



**HIERRO SÉRICO EN RECIÉN NACIDOS SANOS DE VILLA CLARA, CUBA.
ESTUDIO A PARTIR DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

Tahiry Gómez¹, Leticia Bequer¹, Yansy Romero², Melba Villar², Ángel Mollineda³, Olga González¹

- 1. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba.**
- 2. Facultad de Medicina. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba.**
- 3. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central de las Villas. Cuba.**

CORRESPONDENCIA: MSc. Tahiry Gómez Hernández. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba. Calle 4ta No. 323 entre F y G. Reparto Vigía. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 50200

Email: tahirygh@ucm.vcl.sld.cu

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013



RESUMEN

La determinación de hierro sérico es uno de los estudios válidos para la valoración del estado de este mineral en los neonatos. Para una correcta interpretación de los resultados es necesario el establecimiento de valores normales teniendo en cuenta las exigencias actuales en cuanto a las garantías de calidad en el Laboratorio. En este trabajo se describe la evaluación del desempeño del método colorimétrico de la ferrozina para la cuantificación confiable de hierro en sangre del cordón umbilical. También se describe la obtención y comparación de valores de referencia de este mineral en recién nacidos de Villa Clara, Cuba, determinados por el método colorimétrico evaluado y el de absorción atómica. Para el desarrollo del estudio se utilizaron muestras de sangre del cordón umbilical de neonatos sanos de ambos sexos. Para evaluar el desempeño del método colorimétrico se utilizó una mezcla de los sueros sanguíneos y se estudiaron los indicadores: repetibilidad, precisión intermedia y robustez, acorde a los requerimientos de la *Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos*, de la República de Cuba. Para establecer los valores de referencia se procesaron 91 muestras por el método colorimétrico y 59 por el de absorción atómica. Se demostró la adecuación del método colorimétrico a la cuantificación confiable de hierro en este tipo de muestra sanguínea, pues cumplió los criterios de aceptación para los indicadores evaluados. Los intervalos de referencia determinados por ambos métodos no presentaron diferencias significativas al compararlos, y se encontraron cercanos al rango publicado para cada caso.

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013



Palabras claves: hierro sérico, recién nacidos, sangre cordón umbilical, absorción atómica, ferrozina.

SERUM IRON IN HEALTHY NEWBORNS OF VILLA CLARA, CUBA. STUDY FROM TWO ANALYTICAL METHODS

ABSTRACT

The determination of serum iron is one of the valid studies for assessing the state of this mineral in neonates. For a correct interpretation of the results is necessary to establish normal values taking into account the current requirements in terms of quality guarantees in the laboratory. This paper describes the performance evaluation of the ferrozine colorimetric method for reliable quantification of iron in cord blood. It also describes the collection and comparison of reference values of this mineral in newborns of Villa Clara, Cuba, determined by the colorimetric method evaluated and atomic absorption method. For the development of the study samples of blood of the umbilical cord of healthy neonates of both sexes were used. To evaluate the performance of the colorimetric method a mixture of the sanguine serums it was used and the indicators were studied: repeatability, intermediate precision and robustness, according to the requirements of the Regulation No. 41-2007: Validation of analytic methods, of the Republic of Cuba. To establish reference values 91 samples were processed by the colorimetric method and 59 by the atomic absorption method. It demonstrated the suitability of the colorimetric method for reliable

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013



quantification of iron in this type of sanguine sample, because it completed the approaches of acceptance for the evaluated indicators. The reference intervals determined by both methods were not significantly different when compared, and were found near the range reported for each case.

KEY WORDS: iron-serum, newborns, umbilical cord blood, atomic absorption, ferrozine.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la sangre del cordón umbilical ha sido de interés científico como un medio útil para la determinación de varios parámetros que brindan una información detallada del estado nutricional y metabólico del individuo al momento de su nacimiento (1). Entre estos parámetros resulta de particular importancia el hierro por considerarse imprescindible en un sinnúmero de procesos biológicos que ocurren en nuestro organismo (2).

