

# Detección de hemoglobina humana en heces

**Palabras claves:** Sangre oculta, heces, cáncer colorrectal, hemoglobina, látex aglutinación.

**Key words:** Occult blood, faeces, colo-rectal cancer, hemoglobin, latex agglutination.

Recibido: 20/04/2011  
Aceptado: 17/06/2011

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/patologiaclinica>

Juan Alberto Pérez Carrasco,\* Mario Álvarez Marcer,\* Enrique Abraham Marcel,\*\* Isabel Giralдино Falero\*

\* Empresa de Producción de Biológicos «Carlos J. Finlay».

\*\* Ministerio de Salud Pública.

Correspondencia:

MSc. Juan Alberto Pérez Carrasco

Infanta No. 1162 esquina a Manglar, Centro Habana, La Habana, Cuba  
C.P. 10400

Tel: (537) 870-80-81 al 86 ext. 130, 131, 151

E-mail: jalberto@finlay.quimefa.cu; jalberto.carrasco1@gmail.com

## Resumen

La detección de la hemoglobina fecal es importante para el diagnóstico de pacientes en los cuales se sospecha sangramiento intestinal y es el único método práctico para la pesquisa del cáncer colorrectal en la población asintomática. La técnica de látex aglutinación en lámina basada en la reacción antígeno-anticuerpo para estos propósitos constituye una buena opción ya que resulta una metodología rápida, específica y de fácil ejecución, por lo que nos trazamos como objetivo el desarrollo de un reactivo capaz de realizar dicha función, el RapiLat-Hemo (partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos contra la hemoglobina humana [Hbh], y con límite de detección de 1 µg Hbh/mL). Se realizaron los estudios correspondientes a la funcionalidad y estabilidad del producto, así como la evaluación del desempeño en el Instituto Nacional de Gastroenterología de Cuba en 161 pacientes. El reactivo mostró una excelente concordancia (0.99) al compararla con el método de referencia SPIN-FOB de la firma comercial SPINREACT de España a través del índice kappa. El método se caracterizó por sensibilidad clínica de 100% y especificidad de 99.3%, con valores predictivos de 96% para el positivo y valor predictivo negativo de 100%. La precisión del ensayo fue caracterizada a través de la determinación de la zona gris con un valor de 0.6 µg/mL. El medio diagnóstico desarrollado cumplió con los requisitos establecidos para su registro y posterior comercialización, además constituye una metodología valiosa para el laboratorio clínico en la detección del cáncer colorrectal.

## Abstract

The detection of the fecal hemoglobin is important for the diagnosis of patients in which low intestinal bleeding is suspected and it is the only practical method for the screening of the colorectal cancer in the asymptomatic population. The technique of latex agglutination in slides based on the antigen-antibody reaction constitutes a good option since it is a quick, specific methodology and easy to perform for what we trace ourselves as objective the development of a reagent able to carry out this function RapiLat-Hemo (latex particles recovered with specific antibodies against Human Hemoglobin, Hbh, and with a detection limit of 1 µg Hbh/mL). They were carried out studies corresponding to the functionality, stability of the product as well as the evaluation of its behavior, in the National Institute of Gastroenterology of Cuba, in a sample of 161 patients. The reagent showed, an excellent agreement (0.99) when comparing it with the reference method SPIN-FOB through the index kappa. The method was characterized by a clinical sensibility of 100 % and a specificity of 99.3 %, with predictive values of 96 % for the positive one and a predictive negative value of 100 %. The precision of the test was characterized through the determination of the gray area with a value of 0.6 µg/mL. The diagnostic reagent developed fulfilled the established requirements for its sanitary registration and commercialization, also, it constitutes a valuable methodology for the clinical laboratory in the detection of the colo-rectal cancer.

