doce analitos existe casi un 50% de probabilidad estadística que uno de ellos esté fuera del IR y no ser patológico).

Cabe destacar que los IR no deben confundirse con los límites de decisión clínica que se determinan principalmente mediante la evaluación de los resultados de los pacientes o la respuesta a los cambios de manejo terapéutico. Además, se debe considerar que la incertidumbre del resultado afecta los resultados individuales de cada paciente y no a los IR.

Guía de trabajo

El número de publicaciones indexadas en *PubMed* sobre IR está en constante crecimiento, ya que pasó de 2447 [152 (6,2%) en pediatría] en 2010 a 4930 [503 (10,2%) en pediatría] en 2020 (datos tomados de *PubMed* con la búsqueda: *reference intervals y pediatric reference interval*).

Se pueden encontrar cuatro formas de resolución, todas aceptadas por la Norma ISO 15189, en orden a su fortaleza metodológica: 1. Resultados obtenidos de individuos sanos y procesar esos datos (datos directos). 2. Dar un procesamiento estadístico a grandes bases de datos (datos indirectos) 3. Referencias bibliográficas. 4. Validar el rango de referencia, provisto por el fabricante, contra individuos adultos sanos.

1. Búsqueda de individuos sanos. Datos directos

Reclutar un grupo válido es una tarea costosa, tiempo-intensiva, y con muchas dificultades para la mayoría de los laboratorios. En pediatría, obtener 120 muestras de individuos sanos para cada rango de edad y de género, es una tarea virtualmente imposible, salvo en programas oficiales.

Posiblemente, la iniciativa más reconocida en pediatría, es el *Canadian Laboratory Initiative on Paediatric Reference Intervals Database* (CALIPER). La *Canadian Society of Clinical Chemistry* encabeza una iniciativa de investigación a nivel nacional; es un proyecto colaborativo de hospitales de niños en todo Canadá, con el objetivo de llenar los vacíos en los IR pediátricos mediante el desarrollo y mantenimiento de una base de datos completa

de IR para pruebas de laboratorio, que abarcan todo el rango de edad pediátrica, desde el nacimiento hasta los 18 años por edad y por género, de los principales grupos étnicos.

Los IR pediátricos de CALIPER se determinan en varias plataformas de instrumentos diferentes, lo que da como resultado, IR específicos para cada instrumento. En una primera etapa se fijaron las pautas para reclutar voluntarios sanos pertenecientes a cada grupo de edad, en guarderías, hospitales, escuelas y familias. Se fijó la capacitación para los extraccionistas, y se estableció el procedimiento pre-analítico (5). Se instauraron los enfoques estadísticos para el análisis de datos estableciendo intervalos de referencia, que estarán de acuerdo con las directrices de CLSI sobre IR. Toda la información está en la página *web* de CALIPER (<https://caliperproject.ca>), y es de utilidad para chequear resultados la aplicación para teléfonos celulares disponible (CALIPER App para Android e iOS).

Es posible realizar evaluaciones sin contar con el mínimo de 120 individuos por grupo, pero por la dificultad para completarlos, son aceptados estudios con menos muestras por la comunidad científica. En algunos casos es posible realizar un estudio multicéntrico utilizando métodos analíticos que son metodológicamente trazables a un método de referencia.

Por ejemplo, el *insulin like growth factor 1* (IGF-1) que, fundamentalmente, es producido en el hígado y estimulado por la *growth hormone* (GH) sérica, está influenciado por el estado nutricional, las hormonas tiroideas y la integridad de todo el mecanismo de señalización celular de la GH; su medida es utilizada para evaluar desórdenes del crecimiento tal como la deficiencia o exceso de GH. La IGFBP-3 es útil para la evaluación diagnóstica de la baja talla en niños. Establecer un IR de estos analitos en niños es de suma importancia para instaurar o monitorear el tratamiento con GH, una terapéutica de altísimo costo personal para los pacientes y económico para el sistema de salud. La necesidad de establecer un IR y poder calcular el *Z-score* de los resultados obtenidos, llevó a la realización de un trabajo de datos directos. Reunir los 235 niños sanos (169 prepúberes: 57 niñas y 112 varones, y 66 púberes: 21 niñas y 45 varones) del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" de la ciudad de Buenos Aires (Argentina) y de la Unidad de Pediatría de la Fundación IRCCS San Matteo en Pavía (Italia), llevó más de dos años de trabajo a ambos equipos médicos, evaluando niños que presentaban desórdenes no-endocrinos (estrabismo, hernia inguinal, etc.), su estadio de Tanner del desarrollo sexual, evaluación del volumen testicular, talla e índice de masa corporal (IMC) y su estado de salud general. Los sueros fueron procesados de igual manera y por el mismo método en los dos centros de atención mencionados. Claramente, cuando se ordenaron por grupos etarios, el

número de pacientes fue escaso para algunos grupos, pero como se mencionó, por la importancia del IR de estas determinaciones, el trabajo fue aceptado y mientras el método no modificó su estándar de referencia, los *Z-score* de los resultados de estos análisis fueron calculados a partir de esta publicación en ambos países, incluso en decisiones oficiales (6).

