

**USO:**

Para la determinación cuantitativa de hierro total y la capacidad de captación total de hierro en suero.

**HISTORIA DEL MÉTODO:**

El hierro existe en el suero formando un complejo con la Transferrina, una proteína transportadora.

La mayoría de los procedimientos para la determinación del hierro implicaron la disociación del hierro del complejo de hierro-proteína, precipitando las proteínas y entonces se realizaba la medida del hierro contenido en el líquido filtrado sin proteína.

Se han utilizado muchos cromógenos para la determinación incluyendo el tiocianato o-fenantrolina, el batofenantrolina y TPTZ.

En 1971 Persijn presentó un método usando el cromógeno ferrozina, descrito por Stockey. Este método no requería precipitación de proteínas y era más sensitivo que los métodos previos. El presente procedimiento es una modificación del método de Persijn.

**PRINCIPIO:**

**Hierro en suero:** el hierro enlazado a la transferrina es liberado en pH ácido y reducido de hierro sérico a hierro ferroso. Estos iones reaccionan con ferrozina para formar un complejo color violeta el cual se mide espectrofotométricamente a 560 nm.

La absorbancia medida a esta longitud de onda es proporcional a la concentración del hierro en suero.

**Capacidad de fijación del hierro (TIBC):** Una cantidad conocida de iones ferrosos se agregan al suero en un pH alcalino.

Los iones ferrosos se unen a la transferrina en sitios insaturados de enlaces de hierro. Los iones ferrosos adicionales no enlazados se miden usando la reacción de ferrozina. La diferencia entre la cantidad de iones ferrosos agregados y los iones no enlazados medidos es la capacidad de enlace de hierro insaturado (UBIC). El TIBC es igual al hierro sérico más el UIBC.

**SIGNIFICADO CLINICO:**

En muchos casos la TIBC y la concentración de hierro son necesarias para diagnósticos. Los niveles elevados indican destrucción de células rojas o síntesis de células disminuida.

- Valores bajos de hierro sérico se han visto en pérdida de sangre crónica, absorción insuficiente de hierro, y embarazo.
- Valores elevados de hierro sérico se han visto en incremento de destrucción de células rojas, decremento de síntesis de células rojas, incremento en la toma de hierro, o incremento en la liberación de hierro.
- Un incremento en el TIBC puede darse ya sea por el incremento en la producción de apotransferrina (por ejemplo: deficiencia crónica de hierro) o un incremento en la liberación de ferritina, como en necrosis hepatocelular.
- Una disminución en el TIBC puede ocurrir con cirrosis o hemocromatosis ya sea por una deficiencia en ferritina, o en nefrosis, que puede ser ocasionada por pérdida de apotransferrina.

**REACTIVOS:**

1. Reactivo Hierro Buffer: Hidroxilamina Hidroclorídrica 220mM en acetato buffer pH 4.5 con surfactante.
2. Reactivo Hierro Color: Ferrozina 16.7 mM en Hidrocloridrato de Hidroxilamina.
3. Reactivo UIBC Buffer: Tris 500mM, pH 8.1 con surfactante y azida de sodio 0.05% como preservativo
4. Estándar de hierro (500 µg/dL): Cloruro ferroso en Hidrocloridrato de Hidroxilamina

**PRECAUCIONES:**

1. Todos los reactivos son tóxicos. No pipeteé con la boca. Evite el contacto.
2. UIBC buffer contiene azida sódica que se debe eliminar con grandes volúmenes de agua.
2. Este reactivo es para diagnóstico "In Vitro".
3. Guarde los reactivos a temperatura de 2-8 °C

**DETERIORO:**

Todos los reactivos deben ser claros, la turbiedad puede indicar contaminación y el reactivo no se debe usar.

**COLECCION DEL ESPECIMEN:**

1. Se recomienda suero fresco no hemolizado.
2. Separe el suero del coagulo rápidamente.
3. Se puede utilizar plasma heparinizado. Otros anticoagulantes pueden reaccionar con el hierro.
4. El hierro en suero es estable 4 días a temperatura ambiente (15-30°C) y siete días a temperatura de 2-8°C.

