

# HIERRO TIBC

## Uso:

Para la determinación cuantitativa de hierro, y la capacidad de unión del hierro total en suero humano.

## Introducción.:

El contenido de hierro del cuerpo humano se puede dividir en tres clases: de hierro en el almacenamiento, el hierro en uso, y el hierro en el transporte. Hierro en almacenamiento es hierro reservado contenido en las células. El hierro en uso contenido en la hemoglobina, diversas enzimas, y varios otros tipos de proteínas. Hierro en el transporte se mueve a su almacenamiento o se quita de almacenamiento para ser utilizado en la formación de hemoglobina, etc. Hierro en un estado libre no sólo es relativamente insoluble, pero es tóxico. Por lo tanto, casi todo el hierro en el cuerpo está unido a algún tipo de proteína. Es de fundamental importancia tener en cuenta que una muestra debe ser analizada para el hierro y la capacidad de unión de hierro debido a la necesidad de que ambos valores en el diagnóstico diferencial de los diferentes tipos de anemia y enfermedades del hígado. Por esta razón, el procedimiento actual está diseñado para la determinación simultánea de hierro y capacidad de unión de hierro.<sup>1,2</sup> Pruebas de hierro en suero miden el transporte de hierro unido a la proteína transferrina. Aumento de los niveles de hierro sérico pueden indicar aumento de la destrucción de eritrocitos, disminución de la formación de eritrocitos, aumento de la absorción, o detecta la capacidad de almacenamiento. Disminución de los niveles de hierro sérico pueden indicar deficiencia de hierro o la incapacidad de recuperar el hierro almacenado. Capacidad de unión del hierro por lo general aumenta en la anemia por deficiencia de hierro y disminuye en la hemocromatosis, enfermedades malignas, la fiebre reumática. Enfermedades de Hodgkin y enfermedad vascular del colágeno.<sup>1,2</sup> Metodologías de hierro de mayor éxito remueven el hierro de la transferrina, reducen al estado ferroso, unido a un cromóforo y se cuantifican mediante la medición de la cantidad de color desarrollado. La determinación de la capacidad de unión a hierro implica la adición de hierro suficiente para saturar la transferrina y luego determinar bien la cantidad total de hierro unido o el exceso de hierro no unido. El procedimiento posterior se aplica para determinar capacidad de unión de Hierro.<sup>3</sup>

## Principio:

El hierro en suero es disociado de su Fe (III) - complejo transferrina mediante la adición de un buffer acidito que contiene hidroxilamina. Esta adición reduce el Fe (III) a Fe (II). El agente cromógeno, Ferene, forma un complejo muy coloreado de Fe (II) - que se mide fotométricamente a 560 nm.

La capacidad de unión a hierro no saturado (UIBC) se determina mediante la adición de hierro Fe (II) a suero para que se una a los sitios de unión de hierro no saturados en transferrina. El exceso de Fe (II) se hace reaccionar con los iones Ferrozine para formar el complejo de color, que se mide fotométricamente. La diferencia entre la cantidad de Fe (II) añadido y la cantidad de Fe (II), medido representa la unión a hierro no saturado. La capacidad total de fijación de hierro (TIBC) se determina sumando el valor de hierro en suero para el valor UIBC.

## Reactivos:

- Reactivo buffer de Hierro: Buffer de acetato que contiene 220 mM. Hidroclorato de hidroxilamina, pH 4.5 con surfactante.
- Reactivo UIBC buffer: Tris Buffer 0.5 M, pH 8.0 con surfactante, de azida sódica como conservante.
- Reactivo de Hierro de color: Ferrozine (16.6 mM) en hidrocloreuro de hidroxilamina.
- Estándar de Hierro (500 µg/dl): 500 µg de cloruro ferroso en Hidrocloreuro de hidroxilamina.

## Advertencias y Precauciones:

- Para el uso de diagnóstico in vitro.
- Buffer UIBC contiene azida de sodio y puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Para su eliminación, lavar con abundante agua para evitar la acumulación de azida.
- Evitar la ingestión del reactivo, la toxicidad no ha sido aún determinada.
- Las muestras deben ser consideradas infecciosas y manejadas apropiadamente.