## Introducción

**E**l cáncer colorrectal constituye un serio problema de salud en todo el mundo; su incidencia anual es aproximadamente de un millón de casos y decesos de más de 500 mil. Se estima que el número absoluto de casos aumentará en las próximas dos décadas a causa del envejecimiento y la expansión de las poblaciones.<sup>1</sup> Estudios masivos para detectar el cáncer en etapas tempranas pueden modificar el curso clínico de la enfermedad, lo que permitiría la aplicación de tratamientos más sencillos, menos costosos y más efectivos.

La presencia de hemoglobina en las heces constituye un marcador importante para el diagnóstico de esta patología; con este propósito se han desarrollado numerosas técnicas. Sin embargo, sólo las inmunoquímicas brindan la respuesta más confiable por no tener reacciones cruzadas con mioglobinas o hemoglobinas de origen animal y por no ser afectadas por la peroxidasa, el sulfato ferroso ni la vitamina C, además no se requiere de restricción dietética previa.<sup>2,3</sup>

De las técnicas inmunológicas, los reactivos de látex aglutinación en lámina se caracterizan por su simplicidad, especificidad, fácil ejecución y bajo costo. Teniendo en cuenta las características de las partículas de látex como soporte y las bondades de su uso para magnificar la reacción antígeno-anticuerpo, desarrollamos un juego de reactivos basado en esta tecnología. El propósito de este trabajo fue la evaluación de su efectividad para la detección rápida de sangre oculta en heces.

## Material y métodos

**Juego de reactivos RapiLat-Hemo.** *Reactivo 1:* suspensión de partículas de látex de poliestireno de 0.8 µm de diámetro a 1% recubiertas con anticuerpos policlonales contra la hemoglobina humana (Hbh) desarrollados en carneros. *Reactivo 2:* control positivo (50 µg de Hbh/mL en tampón Tris-HCl 60 mmol/L, pH 7.5 y albúmina humana

y azida sódica a 0.1 %). *Reactivo 3:* Tampón de extracción (3 mL) en frascos muestreadores.

**Toma de muestra.** Se desenroscó el tapón que está unido al muestreador del frasco. El extremo del muestreador se introdujo, de forma aleatoria, en puntos diferentes de la muestra. Se volvió a introducir el muestreador en el frasco y se cerró fuertemente. Se agitó el frasco de manera enérgica para mezclar la muestra y el tampón de extracción.

**Procedimiento.** 1) Se homogeneizó el reactivo 1. 2) Se comprobó la funcionalidad del reactivo 1 mediante el control positivo. 3) Se agitó el tubo de suspensión de la muestra para asegurar una buena dispersión y se rompió la punta superior. 4) Se dosificó una gota de la muestra en un círculo de la lámina para aglutinación. 5) Se añadió al lado una gota del látex anti-Hbh y se mezcló bien con la ayuda de un aplicador. 6) Se agitó en forma manual balanceando lentamente la lámina para aglutinación por no más de dos minutos. 7) Se observó a simple vista, bajo una buena iluminación y fondo negro.

**Interpretación de los resultados.** *Negativo:* Suspensión que se mantiene homogénea hasta el tiempo indicado en la técnica. *Positivo:* La presencia de aglutinación en el tiempo de análisis indicó un contenido de Hbh en la muestra.

**Evaluación del reactivo 1.** Se estudió su sensibilidad analítica y la precisión del ensayo con una curva de Hbh (estándar secundario 1 mg/mL) desde 1 mg/mL hasta 500 ng/mL y de forma similar se mezcló en una lámina. Se agitó manualmente la lámina en forma circular y se observó la presencia o ausencia de aglutinación en un tiempo de dos minutos. Los resultados se interpretaron de igual forma.

*Sensibilidad analítica:* Se enfrentó el reactivo elaborado con la curva del patrón de Hbh. Se consideró la misma como el valor de concentración más bajo de la curva que presentó aglutinación.

*Precisión del ensayo:* Este estudio se realizó al determinar puntos de corte y la zona gris.<sup>4</sup> Se evaluaron nueve concentraciones de Hbh (500, 125, 31.25, 7.8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 µg/mL) con 20

réplicas de cada concentración aleatoriamente, estableciendo 95% de positividad para el punto de corte positivo y 5% para punto de corte negativo.