El hierro, como otros oligoelementos, se encuentra en pequeñas cantidades en el organismo para intervenir en su metabolismo y nutrir su sistema inmunológico. La deficiencia de hierro da lugar a desórdenes musculares y disminución de la capacidad física al esfuerzo, anomalías en el comportamiento como apatía, somnolencia e irritabilidad, y disminución del rendimiento intelectual. Si se produce durante el embarazo, la deficiencia de este mineral provoca una incidencia más elevada de infecciones en

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013



niños y un aumento de la morbi-mortalidad feto-maternal (2-4). El diagnóstico de déficit de hierro se establece basándose en los síntomas y en los resultados de análisis de sangre; la determinación de hierro sérico es uno de los estudios válidos para la valoración del estado de este mineral en el organismo (5).

Para esta determinación existen varios métodos, entre ellos la espectrofotometría de absorción atómica y diferentes modificaciones de los métodos colorimétricos que han sido propuestos por los comités internacionales ^(5,6). Entre estos últimos está el método que emplea la ferrozina, que es ampliamente utilizado por su bajo costo y fácil desempeño. Sin embargo este tipo de determinación tiene como limitación la gran variabilidad en sus valores, debido a múltiples factores fisiológicos y técnicos (6).

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Teniendo en cuenta estas razones y los requerimientos actuales respecto a la necesidad del establecimiento de pruebas que aporten un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos (7), reviste gran importancia la evaluación del desempeño de este método.

Por otro lado, se conoce que los valores de referencia dependen del método analítico con que son evaluados, incluso del equipamiento utilizado, y que deben ser calculados para cada población en particular ya que pueden depender de otros muchos factores (8,9). En el caso específico del hierro sérico existen muy pocas referencias de estudios en nuestra población que aporten valores referenciales de este mineral en sangre del cordón umbilical, a partir de



métodos analíticos validados que permitan obtener resultados de alta fiabilidad.

Por lo expuesto, los propósitos del presente trabajo son: evaluar el desempeño del método colorimétrico de la ferrozina para la cuantificación confiable de hierro en sangre del cordón umbilical, acorde a la *Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos*, de la República de Cuba; así como determinar y comparar los valores de referencia de este mineral en recién nacidos en Villa Clara, utilizando el método colorimétrico evaluado y el de absorción atómica.

MÉTODOS

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Se utilizó como muestra el suero de sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos de ambos sexos provenientes del salón de partos del Hospital Universitario Gineco-obstétrico “Mariana Grajales” de la provincia de Villa Clara, Cuba.

De acuerdo con nuestros criterios de inclusión y exclusión se aceptaron las muestras pertenecientes a recién nacidos con examen físico normal, productos de embarazos entre 37 y 41 semanas de gestación y con peso al nacer adecuado a la edad gestacional. Se rechazaron las muestras de hijos de madres con factores de riesgo de posible enfermedad perinatal, seropositivas al VIH o Hepatitis B, o que tuvieran hábitos tóxicos; así como aquellas muestras en las que se constató hemólisis o ictericia durante el proceso de centrifugación.



La toma de muestra sanguínea (150 muestras) se realizó en dos momentos: en el primero se incluyeron 91 muestras de recién nacidos (46 femeninos y 45 masculinos), cuyas determinaciones de hierro sérico fueron realizadas a través del método colorimétrico que utiliza la ferrozina en un equipo Spekol 11 y se utilizó el juego de reactivos producido por la empresa Laboratorios HELFA (10).

En un segundo momento fueron incluidas 59 muestras (30 femeninos y 29 masculinos), en las que las mediciones se realizaron por el método espectrofotométrico de absorción atómica utilizando un equipo SP9 Pye Unicam (Philips); la preparación de los reactivos y muestras, así como las condiciones de trabajo empleadas fueron las publicadas por los fabricantes del equipamiento utilizado (11).

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Evaluación del desempeño del método colorimétrico de la ferrozina

Se estudiaron los indicadores de desempeño analítico: repetibilidad, precisión intermedia y robustez del método colorimétrico de la ferrozina, acorde a la metodología descrita para la evaluación del desempeño de métodos normalizados y estandarizados en la Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos (7).

