



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

REACTIVO DE HIERRO/TIBC

USO RECOMENDADO

Para la determinación cuantitativa de hierro, la capacidad de captación del hierro en el suero humano.

INTRODUCCION

El contenido de hierro en el cuerpo humano puede ser dividido en tres clases: hierro en almacenamiento, hierro en uso, y hierro en transporte. El hierro en almacenamiento es el hierro reservado contenido dentro de las células. El hierro en uso se encuentra contenido en la hemoglobina, en varias enzimas, y en varios otros tipos de proteínas. El hierro en transporte se mueve hasta su almacenamiento o se mueve desde su almacenamiento para ser utilizado en la formación de hemoglobina, etc. El hierro en su estado libre no sólo es relativamente insoluble, sino también tóxico. Por lo tanto, casi todo el hierro en la sangre está ligado a algún tipo de proteína. Esto es de vital importancia para notar que una muestra debe ser analizada para detectar ambas pruebas, el hierro y la capacidad de captación del hierro debido a la necesidad de los dos valores en diagnóstico diferencial de varios tipos de anemia y enfermedades del hígado. Por esta razón, el procedimiento presente está diseñado para la determinación simultánea del hierro y la capacidad de captación del hierro.

Ensayos de hierro en el suero miden el hierro de transporte unido a la proteína transferrina. El aumento en los niveles del hierro en el suero puede indicar un aumento en la destrucción de eritrocitos, disminución de la formación de eritrocitos, aumento en la absorción, o hallazgos en la capacidad de almacenamiento. La disminución de los niveles de hierro en el suero puede indicar deficiencia de hierro o incapacidad de recuperar el hierro de almacenamiento. La capacidad de ligamiento usualmente aumenta en casos de anemia deficiente y disminuye en hemacromatosis, malignidades, fiebres reumáticas, enfermedad de Hodgkin, enfermedad colágeno vascular.

Los métodos del hierro más exitosos retiran el hierro del la transferían, lo reducen a su estado férrico, lo unen a un cromóforo, y lo cuantifican midiendo la cantidad de color que se ha desarrollado. En la determinación de la capacidad del hierro de unirse, se debe añadir el hierro suficiente para saturar la transferían y luego determinar la cantidad total del hierro unido o el exceso de hierro sin unión. El siguiente procedimiento se aplica para determinar la capacidad de unión del hierro.

PRINCIPIO

El hierro en suero se separa de su Fe (III) – complejo de transferían por la adición de un buffer ácido que contiene hidroxilamina. Esta adición reduce el Fe (III) a Fe(II). El agente cromogénico Ferene, forma un Fe (II) altamente pigmentado – complejo que se mide fotométricamente a 560 nm.

La capacidad de unión del hierro no saturado (UICB) se determina añadiendo hierro Fe (II) al suero para que se unan a los lugares de unión del hierro no saturado en la transferían. El exceso de iones de hierro (II) reaccionan con la Ferrozina para formar un complejo coloreado, el cual se mide fotométricamente. La diferencia entre la cantidad de Fe (II) añadido a la cantidad de Fe(II) medido representa la unión del hierro no saturado. La capacidad total de unión del hierro (TIBC) se determina añadiendo el valor del hierro en el suero al valor de UICB.

REACTIVOS

1. Reactivo buffer de hierro: Buffer acetato que contiene 220 mM de hidrocloreuro de hidroxilamina, pH 4.5 con surfactante.

2. Reactivo buffer de UICB: Buffer tris 0.5 M, pH 8.0 con surfactante, ácido sodico como preservante.
3. Reactivo de hierro de color: Ferrozina (16.6 mM) en hidrocloreuro de hidroxilamina.
4. Estándar de hierro (500 ug/dl): 500 µg de Cloruro ferroso en hidrocloreuro de hidroxilamina.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso de diagnóstico in Vitro.
2. El buffer UICB contiene ácido de sodio y puede reaccionar con plomo y cobre y así formar ácidos metálicos altamente explosivos. Para desecharlos, enjuague con mucho agua para prevenir acumulación del ácido.
3. Evite la ingestión del reactivo, debido a que su toxicidad no ha sido aun determinada.
4. Las muestras deben ser consideradas infecciosas y deben ser manipuladas adecuadamente.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Todos los reactivo y el estándar deben ser almacenados a temperatura ambiente (18 – 30°C)

DETERIORO DEL REACTIVO

1. Apariencia turbia, posible crecimiento de moho, o formación de cristales que no se disuelvan fácilmente son muestras de deterioro del reactivo.
2. El fracaso al obtener resultados precisos en el ensayo de materiales de control puede indicar deterioro del reactivo.