**Evaluación del reactivo 2.** Se realizó el ensayo funcional enfrentando una gota del control positivo con una gota del reactivo de látex  $\alpha$ -Hbh. Debía producirse una aglutinación fuerte en menos de dos minutos. Para el estudio de la potencialidad, se prepararon diluciones de razón dos y se realizó el ensayo de aglutinación mezclando una gota de cada dilución del control frente a una gota de látex  $\alpha$ -Hbh. Debía presentar título  $\geq 1:8$ .

**Evaluación del desempeño del diagnóstico RapiLat-Hemo.** La evaluación comprendió los análisis de 161 muestras de heces procedentes del Instituto Nacional de Gastroenterología de Cuba, pertenecientes a individuos atendidos en la consulta de colon, los cuales tenían indicación de realizarse una colonoscopia. Los sujetos estuvieron de acuerdo en participar en el estudio y eran mayores de 18 años. Al realizar el estudio se excluyó a pacientes que presentaron patologías con afectación gastrointestinal.

Como se describió anteriormente, las muestras fueron procesadas con el reactivo RapiLat-Hemo. Se utilizó como método de referencia el kit inmunocromatográfico SPIN-FOB de la firma comercial SPINREACT (España) y se analizaron los resultados de las colonoscopias.

**Parámetros evaluados.** Los resultados fueron expresados en un cuadro de contingencia 2 x 2 para facilitar el cálculo de los parámetros de interés: índice de concordancia kappa, sensibilidad y especificidad clínica, valores predictivos y razones de probabilidad.

**Índice de concordancia kappa.** El coeficiente kappa fue determinado con el software estadístico Vassar Stats. Se valoró el grado en función del índice kappa según los márgenes propuestos por Landis y Koch.<sup>5</sup>

**Sensibilidad y especificidad clínica.** Valores predictivos: se calcularon los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) junto con la sensibilidad y especificidad clínica.<sup>6</sup>

**Razones de probabilidad.** Las razones de probabilidad fueron calculadas de acuerdo con los resultados de sensibilidad y especificidad.<sup>7</sup>

**Estudio de estabilidad.** Se estudió la estabilidad del juego por medio de la prueba funcional durante dos años.

## Resultados

### Evaluación del reactivo 1 (látex $\alpha$ -Hbh).

**Sensibilidad analítica:** la evaluación del reactivo de látex frente a la curva de calibración reveló rango de reactividad entre 500 - 1  $\mu\text{g/mL}$  y sensibilidad analítica de 1  $\mu\text{g/mL}$  (cuadro I).

**Precisión del ensayo:** los valores de los puntos de corte fueron de 1.3  $\mu\text{g/mL}$  para punto de corte positivo y 0.7  $\mu\text{g/mL}$  como punto de corte negativo, para una longitud de la zona gris de 0.6  $\mu\text{g/mL}$  (figura 1). El valor de discriminación encontrado fue 0.9.