## Almacenaje y Estabilidad:

Los reactivos y el estándar deben ser almacenados a temperatura ambiente (15-30°C).

### Deterioro del Reactivo:

- Aparición de turbidez, el crecimiento del moho es posible, o formación de cristales que no se disuelven fácilmente son signos de deterioro de los reactivos.
- La falta de obtener resultados precisos en las pruebas de materiales de control puede indicar deterioro del reactivo.

## Recolección y Almacenaje de la Muestra.<sup>1</sup>

- Fresco, suero no hemolizado es la muestra de elección.
- El suero debe separarse tan pronto como el coágulo se ha formado.
- Plasma heparinizado puede ser utilizado, pero otros anticoagulantes no deben ser utilizados para evitar la posible contaminación con hierro.
- Hierro sérico se reporta estable durante cuatro días a temperatura ambiente (15 - 30°C) y siete días a 2 - 8°C.

## Sustancias de Interferencia:

- Ciertos fármacos y otras sustancias se saben que influyen en los niveles circulantes de hierro. Véase Young, et al.<sup>4</sup>
- Hierro contenido en hemoglobina no reacciona en este método, por lo tanto, una ligera hemólisis no interfiere. Sin embargo, muestra muy hemolizada (muestras de color rosa o rojo) contribuirá a la medida de absorbancia a la longitud de onda usada y debe ser evitada.<sup>1</sup>
- Para hacer los tubos, pipetas, etc., libres de hierro, deben ser lavados con ácido clorhídrico o nítrico diluido caliente 1:3, seguido por varios enjuagados con agua desionizada o destilada libres de hierro.

## Materiales Provistos:

- Buffer de Hierro
- Buffer UIBC
- Hierro Color
- Estándar de Hierro (500 µg/dl)

## Materiales Necesarios No Incluidos:

- Espectrofotómetro capaz de leer a 560 nm.
- Agua desionizada libre de hierro.
- Pipetas.
- Tubos de ensayo/estante.
- Reloj cronómetro.
- Baño o bloque de calentamiento

## Procedimiento Manual:

Hierro sérico:

- Identifique los tubos / cubetas: "En blanco", "Normal", "Control", "Muestra", etc.
- Añadir 2.5 mL de reactivo buffer de hierro a todos los tubos.
- Añadir 0.5 mL (500 µL) de muestra a los tubos respectivos y mezclar. NOTA: Agregar 500 µL de agua libre de hierro al blanco.
- Cero el espectrofotómetro a 560 nm con el blanco de reactivo.
- Lea y registre las absorbancias de todos los tubos (lectura A1).
- Añadir 0.05 mL (50 µL) de reactivo de color de hierro a todos los tubos. Mezclar.
- Colocar todos los tubos en el baño de calentamiento a 37°C durante 10 minutos.
- Poner a cero el instrumento a 560 nm con el blanco de reactivo. (Rango de longitud de onda: 520- 560 nm).
- Lea la absorbancia de todos los tubos (lectura A2).

\*CALIBRADOR MULTIUSO PUEDE SER UTILIZADO PARA REEMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

## Procedimiento Automatizado:

Consulte el manual del instrumento para la aplicación adecuada.

## Cálculos:

A = Absorbancia                      Std = Estándar

A2 Prueba - A1 Prueba x Conc. de Std = Hierro Total (µg/dL)