2. Estadística de grandes bases de datos. Datos indirectos.

La alternativa es hacer una “convocatoria indirecta”, un estudio *a posteriori* de los datos de los pacientes, ya recogidos y almacenados en una base de datos de laboratorio. Las bases de datos de patología de rutina a menudo contienen muchos miles o millones de resultados de muchos cientos o miles de pacientes, que se pueden usar de esta manera. El uso de los datos con el objetivo de determinar los IR de la población mediante técnicas indirectas es un ejemplo de minería de datos (7). La mayoría de los estudios realizados por este método son informes de IR con relevancia clínica significativa. Se utilizan filtros para eliminar sujetos “no sanos”, con diferentes estrategias. (pacientes no institucionalizados, pacientes internados, etc.). La discusión es que la mayoría de los datos no provienen de sujetos sanos, pero es menos cuestionable cuando se considera el gran número de resultados y una prevalencia de no enfermedad para el analito en cuestión.

Los IR son útiles en función de su exactitud y reproducibilidad; estadísticamente es más robusto recolectar miles de resultados que pueden incluir algún sujeto no sano, que 120 niños de los que se asume su salud. En todos los casos es aconsejable aplicar la mayor parte de los criterios de exclusión disponibles teniendo en cuenta el analito a evaluar. La complejidad y los costos de una convocatoria indirecta son notablemente inferiores que los de una directa.

Si el objetivo es producir intervalos de referencia “relacionados con la salud”, entonces los resultados de los pacientes ambulatorios son claramente preferidos, en particular los de los que se encuentran en un entorno de atención primaria. La alta frecuencia de inflamación, decúbito, líquidos intravenosos, medicamentos y cambios en la dieta, además de las enfermedades que conducen al ingreso, hacen que las muestras de pacientes hospitalizados sean menos deseables. Respecto al número de resultados “más es mejor”, se debe considerar que, durante el período en el que se recolectan los datos, la metodología utilizada sea la misma. Antes de los análisis estadísticos los datos deben ser “bioquímicamente filtrados”, aplicando criterios de exclusión según los resultados de otros análisis vinculados al de nuestro análisis (8).

Los datos estadísticos paramétricos estándar (media y desviación estándar) o no paramétricos (percentiles),

como los que se utilizan en los estudios de intervalo de referencia directo, también se pueden utilizar para estudios indirectos. Esto implicará la eliminación de *outliers*, ya sea antes o después de la transformación, seguida del cálculo de la media y la DE o la mediana y los percentiles relevantes.

En un estudio de los IR para hormonas tiroideas realizado en 2012, se intentó dar una información completa para la interpretación de los resultados calculando, además de los IR, la incertidumbre de medida, y el valor de referencia de cambio para hormonas tiroideas y TSH. Se utilizaron los datos de hormonas tiroideas y TSH de 5 años de la base de datos del Hospital de Pediatría Garrahan; de los 29 901 resultados iniciales se eliminaron: todos los que tuvieran algún tipo de diagnóstico en su admisión o durante el seguimiento; sujetos con registros de resultados hormonales patológicos de enfermedades no tiroideas; sujetos con resultados de bioquímica clínica alterados y, en los que el dato estaba disponible, los que tuvieron anticuerpos anti-tiroideos positivos. Se eliminaron resultados *outliers* aplicando el rango intercuartílico, por lo que finalmente se dispuso de 7581 sujetos de los que el 53,87% fueron niñas, se agruparon por edades y se calcularon los percentiles 2,5 y 97,5 para cada hormona tiroidea y la TSH. Estos resultados fueron de suma utilidad en la evaluación de la patología tiroidea, la que representa un 50% de los resultados del laboratorio de endocrinología del hospital, ya que incluye la demanda de múltiples servicios médicos (9).

Una de las secuencias estadísticas más utilizadas es el método de Hoffmann (10), quien publicó un trabajo clásico en 1963, donde describió una técnica estadística para estimaciones indirectas que puede ser usada para obtener IR, donde un grupo de mediciones están disponibles y se asumen cálculos matemáticos razonables. La técnica de Hoffmann se desarrolló como un método para identificar un subconjunto poblacional, regulado homeostáticamente, de resultados de pruebas en un conjunto de datos que se supone que sigue una distribución gaussiana o casi gaussiana; una limitación del procedimiento de Hoffmann es que puede estar influenciado por la presencia de una población secundaria fuera de la normalidad, de tamaño significativo, aunque el filtrado de los datos puede reducir este efecto. El IR para fosfatasa alcalina sérica que se utiliza en el Hospital Garrahan está calculado por este método (11).