### Evaluación del reactivo 2 (control positivo).

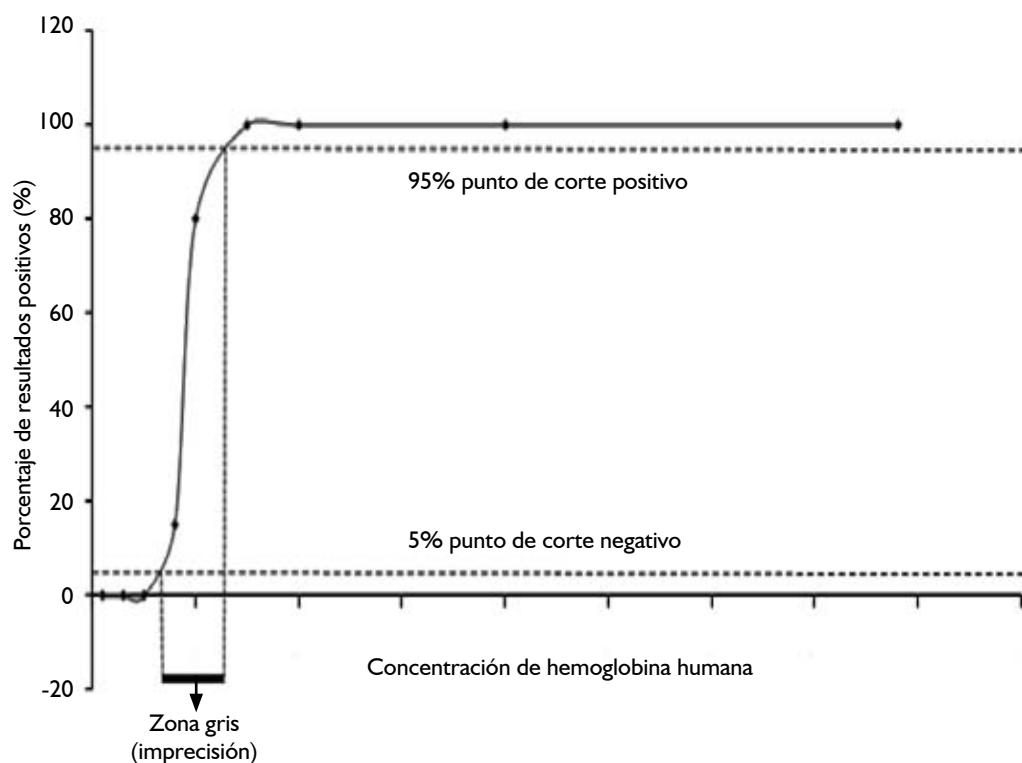
Se caracterizó por mostrar una franca aglutinación en un tiempo menor o igual a dos minutos. La potencialidad reportó un título de 1:64 (cuadro II).

### Evaluación del desempeño del reactivo RapiLat-Hemo.

Se observó que las muestras que resultaron positivas con el reactivo SPIN-FOB

**Cuadro I.** Evaluación del reactivo de látex anti-Hbh frente a la curva de calibración de hemoglobina humana (Hbh). Leyenda: (+) = aglutinación; (-) = no aglutinación.

|                | Hbh ( $\mu\text{g/mL}$ ) |     |     |     |      |       |      |     |   |   |   |     |
|----------------|--------------------------|-----|-----|-----|------|-------|------|-----|---|---|---|-----|
|                | 1,000                    | 500 | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 | 15.6 | 7.8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 |
| Latex anti-Hbh | -                        | +   | +   | +   | +    | +     | +    | +   | + | + | + | -   |



**Figura 1.** Curva de precisión. Porcentaje de resultados positivos contra concentración de hemoglobina humana (Hbh). Datos en Cuadro inferior para 20 réplicas por concentración. Porcentaje de positivos para los puntos de corte positivo y negativo (95% y 5%).

147

**Cuadro II.** Potencialidad del control positivo de hemoglobina humana (Hbh). Leyenda: (+) = aglutinación, (-) = no aglutinación.

|                | Diluciones del control positivo |     |     |      |      |      |       |       |
|----------------|---------------------------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
|                | 1:2                             | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |
| Latex anti-Hbh | +                               | +   | +   | +    | +    | +    | -     | -     |

correspondieron con las muestras positivas con el reactivo de látex. Entre las muestras evaluadas como negativas mediante el método de referencia encontramos una discrepancia que fue positiva al látex.

**Parámetros evaluados.** Los resultados del ensayo cualitativo realizado a las muestras fueron expresados en un cuadro de contingencia 2 x 2 (cuadro III).