A2 Std - A1 Std

A1 Std. = 0.00

A2 Std. = 0 .4 0

0.15 - 0.08 = 0.07 = 0.175 x 500 = 87.5 µg/dL

0.40 - 0.00    0.40

## UIBC (Capacidad de unión-hierro no saturado):

- Identifique los tubos / cubetas, "blanco", "Normal", "control", "Prueba", etc.
- Añadir 2.0 mL de reactivo buffer UIBC a todos los tubos.
- Para " en blanco " añadir 1.0 mL de agua libre de hierro. Mezclar.
- Para "estándar añadir 0.5 mL (500 µL) agua libre de hierro más 0.5 ml (500 µl) de estándar. Mezclar.
- Para " Prueba " añadir 0.5 mL (500 µL) muestra respectiva, más 0.5 ml (500 µL) Estándar de Hierro. Mezclar.
- Cero el espectrofotómetro a 560 nm con blanco de reactivo.
- Leer y anotar la absorbancia de todos los tubos (lectura A1).
- Añadir 0.05 mL (50 µL) de reactivo de hierro de color a todos los tubos. Mezclar.
- Colocar todos los tubos en un baño de calentamiento a 37°C durante diez (10) minutos.
- Espectrofotómetro a 560 nm cero con blanco de reactivo.
- Leer y anotar la absorbancia de todos los tubos. (Lectura A2).

\*CALIBRADOR MULTIUSO PUEDE SER UTILIZADO PARA REEMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

## UIBC Cálculos:

Conc. de Std -  $\left[ \frac{A2 Prueba - A1 Prueba}{A2 Std. - A1 Std.} \right]$  x Conc. de Std = UIBC (µg/dL)

Ejemplo:

$500 - \left[ \frac{0.2 - 0.10}{0.4 - 0.00} \right] \times 500 = \text{UIBC } (\mu\text{g/dL})$

Entonces:  $500 - (0.25 \times 500) = 375 \mu\text{g/dL (UIBC)}$

**Nota:** La diferencia entre la prueba de A1 y la prueba de A2 a veces puede ser muy pequeña debido a un alto grado de insaturación de la transferrina con hierro. La muestra debe ser diluida con agua libre de hierro y volver a probar. Multiplique el resultado por el factor de dilución.

## Cálculos:

TIBC (Capacidad de unión del Hierro Total)

Nivel de Hierro + UIBC = TIBC (µg/dL)

Conversión de unidades SI: µg/dL x 0.179 = µmol/L

## Calibración:

El procedimiento es calibrado con estándar de hierro (500 µg/dL) incluido en cada empaque.

## Control de Calidad:

Controles de suero con valores conocidos normales y anormales se deben correr de forma rutinaria para monitorear la validez de la reacción.

## Valores Esperados:<sup>1, 3</sup>

Hierro Total = 60 - 150 µg/dL

TIBC = 250 - 400 µg/dL

Saturación de Hierro = 20 - 55%

Se recomienda que cada laboratorio establezca el rango normal para su población particular.

## Características de Desempeño:

1. Linealidad: 500 µg/dL

Las muestras con valores por encima de 500 µg/dL debe ser diluido 1: 1 con solución salina normal, re-analizadas y el resultado multiplicado por dos.

2. Sensibilidad: Basado en un instrumento de 0.001 A, este procedimiento tiene una sensibilidad de 2 µg/dL.

3. Estudio de Comparación: Un estudio realizado entre este procedimiento y un procedimiento similar Hierro en Suero resultó en un coeficiente de correlación de 0.98 con una ecuación de regresión de  $y = 1.0 x - 4.86$ . Un estudio realizado entre este procedimiento y el procedimiento UIBC similares resultó en un coeficiente de correlación de 0.97 con una ecuación de regresión de  $y = 0.86 x + 56$ .

4. Estudio de Precisión: Hierro Total

## Entre Corridas

Promedio

S. D.

C.V. %

## Corrida-a-Corrida

Promedio

S. D.

C.V. %

204

21

10.5

196

14

7.0

107

16

15.0

130

22

17.0

Estudio de Precisión: UIBC Entre

Corridas

Promedio

S. D.

C.V. %

## Corrida-a-Corrida

Promedio

S. D.

C.V. %

219

24

11

230

14

6.1

401

14

3.5

402

13

3.2

## Referencias:

- H e n r y, J.B. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Philadelphia, W.B. Saunders, P.1434 (1.984).
- Tietz, N.W., *Fundamentals of Chemistry*, Philadelphia, W.B., Saunders, pp. 923-929 (1976).
- Zak. B., et al., *Ann. Clin. and Lab. Science*.
- Young, D.S. *et al. Clin. Chem.* 21:10 (1975).

