



Finalidade

Método colorimétrico direto para a determinação de ferro em soro ou plasma.

Significado clínico

O ferro encontra-se distribuído no organismo em diferentes formas que incluem: hemoglobina, ferro tissular e mioglobina. O transporte de ferro de um órgão a outro realiza-se mediante uma proteína transportadora: a apotransferrina. O complexo formado com o ferro é conhecido como transferrina.

A ferritina, localizada em quase todas as células do corpo, constitui uma reserva de ferro disponível para a formação da hemoglobina e outras proteínas que contêm o grupo heme.

A absorção de ferro é realizada principalmente no duodeno.

Tanto a ferritina como a transferrina encontram-se nas células da mucosa intestinal e ambas regulam a absorção de ferro.

As mais grandes desordens do metabolismo de ferro relacionam-se com a deficiência ou excesso. No entanto, observam-se alterações em muitas outras doenças como anemia, doenças cardiovasculares, hepatite crônica, doenças renais e infecções.

A anemia por perda de ferro representa um dos transtornos orgânicos mais frequentes, principalmente em crianças, mulheres jovens, grávidas e idosos. Também constituem causas de anemia ferropênica as úlceras gástricas ou duodenais e carcinoma de estômago.

Por outra parte, o excesso de ferro associa-se com outros desordens como hemossiderose, hemocromatose e anemia sideroblástica.

As técnicas fotométricas para a determinação de ferro em soro baseiam-se na formação de um complexo com um cromogênio, entre os quais, a ferrozina e batofenantrolina são os mais usados. Este método utiliza um agente quelante adicional, o ferene, para aumentar a sensibilidade do ensaio colorimétrico. O ferene apresenta uma elevada absorvidade molar, é mais sensível que a ferrozina e facilita a detecção de ferro.

Fundamento do método

O ferro é liberado do complexo de transferrina em meio ácido e se reduz a Fe (II) com ácido ascórbico. Logo após reage com o reagente de cor, o ferene, dando origem a um complexo de cor azul que é medido a 600 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional à concentração de ferro.

Reagentes fornecidos

A. Reagente A: solução de ácido cítrico 200 mM, ácido ascórbico 34 mM, tiouréia 100 mM e tensoativo.

B. Reagente B: solução estabilizada de ferene > 3 mM.

S. Padrão: solução de íons ferro (III) equivalente a 100 µg/dL.

Reagentes não fornecidos

- Laborcal da Laborlab.

- Água deionizada.

Instruções de uso

Reagentes Fornecidos: prontos para uso.

Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro". Evitar a ingestão e o contato com os olhos. O **Reagente A** contém tiouréia. Estudos experimentais realizados com esta droga demonstram um possível efeito carcinógeno.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Estabilidade e instruções de armazenamento

Reagentes A e B: são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data do vencimento indicada na embalagem.

Padrão: estável sob temperatura ambiente (< 25°C) até a data do vencimento indicada na embalagem.

Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

Variações nas leituras de Brancos de Reagentes e/ou Padrão, são indícios de contaminações ocasionais (água, material de vidro, etc.).

Um aumento no valor dos Brancos indicará uma contaminação com ferro.

Amostra

Soro ou plasma com heparina

a) Coleta: o paciente deve estar em jejum, sendo que as extrações devem ser realizadas sempre na mesma hora (preferencialmente de manhã) já que as oscilações fisiológicas são muito importantes durante o dia.

b) Aditivos: se a amostra é plasma deverá utilizar-se heparina como anticoagulante.

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: o soro e o plasma heparinizado podem ser conservados até uma semana sob refrigeração (2-10°C) ou até um ano a -20°C.

Interferências

Não é observada interferência pela hemoglobina até 300 mg/dL, bilirrubina conjugada até 12 mg/dL, bilirrubina não conjugada até 35 mg/dL, nem heparina até 50 UI/mL. Os triglicerídeos não interferem até 1000 mg/dL utilizando técnica automática, nem até 250 mg/dL com técnica manual. Embora hemólises ligeiras não interferem com este método, o International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) recomenda a utilização de soro livre de hemólise.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro ou analisador automático.

- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.

- Tubos ou cubetas espectrofotométricas.

- Cronômetro.