El índice kappa determinado entre el reactivo RapiLat-Hemo y el kit SPIN-FOB correspondió a 0.99. La concordancia fue satisfactoria.<sup>8</sup>

La sensibilidad clínica fue de 100%. La presencia de un falso positivo representó 0.007% de error en la negatividad en los sanos según la cantidad de muestras estudiadas para 99.3% de especificidad, alcanzando valores predictivos positivos y negativos de 0.96 y 1.0, respectivamente (cuadro III). Debemos señalar que, al realizarle la colonoscopia, el caso falso positivo con látex presentó un lipoma de unión cecoascendente y pólipos de sigmoide de dos centímetros.

Se obtuvo un cociente de probabilidad positivo de 142.86.

**Cuadro III.** Cuadro de contingencia 2 x 2. Comparación cualitativa del reactivo RapiLat-Hemo con la prueba inmunocromatográfica SPIN-FOB de la firma comercial SPINREACT (España) para un tamaño de muestra n = 161.

|          |          | RapiLat-Hemo |          | Total |
|----------|----------|--------------|----------|-------|
|          |          | Positivo     | Negativo |       |
| SPIN-FOB | Positivo | 24           | 0        | 24    |
|          | Negativo | 1            | 136      | 137   |
|          | Total    | 25           | 136      | 161   |

**Correlación con la colonoscopia.** Al comparar los resultados entre el reactivo de látex y el kit SPIN-FOB con la colonoscopia, hubo 67 o 68 pacientes con alteraciones patológicas, respectivamente, a los cuales no se les detectó hemoglobina humana [Hbh] en la muestra fecal; correspondieron a pólipos menores de un centímetro, divertículos, ectasias vasculares, lesiones elevadas, una neoplasia de colón transverso y una neoplasia vegetativa del ciego. La mayoría de estas patologías no producen sangramiento.

**Estudio de estabilidad.** Los parámetros incluidos en los análisis de estabilidad cumplieron los índices de calidad requeridos durante el estudio de 24 meses. Este estudio permitió definir 18 meses como el tiempo de vida útil del juego de reactivos y tres meses para el reactivo en uso.

## Discusión

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se prevé que el número de defunciones anuales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en el 2030 y se plantea que es posible prevenir aproximadamente 30% de los casos de cáncer mediante la modificación o la prevención de los principales factores de riesgo,<sup>9</sup> por lo que los estudios poblacionales constituyen una de las armas fundamentales para el control y seguimiento de esta patología.

La industria del diagnóstico *in vitro* pone constantemente nuevos productos en el mercado para

estos propósitos, los cuales deberían ser, además de eficaces, de precios asequibles que permitan a los sistemas de salud abordar el problema a gran escala.

En Cuba, el cáncer constituye la segunda causa de mortalidad general y es la causa de mayor impacto en la esperanza de vida al nacer.<sup>10</sup> El carcinoma colorrectal representa 9.4 % de la carga de cáncer mundial;<sup>1</sup> en el año 2006, ocupó el quinto y tercer sitio en cuanto a incidencia y mortalidad, respectivamente, según cifras preliminares del Registro Nacional del Cáncer.<sup>9</sup>

La detección de la hemoglobina fecal es determinante para el diagnóstico de este tipo de cáncer. Sin embargo, para la realización de estudios en poblaciones supuestamente sanas se hace necesario que la determinación de este analito se base en una tecnología de fácil ejecución.

Las suspensiones de partículas de látex, por su propiedad de amplificar la reacción antígeno-anticuerpo, han servido de soporte para el desarrollo de diferentes metodologías diagnósticas que posibilitan la cuantificación con gran precisión (entre ellas la turbidimetría,<sup>11</sup> la nefelometría<sup>12-14</sup> y el conteo de partículas<sup>14</sup>), también brindan resultados cualitativos confiables en corto tiempo, sin requerir de equipamientos ni de personal especializado. Dentro de esta última modalidad se encuentran la inmunocromatografía y los reactivos de látex para la técnica de aglutinación en lámina, la cual también puede ser empleada para semicuantificar y, por sus ventajas, ha sido ampliamente utilizada por décadas en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades y en el pesquiasaje poblacional.<sup>15-18</sup>

Dadas las bondades de esta técnica y que nuestra empresa cuenta con una línea de diagnóstico rápido basado en esta metodología, nos propusimos el desarrollo de un reactivo de partículas de poliestireno para la detección de hemoglobina humana (Hbh) en heces. Fue necesario un análisis integral de las condiciones del diseño donde se consideraron las particularidades de los sistemas de látex-aglutinación, las características de la muestra

que sería objeto de estudio y los niveles a detectar del analito en cuestión.