RECOLECCION DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

1. Se prefiere el suero fresco, no hemolizado como muestra.
2. El suero debe ser separado cuando el coágulo se haya formado.
3. El plasma heparinizado puede ser usado pero no deben ser usados otros anticoagulantes para evitar posible contaminación del hierro.
4. El hierro en suero se reporta estable por cuatro días a temperatura ambiente (18 – 30°C) y por 7 días de 2 – 8°C.

SUTANCIAS QUE INTERFIEREN

1. Se conoce que ciertas drogas y otras sustancias influyen en los niveles de hierro circulante.
2. El hierro contenido en la hemoglobina no reacciona en este método; por lo tanto, una leve hemólisis no interferirá. De todos modos, una gran hemólisis (muestras rosadas o rojas) si influirá en la medición de la absorbancia en la longitud de onda usada, y ésta debe ser evitada.
3. Para liberar a los tubos, pipetas, etc. de cualquier vestigio de hierro, estos debe ser lavados con una dilución caliente 1:3 de hidruro de cloro o ácido nítrico, seguido de varios enjuagues con agua desionizada o destilada.

MATERIALES PROVISTOS

1. Reactivo de buffer de hierro.
2. Reactivo de buffer UICB.
3. Reactivo de color de hierro.
4. Estándar de hierro (500 ug/dl)

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Espectrofotómetro capaz de leer a 560 nm.
2. Agua desionizada libre de hierro.
3. Pipetas.
4. Tubos de ensayo.

- Cronómetro.
- Baño maría/Bloque térmico.

PROCEDIMIENTO MANUAL

Hierro del suero:

- Rotule los tubos de ensayo en la gradilla de esta forma: "Blanco", "Estándar", "Control", "Muestra", etc.
- Añada 2.5 ml de Buffer de hierro a todos los tubos.
- Añada 0.5 ml (500 µl) de muestra a los tubos respectivos y mezcle. NOTA: Añada 500 µl de agua libre de hierro al blanco)
- Ponga el espectrofotómetro a cero a 560 nm con el reactivo Blanco.
- Lea y registre las absorbancias de todos los tubos (Lectura A₁).
- Añada 0.05 ml (50 µl) de reactivo de color del Hierro a todos los tubos. Mezcle.
- Ponga todos los tubos en el baño maría a 37°C por 10 minutos.
- Ponga a cero el instrumento a 560 nm con el reactivo de Blanco (Rango de la longitud de onda: 520 – 560 nm).
- Lea y registre las absorbancias de todos los tubos (Lectura A₂)

* SE PUEDE USAR EL CALIBRADOR MULTI-PROPÓSITO TC PARA REMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO

A = Absorbancia.

Std = Estándar.

$$\frac{\text{Prueba } A_2 - \text{Prueba } A_1}{\text{Estánd. } A_2 - \text{Estánd. } A_1} \times \text{Conc. del Estánd.} = \text{Hierro total } (\mu\text{l/dl})$$

Ejemplo:

$$\begin{array}{ll} \text{Prueba } A1 = 0.08 & \text{Prueba } A2 = 0.15 \\ \text{Estánd. } A1 = 0.00 & \text{Prueba } A2 = 0.40 \end{array}$$

$$\text{Entonces: } \frac{0.15 - 0.08}{0.40 - 0.00} = \frac{0.07}{0.40} = 0.175 \times 500 = 87.5 \mu\text{l/dl}$$

UIBC (Capacidad no saturada de unión del hierro)