Para el estudio de estandarización se utilizó una mezcla de sueros sanguíneos, conformada por alícuotas de las 91 muestras destinadas a la cuantificación de hierro por el método colorimétrico de la ferrozina.

Para determinar el comportamiento de la *repetibilidad*, se realizaron seis réplicas de la mezcla de sueros con condiciones homogéneas para el análisis, y se calculó la media de la concentración de hierro, la



desviación estándar y el coeficiente de variación de los seis resultados obtenidos.

El estudio de la *precisión intermedia* se desarrolló realizando el experimento anterior por dos analistas en tres días diferentes. Los valores obtenidos en los tres días se analizaron en un solo grupo y se evaluó la media de las concentraciones de hierro, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se realizó además un análisis de varianza (one way ANOVA, $\alpha = 0,05$) para determinar el valor de $F_{\text{calculado}}$ con el objetivo de conocer si existían o no diferencias significativas entre los resultados de los diferentes días.

A partir del test de F se calculó el estadígrafo de Cochran (C) para conocer la homogeneidad de varianza en cada día por separado, para ello se computó la varianza de cada día (i) y se dividió la mayor

(máxima varianza) entre la suma de todas ellas.

El ensayo de robustez se desarrolló a través del análisis de tres factores que podrían originar fluctuaciones en los resultados de las determinaciones por este método, ellos son: equipos de marcas diferentes para la lectura, lote de reactivos químicos (recientemente abierto y con varios días de uso), y tiempo de estabilidad del complejo en la determinación (a tiempo cero y a 1 hora después de desarrollado el color). Para el estudio del factor equipo se empleó, además del Spekol 11, un espectrofotómetro UV-VIS Génesis 10.

Para diseñar la prueba de *robustez* se otorgaron dos valores (normal y alternativo) a cada uno de los tres factores de variabilidad y se desarrolló un diseño factorial 2^3 . Las tres condiciones se designaron con las letras A, B y C y los

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

valores cambiados, con las correspondientes letras minúsculas. Se efectuaron 8 análisis de la mezcla de sueros y cada análisis fue una combinación diferente de los tres factores.

Factor de variabilidad	Normal	Alternativo
-------------------------------	---------------	--------------------

Equipo (A/a)	Spekol 11 (A)	Génesis 10 (a)
Reactivo (B/b)	Reactivo nuevo (B)	Reactivo usado (b)
Tiempo de estabilidad del complejo (C/c)	Tiempo 0 (C)	1 hora (c)

Se obtuvieron las diferencias de los promedios de **A-a**, **B-b** y **C-c** y se consideraron con efectos sobre el método

aquellos factores cuyas diferencias resultaran sustancialmente mayores que las diferencias asociadas con otros factores.

Determinación y comparación de los valores de referencia

El análisis estadístico de los niveles de hierro sérico determinados por los métodos: colorimétrico de la ferrozina y absorción atómica se llevó a cabo mediante el programa SPSS, versión 18.0. Se efectuó el test de Kolmogorov-Smirnov con corrección de la significación Lilliefors para comprobar la normalidad de los niveles de hierro sérico obtenidos por ambos métodos y, según las características de la distribución, se utilizaron pruebas paramétricas (t de Student para dos muestras independientes) para determinar diferencias entre los sexos en cada uno de los grupos de estudio y comparar las medias de la concentración de

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

hierro obtenida por cada método. Se establecieron los valores de referencia (media aritmética $\pm$ 1 desviación estándar) para el hierro en sangre del cordón umbilical por cada uno de los métodos analíticos señalados. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/l}$.

Aspectos éticos

La investigación fue diseñada teniendo en cuenta las normas éticas para la investigación científica en muestras de origen humano, y considerando las particularidades de las investigaciones con embarazadas y recién nacidos (12); el protocolo y consentimiento informado para el estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Institución. A las madres que participaron se les explicó el protocolo y los objetivos del estudio, y se les proporcionó un modelo de consentimiento informado

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

acerca del uso que se daría a su muestra sanguínea (12).