Se definió el sistema de ensayo y el reactivo de látex anti-Hbh para la confección del juego RapiLat-Hemo, con la adición de un control positivo que permitió comprobar la funcionalidad del juego.

Uno de los aspectos determinantes en el desarrollo de un diagnosticador es la evaluación de sus características funcionales, la cual comprende todos los datos y resultados experimentales que demuestran su aptitud para el uso al que se destinan y constituye una práctica esencial dentro del laboratorio o de la empresa productora, con vistas a su registro y comercialización.

En el caso de nuestro reactivo de látex, no existe una relación entre la concentración y la intensidad de la reacción debido al efecto prozona que suscita una inhibición de la reacción a partir de altas concentraciones de Hbh, por lo que la linealidad no puede ser evaluada.

La sensibilidad analítica resultó ser 1 µg de Hbh/mL, lo que se corresponde con 50 µg de Hbh/g de heces, similar a lo declarado por los fabricantes de las tiras inmunocromatográficas utilizadas como referencia, pese a que la sensibilidad analítica es de 50 ng/Hbh/mL, la sensibilidad final en heces es la misma, lo cual nos indica que el procesamiento de la muestra jugó un papel fundamental en el diseño del reactivo.

Los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño mostraron una elevada correspondencia entre el diagnosticador de referencia y los resultados de la prueba de látex. Aunque la especificidad y sensibilidad clínica son estimaciones de la calidad intrínseca de una prueba que no está exenta de limitaciones, la sensibilidad, la especificidad clínica y los valores predictivos son los criterios más utilizados para valorar la capacidad diagnóstica de una prueba. Sin embargo, aun las mejores pruebas de referencias disponibles muchas veces no distinguen inequívocamente a los enfermos de los sanos.

La probabilidad de que exista o no la enfermedad si el resultado es positivo o negativo depende de la prevalencia de la enfermedad en el grupo estu-

diado. A medida que la prevalencia incrementa, el valor predictivo negativo disminuye y el valor predictivo positivo aumenta. En nuestro reactivo estos valores se comportaron satisfactoriamente, ya que no se trataba de una población supuestamente sana sino de un grupo de pacientes.

Las razones de probabilidad negativa y positiva, poco utilizadas, resumen en un índice los valores de sensibilidad y especificidad. Con ellos se comparan diferentes pruebas evaluadas independientemente de la prevalencia de la enfermedad.<sup>19</sup> Las razones de probabilidad reflejaron que un resultado positivo es 143 veces más probable en un individuo con sangramiento intestinal que en uno sano y que no resulta probable un resultado negativo en la identificación de un individuo enfermo.

Otro aspecto que influye es el ensayo de precisión que permitió establecer que concentraciones de Hbh entre 1.3 µg/mL y 0.7 µg/mL (puntos de corte) darán resultados no reproducibles. Esto quiere decir que en algunos pacientes con sangramiento en el entorno de estas concentraciones pudieran dar positivos o negativos.

Al comparar nuestros resultados con la clínica a través de la colonoscopia efectuada en el universo de pacientes estudiados, observamos que de 25 cánceres colorrectales, 23 fueron identificados para 91% de correspondencia (sensibilidad 92%, especificidad 100%).