**INTERFERENCIAS:**

1. Ciertas drogas y otras sustancias afectan los niveles de hierro. Vea Young.
2. El hierro de hemoglobina no reacciona con éste método por lo tanto un poco de hemólisis no afecta mucho.
3. Las muestras severamente hemolizadas contribuyen a la medición de la absorbancia y se deben de evitar.
4. Para mantener pipetas, tubos, etc. libres de hierro se debe de lavar con ácido nítrico o ácido hidroclohidrico.

**MATERIAL PROVISTO:**

Reactivo buffer de hierro  
Reactivo buffer de UIBC  
Reactivo de color  
Estándar de hierro (500 ug/dL)

**MATERIALES REQUERIDOS NO PROVISTO:**

1. Espectrofotómetro 560 nm.
2. Agua Des-ionizada libre de Hierro
3. Instrumentos de pipeteo
4. Tubos de ensayo
5. Reloj / cronómetro
6. Block Térmico/Baño María 37 °C.

**PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO:**

Vea las instrucciones específicas del aparato

**PROCEDIMIENTO MANUAL:****HIERRO TOTAL EN SUERO.**

1. Etiquete los tubos blanco, control, estándar, pacientes.
2. Agregue 2.5 ml. de Buffer de Hierro a todos los tubos. Mezcle.
3. Agregue 0.5 ml. (500 µl) de muestra a los tubos respectivos. Mezcle.  
Nota: Agregue 500 µl de agua al blanco.
4. Ponga en ceros el espectro a 560 nm con el blanco.
5. Lea la absorbancia de los tubos (Abs<sub>1</sub>).
6. Agregue 0.05 ml. (50 µl) de reactivo de color a todos los tubos y mezcle.
7. Ponga los tubos en baño María a 37°C por 10 minutos.
8. Ponga en cero el espectro a 560 nm con blanco.
9. Lea las absorbancias de los tubos. (Abs<sub>2</sub>).

**CALCULOS:**

Abs = Absorbancia

$$\frac{\text{Abs}_2 \text{ paciente} - \text{Abs}_1 \text{ paciente}}{\text{Abs}_2 \text{ estándar} - \text{Abs}_1 \text{ estándar}} * \text{Conc. De estándar} = \text{Hierro Total } (\mu\text{g/dl})$$

**UIBC (CAPACIDAD DE FIJACION DE HIERRO NO SATURADO):**

1. Identifique los tubos: blanco, estándar, control, muestra, etc
2. Añada 2.0 ml de Buffer de UIBC a los tubos.
3. Al blanco añada 1 ml de agua libre de hierro.
4. Al estándar añada 500 µL de agua libre de hierro más 500 µL de estándar. Mezcle.
5. A las pruebas añada 500 µL de las muestras respectivas más 500 µL de estándar de hierro. Mezclar.
6. Ajuste a 0 el espectrofotómetro a 560 nm con blanco de reactivo.
7. Leer y anotar las absorbancias (lectura A1).
8. Agregue 50 µL de reactivo de color a todos los tubos. Mezcle.
9. Coloque los tubos a 37 °C durante 10 minutos.
10. Ajuste a 0 el espectrofotómetro a 560 nm, con blanco de reactivo.
11. Lea y anote las absorbancias (lectura A2).

Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

$$\text{Conc. del estándar} - \frac{(\text{Abs}_2 \text{ paciente} - \text{Abs}_1 \text{ paciente})}{(\text{Abs}_2 \text{ estándar} - \text{Abs}_1 \text{ estándar})} * \text{conc. estándar} = \text{UIBC } (\mu\text{g} / \text{dl})$$

**TIBC (CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE HIERRO TOTAL)**

Nivel de hierro + UIBC = TIBC (µg / dL)

Conversión al SI µg / dl \* 0.179 = umol / L.

**CALIBRACION:**

El proceso es calibrado con estándar de Hierro 500 µg/dl o un calibrador apropiado.

**CONTROL DE CALIDAD:**

Se deben correr sueros control normal y anormal con valores conocidos rutinariamente para monitorear la validación de la reacción.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus valores de referencia

**VALORES ESPERADOS:**

Hierro Total = 60-150 µg/dl  
TIBC = 250-400 µg/dl  
Hierro saturado = 20-55 %

**LINEARIDAD:**

500µg/dl.

**FABRICADO POR:**

**POINTE SCIENTIFIC, INC.  
E.E.U.U.**