RESULTADOS

Evaluación del desempeño del método colorimétrico de la ferrozina:

Los resultados del estudio de repetibilidad, obtenidos bajo condiciones homogéneas de análisis, y de precisión intermedia, efectuado en tres días diferentes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de la repetibilidad y precisión intermedia teniendo en cuenta los resultados experimentales.

Parámetros estadísticos	Valores	
	Repetibilidad	Precisión intermedia
n	6	18
Media (μmol/l)	25,511	25,691
Desviación estándar (μmol/l)	0,173	0,378
Coefficiente de variación (%)	0,677	1,474
F _{calculado}		17,589
F _{tabulado} (F(0.05,2,15))		3,680
C _{calculado}		0,640
C _{tabulado}		0,707

En la tabla 2 aparecen los resultados del análisis del efecto de los tres factores seleccionados para el estudio de la robustez (equipos, reactivos y tiempo de estabilidad del complejo).

Tabla 2. Resultados de la prueba de robustez

Diferencias para cada factor	
D _A (equipo)	0,057
D _B (reactivo)	1,177
D _C (tiempo)	0,432

Determinación y comparación de los valores de referencia

Se estudiaron los niveles séricos de hierro en 150 muestras de sangre del cordón umbilical; en 91 de ellas la determinación se realizó por el método colorimétrico que emplea como agente cromógeno a la ferrozina y en las 59 restantes por el método espectrofotométrico de absorción atómica. En los datos recogidos de cada una de las muestras se observa que ambos grupos estuvieron conformados por un 51 % de recién nacidos del sexo femenino y 49 % del sexo masculino.

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Con el fin de observar la distribución de los valores de hierro en sangre del cordón umbilical obtenidos por ambos métodos utilizados, se realizaron los gráficos que se presentan en la figura 1 para los niveles de hierro.

Se analizaron además los niveles séricos de hierro por cada método según el sexo y se comprobó que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$). En consecuencia se establecieron los intervalos de referencia considerando en ambos casos la muestra como única, sin distinción de género.

El valor medio de los niveles de hierro sérico, obtenidos por el método colorimétrico de la ferrozina, fue 22,78 $\mu\text{mol/l}$ y la desviación estándar 7,62. Con estos datos se propuso como intervalo de referencia un rango entre 15,16 y 30,40 $\mu\text{mol/l}$.

La concentración media de hierro, calculada en las muestras analizadas por el método de absorción atómica, fue 21.78 $\mu\text{mol/l}$ y la desviación estándar 6.53. El intervalo de referencia propuesto en este caso osciló entre 15,25 - 28,31 $\mu\text{mol/l}$.

Se analizó la existencia o no de diferencias entre los valores de concentración de hierro sérico determinados por cada método y se obtuvo para el estadígrafo (t de student) un valor de 0.88, con una significación asociada de 0.380. Se concluye de este análisis que no existieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

DISCUSIÓN

Evaluación del desempeño del método colorimétrico de la ferrozina

Actualmente se recomienda fuertemente que la selección y desarrollo de métodos

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013



analíticos necesita previamente de una validación o evaluación de su desempeño, que permita obtener datos y resultados experimentales que demuestren la aptitud para el uso que se destina (7,13). Así mismo, se ha establecido que los métodos normalizados y estandarizados no requieren validación sino una evaluación de su desempeño; y que, para la introducción de los mismos, cada laboratorio definirá sus criterios de evaluación caso a caso, tomando en consideración las características del método y la experiencia que se tenga en la caracterización de la muestra en cuestión ⁽⁷⁾. La técnica que combina el método espectrofotométrico UV-VIS con el uso de la ferrozina para la cuantificación de hierro sérico ya está validada a nivel nacional. Sus criterios de desempeño y principales limitaciones están publicados y son conocidos por la comunidad científica ⁽¹⁰⁾,

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

no obstante en el presente trabajo se consideró necesaria la evaluación de los indicadores de desempeño analítico: repetibilidad, precisión intermedia y robustez para demostrar la efectividad del método para el tipo de muestra empleado (sangre del cordón) en nuestras condiciones de trabajo.