De acuerdo con todo lo anterior, podemos concluir que el reactivo diseñado está calificado para su aplicación en la determinación cualitativa de sangre oculta en heces. Además, ofrece ventajas en cuanto a la sencillez de su uso, la rápida respuesta, la fácil interpretación de los resultados y el bajo costo que oscila entre 7 y 30 veces más económico que los tests inmunoquímicos disponibles actualmente en el mercado.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a las Dras. Olga Hano García y Mavié Castellanos Gutiérrez, del Instituto Nacio-

nal de Gastroenterología de Cuba, y a las técnicas Anyela Hernández Cabrera y Elsa La Rosa Noda de la Empresa de Producción de Biológicos «Carlos J. Finlay» por sus colaboraciones para el desarrollo de este trabajo.

## Referencias

1. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías Prácticas de la Alianza Internacional para Cáncer Digestivo: Tamizaje del cáncer colorrectal. 2007.
2. Ouyang DL, Chen JJ, Getzenberg RH, Schoen RE. Noninvasive testing for colorectal cancer: A review. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (6): 1393-1403.
3. Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, Tucker JP, Tekawa IS et al. Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: Update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99 (19): 1462-1470.
4. Broughton PMG, Bergonzi C, Loeber JG, Malen PG. Guidelines for the evaluation of diagnostic kit. Part II General Principles and outline procedure for the evaluation of kits for qualitative test. European Committee for clinical Laboratory standards. Document Number. 1990; 1: 12-28.
5. Fleiss JL. Statistical method for rates and proportions. 2nd ed. New York: Ed John Wiley; 1981.
6. Pita S, Pértegas S. Pruebas diagnósticas. *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124.
7. Greenhalgh T. How to read a paper: Paper that report diagnostic or screening tes. *BMJ* 1997; 315: 540-543.
8. López de Ullibarri I, Pita S. Medidas de concordancia: El índice kappa. *Cad Aten Primaria* 1999; 6: 169-171.
9. Programa integral para el control del cáncer en Cuba. Pautas para la gestión. Vol. 1. Colectivo de autores. Unidad Nacional para el Control del Cáncer: Ministerio de Salud Pública. Cuba. 2009.
10. Organización Mundial de la Salud. Programas Nacionales de Control del Cáncer: Políticas y pautas para la gestión. Washington, DC: OMS; 2004.
11. Kraemer B. Light scattering and its application for the clinical laboratory. *Am J Med Technol* 1982; 48 (8).
12. Looney C. High sensitivity light scattering immunoassays inhibition assay format. *J Clin Immunoassay* 1985; 7 (1): 90-95.
13. Sugimoto H, Kuroda M, Morikawa K, Hashimoto N, Hasegawa T et al. Latex agglutination nephelometric immunoassay for microalbuminuria. *Rinsho Byori* 1987; 35 (1): 73-79.
14. Molina-Bolívar JA, Galisteo-González F. Latex immunoagglutination assays. *J Macromolec Sci* 2005; 45: 59-98.
15. Viberti GC, Vergani D. Detection of potentially reversible diabetic albuminuria: 3 drop agglutination test for urinary albumin at low concentration. *Diabetes* 1982; 31: 973-975.
16. Väänänen P, Tenhunen R. Rapid immunochemical detection of fecal occult blood by used of a latex-agglutination test. *Clin Chem* 1988; 34 (9): 1763-1766.
17. Toraño GP, Tamargo IM, Falcón RM, Fuente KG, Pérez MM, Sánchez LV. Evaluación de reactivos cubanos elaborados para el diagnóstico rápido de *Haemophilus influenzae* tipo B. *Rev Cub Farm* 2001; 35 (2): 109-115.
18. Madhusudana SN, Saraswati S. Development and evaluation of a latex-agglutination test for rabies antibodies. *J Clin Virol* 2003; 27 (2): 129-135.
19. Dujardin B, Van den Ende J, Van Gompel A, Unger JP, Van der Stuyft P. Likelihood ratios: A real improvement for clinical decision making? *Eur J Epidemiol* 1994; 10 (1): 29-36.