Los pasos del método de Hoffmann modificado por Katayev *et al.* (12) son: primero se ordenan los datos en función de su frecuencia de aparición, se grafica la concentración en función de la frecuencia de aparición, se estima la ecuación de la recta de la zona lineal considerando la que presente menos error y se calcula la concentración entre el 2,5% y el 97,5% de la frecuencia de aparición; el rango entre esas concentraciones es el IR.

El análisis de Bhattacharya (13) proviene de un trabajo de distribución de componentes gaussianos para ecosistemas de 1967, que se ha aplicado para IR. Es también un método gráfico para identificar una distribución gaussiana en medio de otros datos. Se basa en la descomposición de una distribución polimodal en diferentes distribuciones normales; al separar distribuciones superpuestas da una ventaja sobre el método de Hoffmann en este contexto. Se ha demostrado que el método de Bhattacharya está menos influenciado por los datos no incluidos en la distribución gaussiana en comparación con el de Hoffmann (14). Primero se deben ordenar los resultados y su frecuencia de distribución; se aplica \ln a las concentraciones; se grafica la concentración *vs.* la resta del \ln de una frecuencia con la precedente ($\Delta \ln$); los datos lineales representan la distintas poblaciones que permiten seleccionar la normal.

En ambos métodos se pueden normalizar los datos para distribuciones no gaussianas. Muchos trabajos muestran la utilidad clínica de los IR calculados por estas metodologías (15).

3. Referencias bibliográficas

Consiste en referir a intervalos de referencia publicados en revistas con referato y en lo posible que incluyan a la población asistida.

El libro de Soldin *et al.* (*Pediatric reference intervals*) (16) hace una recopilación de los IR de casi todos los análisis de interés clínico publicados en diferentes fuentes, por diferentes métodos y para diferentes poblaciones; es una importante fuente de información que se actualiza periódicamente.

4. Validación de los datos del fabricante

A partir de los intervalos de referencia propuestos por el fabricante para el grupo adulto se comparan éstos con 20 muestras de voluntarios; si no hay diferencia se asume que se puede utilizar para el resto de los grupos (pediátricos, geriátricos) que informa el fabricante.

Comparar métodos y calcular un factor, si fuera necesario, podría ser considerado dentro de esta forma de estimación de IR.

Conclusiones

El proceso recomendado para definir un IR es el llamado enfoque «directo», en el que se seleccionan y muestrean sujetos que representan la población de referencia y se analiza la muestra para este propósito. El documento de laboratorio de referencia que describe este proceso es el CLSI EP28-A3C (1), por lo que el tra-

bajo por medio de datos directos (si se cumplen todos los requisitos) sería el método óptimo para la obtención de un IR.

Un enfoque alternativo es el enfoque «indirecto» en el que los resultados de las muestras se recolectan con fines de rutina, o que se han recolectado con fines de detección, diagnóstico o seguimiento y se utilizan para determinar los IR. Una gran cantidad de publicaciones indican que presentan poca o ninguna diferencia con los obtenidos por medio de datos directos, por lo que podrían ser considerados equivalentes (8) (17) (18). Los métodos y procesos para la determinación de intervalos de referencia utilizando métodos indirectos se han desarrollado durante más de 50 años. Este enfoque no solo es un complemento útil de los métodos directos tradicionales, sino que también tiene una serie de beneficios y ventajas importantes. Estas ventajas incluyen basar los resultados en los procedimientos analíticos y preanalíticos en uso, la capacidad de abordar una amplia gama de poblaciones, especialmente la población atendida por el laboratorio y, lo que es más importante, la relativa facilidad y costos mucho más bajos. Los procesos deben realizarse con cuidado y teniendo en cuenta la fisiología, la patología y el uso de estadísticas adecuadas (Hoffmann, Bhattacharya). Es importante comprender que ningún IR es absolutamente exacto y que es solo una estimación que ha heredado incertidumbres y suposiciones que pueden ser ciertas o no. Quienes toman decisiones clínicas deben darse cuenta de que el resultado de la prueba no es un número absoluto, sino un rango determinado por una combinación de variaciones analíticas y biológicas.

Otro grupo es el de los IR obtenidos de la bibliografía, donde es posible evaluar el tipo de población, el número de individuos que utiliza para el cálculo, la metodología utilizada y el nivel de impacto de la publicación. En especial en laboratorios clínicos pequeños puede ser de gran utilidad.

La validación de los datos informados por el fabricante es la opción más débil de las mencionadas, y solo se recomienda su utilización cuando no haya otra disponible.