El estudio de la repetibilidad evalúa la variabilidad intrínseca del proceso al ser llevado a cabo en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio con los mismos equipos y reactivos, y generalmente en un corto intervalo de tiempo. Se ha establecido que la evaluación de la repetibilidad no debe exceder el 3% de variabilidad total en los métodos espectrofotométricos (7,13,14). Según lo expuesto en tabla 1, para la repetibilidad del método, los resultados cumplen con el



criterio de aceptación de este parámetro debido a que el coeficiente de variación obtenido (0,68%) es menor que un 3%.

La evaluación de la precisión intermedia es una medida de la variabilidad dentro del Laboratorio cuando se emplea una muestra homogénea y se analiza en condiciones diferentes, es decir analista diferente y días diferentes (7,13). A través del análisis de la precisión intermedia, expuesto en la tabla 1, se obtuvo que los valores de F obtenidos de ANOVA evidencian que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ e indican que los resultados obtenidos en los tres días son significativamente diferentes, posiblemente por el cambio de los analistas en cada uno de los días estudiados. El resultado anterior no es excluyente para la evaluación de la precisión intermedia porque la comparación del valor de la C de Cochran calculado con el tabulado muestra que $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabulado}}$, por lo que la

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

variación del método no es considerada significativa para los tres días estudiados. Este es un criterio que avala la precisión intermedia del método, teniendo en cuenta que la prueba de Cochran es recomendada para evaluar la variabilidad dentro del laboratorio (13,14).

El estudio de Robustez permite evaluar los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico (7,13,14). En este trabajo se evaluaron tres variaciones razonables (equipos, reactivos y tiempo de estabilidad del complejo) deliberadamente efectuadas con el propósito de identificar factores que originen fluctuaciones menores y variaciones significativas en el método de ensayo. Se muestra en la tabla 2 que el factor reactivo sobresale como la condición causante del mayor efecto sobre los resultados analíticos en comparación con las



restantes dos condiciones. No se intentó hallar la significación de esta diferencia; lo que se ha hecho es reservar estas condiciones para realizar, muy probablemente, un estudio adicional. No obstante este resultado sirve como alerta para que se extremen en el Laboratorio las medidas de precaución destinadas a proteger la calidad del reactivo.

El estudio desarrollado para la evaluación del desempeño demuestra que el método colorimétrico de la ferrozina es fiable para la cuantificación de hierro en sangre del cordón umbilical, pues cumple los criterios fundamentales de repetibilidad, precisión intermedia y robustez.

Determinación y comparación de los valores de referencia

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Diversas fuentes especializadas coinciden en la necesidad de calcular y establecer valores de referencia en cada laboratorio, ya que son dependientes de la genética, los estilos de vida y ambientales, de la edad y el sexo; además del método analítico con que son evaluados (8,9).

En el presente estudio se constató que las concentraciones séricas de hierro determinadas por ambos métodos no difirieron significativamente entre recién nacidos femeninos y masculinos. Se conoce que los hombres poseen mayores reservas de hierro que las mujeres (6), pero la causa de esta diferencia está relacionada con las pérdidas cíclicas de la menstruación y no concurren en los recién nacidos.

Otros resultados de nuestro estudio indicaron que no existieron diferencias significativas entre los niveles séricos de



hierro en sangre del cordón umbilical determinados por los dos métodos analíticos utilizados. Es interesante señalar que aplicando métodos con principios diferentes los rangos de referencia determinados fueron similares; sin dudas en este resultado tuvo gran influencia el cumplimiento estricto de los criterios para la inclusión de las muestras en el estudio, así como la observancia de determinadas variables que deben ser controladas porque pueden influir en los resultados. Entre esas variables se encuentran: homogeneidad en el procedimiento de obtención de la muestra biológica, tiempo entre la obtención y el proceso de las muestras, inexistencia de interferentes analíticos como hemólisis e ictericia y tratamiento correcto de la cristalería y material utilizado, aspectos que apoyan la validez interna del estudio.