- Rotule los tubos de ensayo en la gradilla de esta forma: "Blanco", "Estándar", "Control", "Test", etc.
- Añada 2.0 ml de reactivo de buffer UIBC a todos los tubos.
- Al "Blanco" añada 1.0 ml de agua libre de hierro. Mezcle.
- Al "Estándar" añada 0.5 ml (500 µl) de agua libre de hierro más 0.5 ml (500 µl) de Estándar. Mezcle.
- Al "Test" añada 0.5 ml (500 µl) de la muestra respectiva más 0.5 ml (500 µl) de Estándar del hierro. Mezcle.
- Ponga el espectrofotómetro a cero a 560 nm con el reactivo blanco.
- Lea y registre la absorbancia de todos los tubos (Lectura A₁).
- Añada 0.05 ml (50 µl) de Reactivo de Color Hierro a todos los tubos. Mezcle.
- Ponga todos los tubos en bañomaría a 37°C por diez (10) minutos.
- Ponga el espectrofotómetro a 0 a 560 nm con reactivo blanco.
- Lea y registre la absorbancia de todos los tubos (Lectura A₂).

* SE PUEDE USAR EL CALIBRADOR MULTI-PROPÓSITO TC PARA REMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

CALCULOS DEL UIBC

$$\left| \frac{\text{Conc. de Est.} - \left(\frac{\text{Conc. de Estánd.}}{\text{d. } A_1} \right)}{\text{UIBC } (\mu\text{g/dl})} \right|$$

Ejemplo:

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

Por lo tanto:

$$| 500 - (0.25 \times 500) | = 375 \mu\text{g/dl (UIBC)}$$

NOTA: La diferencia entre la Prueba A1 y la Prueba A2 muchas veces puede ser pequeña debido al alto grado de la no saturación de la transferian con el hierro. La muestra debe ser diluida con agua libre de hierro y re – ensayada. Multiplique el resultado por el factor de dilución.

CALCULOS

TIBC (Capacidad total de la unión del hierro):

$$\text{Nivel del hierro} + \text{UIBC} = \text{TIBC } (\mu\text{g/dl})$$

Conversión a unidades SI: $\mu\text{g/dl} \times 0.179 = \mu\text{mol/L}$

CALIBRACION

El procedimiento es calibrado con un estándar de hierro (500 µg/dl) incluido en cada kit.

CONTROL DE CALIDAD

Se deben correr rutinariamente los sueros de control con valores conocidos normales y anormales para monitorear la validez de la reacción.

VALORES ESPERADOS

Hierro, Total = 60 – 150 µg/dl

TIBC = 250 – 400 µg/dl

Saturación del hierro = 0 – 55%

Se recomienda mucho que cada laboratorio determine su rango normal para su población particular.

CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

- Linearidad:** 500 µg/dl.
Muestras con valores por encima de 500 µg/dl deben ser diluidas 1:1 con solución salina, deben ser re-analizadas y el resultado debe ser multiplicado por dos.
- Sensibilidad:** Basada en un instrumento de A = 0.001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 2 µg/dl.
- Estudio comparativo:** De un estudio realizado entre este procedimiento y uno similar para el Hierro en el Suero, resultó un coeficiente de correlación de 0.98 con una ecuación de regresión de $y = 1.0x - 4.86$.
De un estudio realizado entre este procedimiento y uno similar para UIBC resultó un coeficiente de correlación de 0.97 con una ecuación de regresión de $y = 0.86x + 56$.
- Estudio de precisión:** Hierro total.

Dentro de la corrida

De corrida a corrida

| Mean | S.D. | C.V.% |
|------|------|-------|
| 204 | 21 | 10.5 |
| 107 | 16 | 15.0 |

| Mean | S.D. | C.V.% |
|------|------|-------|
| 196 | 14 | 7.0 |
| 130 | 22 | 17.0 |

- Estudio de precisión:** UIBC:

Dentro de la corrida

De corrida a corrida

| Within Run | | | Run To Run | | |
|------------|------|-------|------------|------|-------|
| Mean | S.D. | C.V.% | Mean | S.D. | C.V.% |
| 219 | 24 | 11 | 230 | 14 | 6.1 |
| 401 | 14 | 3.5 | 402 | 13 | 3.2 |