Concluyendo, se podrían proponer como guía según la fortaleza de la metodología utilizada, en primer lugar, los métodos que utilizan datos directos; casi en el mismo nivel estarían los obtenidos con datos indirectos correctamente procesados aplicando criterios de exclusión y un procesamiento estadístico adecuado; en tercer lugar, las referencias bibliográficas son útiles, en especial si existen publicaciones para la población asistida y finalmente, como último recurso, la validación de los IR informados por el fabricante (Tabla I).

Se reafirma la importancia de contar con IR adecuados por los aspectos clínicos y la seguridad de los pacientes.

Tabla 1. Formas de cálculo de intervalos de referencia ordenadas según su fortaleza metodológica

1. Datos directos
Muestras de individuos sanos
2. Datos indirectos. Resultados de bases de datos
Fijar criterios de exclusión
Filtros bioquímicos
Procesamiento estadístico (percentilado, métodos de Hoffmann o Bhattacharya)
3. Referencias bibliográficas
Libro de Soldin: <i>Pediatric reference intervals</i> (16)
Publicaciones científicas
4. Validación del IR del fabricante
Comparar 20 adultos voluntarios con el rango propuesto por el fabricante

Ordenamiento de las formas de cálculo de intervalos de referencia (IR) según su fortaleza metodológica estimada; en primer lugar, la búsqueda de individuos normales y su percentilado, y casi al mismo nivel, la convocatoria indirecta tomando resultados de base de datos y su posibilidad de aplicar criterios de exclusión para eliminar posibles resultados alterados, en tercer lugar la referencia bibliográfica, en lo posible para la población asistida y como último recurso la validación del rango propuesto por el fabricante.

Correspondencia

Dr. EDUARDO A. CHALER

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Combate de los Pozos 1881, C1245AAM Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina

Referencias bibliográficas

1. CLSI EP28-A3C. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory, 3rd ed. Clinical & Laboratory Standards Institute, 2010.
2. ISO15189:2012. Medical laboratories – requirements for quality and competence.
3. Carchio S, Villafañe S, Chaler EA. Modelo de gestión impuesto por la transformación tecnológica en los laboratorios de análisis clínicos. Impacto en el Hospital Garrahan a treinta años de historia. *Med Infant* 2017; 24: 257 - 61.
4. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Committee, Clinical Section Expert Panel on Theory of Reference Values and International Committee for Standardization in Haematology. Part 5. Statistical treatment on theory of reference value: determinations of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 645-56.
5. Jung B, Adeli K. Clinical laboratory reference intervals in pediatrics: The CALIPER initiative. *Clin Biochem* 2009; 42: 1589-95.
6. Chaler EA, Meazza C, Guercio G, Maceiras M, Rivarola MA, Laarej K, *et al.* Serum IGF-I and IGFBP-3 reference values from a chemiluminescent assay in normal children and adolescents of Hispanic and Italian origin: presence of sexual dimorphism in IGF-I values. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009 Dec; 22 (12): 1127-35.
7. Solberg HE. Using a hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clin Chem* 1994 Dec; 40 (12): 2205-6.
8. Jones GRD, Haecckel R, Loh TP, Sikaris K, Streichert T, Katayev A, *et al.* Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2018 Dec 19; 57 (1): 20-9.
9. Chaler EA, Fiorenzano R, Chillelli C, Llinares V, Areny G, Herzovich V, *et al.* Age-specific thyroid hormone and thyrotropin reference intervals for a pediatric and adolescent population. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50 (5): 885-90.
10. Hoffmann RG, Gainesville F. Statistics in the Practice of Medicine. *JAMA* 1963; 185 (11): 150-9.
11. D'Isa G, Chillelli C, Tau C, Viterbo G, Rubinstein M, Chaler EA. Estimación del intervalo de referencia de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina séricos en población pediátrica utilizando una base de datos por el método de Hoffmann modificado. *Med Infant* 2016; 23: 8-12.
12. Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results. Is there a better way? *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 180-6.
13. Bhattacharya E. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics* 1967; 23: 115-35.
14. Grindler ME. Calculation of normal ranges by methods used for resolution of overlapping Gaussian distributions. *Clin Chem* 1970; 16: 24-8.
15. Oosterhuis WP, Modderman TA, Pronk C. Reference values: Bhattacharya or the method proposed by the IFCC? *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 359-65.
16. Soldin SJ, Wong E, Brugnara C, Soldin OP. *Pediatric reference intervals*. 7th ed. Washington D.C, EE.UU: AACC Press, 2011.
17. Jones GR. Validating common reference intervals in routine laboratories. *Clin Chim Acta* 2014; 432: 119-21.
18. Loh TP, Metz MP. Indirect estimation of pediatric between-individual biological variation data for 22 common serum biochemistries. *Am J Clin Pathol* 2015; 143: 683-93.