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Al analizar los intervalos de referencia determinados por cada método se observa que por el colorimétrico de la ferrozina los valores presentan una diferencia en el límite inferior respecto a los reportados por la empresa productora del juego de reactivos empleado (8.95 a 30 $\mu\text{mol/l}$) (10); en nuestro caso queda por encima del publicado. Similar comportamiento se aprecia en los valores normales obtenidos por el método de absorción atómica respecto al rango establecido para este método (7 a 29 $\mu\text{mol/l}$) (11). Es válido aclarar que en ninguno de los valores publicados que se citan se especifican las características de la población estudiada para establecerlos.

El conocimiento del hierro sérico como variable para la valoración del neonato resulta de gran utilidad pues brinda un acercamiento a la realidad del estado

nutricional del niño al nacer, lo que sería de gran ventaja en el caso de que existan posibilidades de alteraciones de los niveles de este metal, en orden de establecer una terapia de inicio temprana para prevenir las consecuencias nocivas de la ferropenia o del exceso de hierro.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del salón de partos del Hospital Universitario Gineco-obstétrico “Mariana Grajales” de la provincia de Villa Clara, Cuba por la selección y toma de muestra.

REFERENCIAS

1. Bojanić I, Golubić Cepulić B. Umbilical cord blood as a source of stem cells. Acta Med Croatica [serie en internet]. 2006 Jun [citado 12 oct 2011]; 60(3): [aprox. 10p.].

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013

Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16933834>

2. Chaparro CM. Setting the stage for child health and development: Prevention of iron deficiency in early infancy. American Society for Nutrition. J. Nutr 2008 dic [citado 18 ene 2011]; 138(12): [aprox. 3 p.]. Disponible en: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/138/12/2529>
3. John L Beard. Why Iron deficiency is important in infant development. J. Nutr [serie en internet]. 2008 [citado 21 abr 2010]; 138: [aprox. 2 pág.]. Disponible en: <http://jn.nutrition.org>
4. Olivares G M, Walter K T. Consecuencias de la deficiencia de hierro. Rev. Chil. Nutr [serie en internet]. 2003 Dic [citado 30 dic

- 2010]; 30(3): [aprox. 5 pág.].
Disponible en:
<http://www.jn.revchilnutr.org>
5. Suwansaksri J, Sookarun S, Wiwanitkit V, Boonchalermvichian C, Nuchprayoon I. Comparative study on serum iron determination by different methods. Lab Hematol [serie en internet]. 2003 [citado 15 may 2008]; 9(4): [aprox. 2 pág.].
Disponible en: www.hematol.com
6. Otero S, Del Río M C. Hierro. En: Cocho JA, Escanero JF, Buitrago JM. Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos. España: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1998.
7. Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos. República de Cuba. Ministerio de Salud Pública.
8. Solberg HE. Establishment and use of reference values. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz. Fundamentals of clinical chemistry. 6th edition. Philadelphia, Pa: WB Saunders Company; 2008. p. 229-237.
9. Solberg HE. Teoría de valores de referencia. Concepto de valores de referencia. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 1986; 20 (3): 485-492.
10. HELFA Diagnósticos. Hierro en suero. La Habana: Suministrador EPB: "Carlos J. Finlay"; 2009.
11. Milner, B.; Whiteside, P. Introduction to Atomic Absorption Spectrophotometry. Pye Unicam Ltd. England: York Street. Cambridge; 1984.
12. Rodríguez E. El consentimiento informado en el uso de muestras

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013



biológicas humanas y de registros médicos. En: Lolas F, Quezada A, (eds.) Pautas éticas de investigación en sujetos humanos: nuevas perspectivas. Santiago de Chile: Programa Regional de Bioética OPS/OMS; 2003: 45-55.

13. Apers, S.; Theunis, M. Validation. Laboratory of Pharmacognosy. University of Antwerp. Belgium. Monografías de Curso impartido en la Universidad Central de Las Villas. 2009.
14. Norma cubana: NC-TC-368:2004. Guía para la validación de métodos químicos.

Recibido: 01-08-2012

Aprobado: 20-03-2013