Condições de reação

- Comprimento de onda: 600 nm

- Temperatura de reação: temperatura ambiente (< 25°C)

- Tempo de reação: 5 minutos

- Volume de amostra: 200 µL

- Volume total de reação: 1,4 mL

Procedimento

Em três tubos marcados B (Branco de Reagente), P (Padrão) e D (Desconhecido), colocar:

	B	P	D
Água bidestilada	200 µL	-	-
Padrão	-	200 µL	-
Amostra	-	-	200 µL
Reagente A	1 mL	1 mL	1 mL

Misturar. Ler a absorbância do tubo D (Branco de Soro BS) em espectrofotômetro a 600 nm levando a zero o aparelho com água. Depois adicionar:

Reagente B	200 µL	200 µL	200 µL
------------	--------	--------	--------

Misturar imediatamente. Voltar a ler cada tubo em 5 minutos, levando o aparelho a zero com água.

Estabilidade da mistura de reação final

Os tubos devem ser lidos entre 5 e 30 minutos após completados os passos do procedimento.

Cálculo dos resultados

Corrigir as leituras de P e D, subtraindo os Brancos correspondentes:

$P - B = P \text{ corrigido}$

$D - (B + BS) = D \text{ corrigida}$

$Fe \text{ (µg/dL)} = D \text{ corrigida} \times f$

$$\text{onde: } f = \frac{100 \text{ µg/dL (Padrão)}}{P \text{ corrigido}}$$

* Se utilizar Laborcal, consultar os valores determinados já que são lote específico. Neste caso, a leitura do calibrador deverá se corrigir subtraindo o branco correspondente.

Exemplo:

Amostra
Branco da amostra: 0,048
D Amostra: 0.167

Absorbância da amostra (D corrigida): $0.167 - (0.048 + 0.028) = 0.167 - 0.076 = 0.091$

Padrão
Branco do padrão: 0,028
S Padrão: 0,090

Absorbância do Padrão (S corrigida): $0.090 - 0.028 = 0.062$

$$\text{Fator} = \frac{100 \text{ µg/dL}}{0.062} = 1613$$

$Fe \text{ (µg/dL)} = 0.091 \times 1613 = 147 \text{ µg/dL}$

Método de controle de qualidade

Processar dois níveis de um material de controle de qualidade (**Laborcontrol 1** e **Laborcontrol 2** da Laborlab) com concentrações conhecidas de ferro, com cada determinação.

Valores teóricos

Homens: 65 a 175 µg/dL (11,6-31,3 µmol/L)

Mulheres: 50 a 170 µg/dL (9-30,4 µmol/L)

Valores de referência

Homens: 114,6 µg/dL (20,5 µmol/L)

Mulheres: 103,3 µg/dL (18,5 µmol/L)

É recomendável que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

Conversão de unidades ao sistema SI
Ferro (ug/dL) x 0,179 = Ferro (umol/L)

Limitações do procedimento

- Vide “Interferências”.
- São necessários valores de Branco aceitáveis para antecipar as possíveis contaminações com ferro da água e os reagentes. O Branco de Reagente processado segundo a bula, não deve superar 0,05 D.O. devendo ser ainda desprezível a contribuição de água no Branco. Recomenda-se o uso de água de qualidade comprovada.
- O Reagente A pode adquirir uma leve cor amarela que não altera a sua reatividade.
- Limpeza do material: todo o material de laboratório utilizado deve estar livre de ferro, submergindo-o durante 6 horas em HCl p.a. 10%, eliminando a acidez com vários lavados com água livre de ferro. Todo o material deve ser utilizado só para a determinação de ferro.

Desempenho

a) **Reprodutibilidade:** processando segundo o documento EP15-A do (CLSI), obteve-se o seguinte:
Precisão intra-ensaio (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
61,84 ug/dL	± 0,87 ug/dL	1,40 %
116,89 ug/dL	± 0,46 ug/dL	0,39 %
236,31 ug/dL	± 0,72 ug/dL	0,31%

Precisão total (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
61,82 ug/dL	± 0,88 ug/dL	1,42 %
116,89 ug/dL	± 1,30 ug/dL	1,11 %
236,31 ug/dL	± 2,83 ug/dL	1,20 %

b) **Linearidade:** a reação é linear até 1500 ug/dL em analisa dores automáticos e até 1000 ug/dL utilizando a técnica manual.

c) **Limite de detecção:** a mínima concentração de ferro detectável utilizando o método de Iron da Laborlab é 1 ug/dL.

d) **Limite de quantificação:** a mínima concentração de ferro que pode-se quantificar com precisão e exatidão aceitáveis com o método de Iron da Laborlab é 4 ug/dL.

Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.
Para a calibração deve-se utilizar o Laborcal da Laborlab segundo os requerimentos do analisador.

Apresentação

1 x 80 mL **Reagente A**
1 x 16 mL **Reagente B**
1 x 20 mL **Padrão**
(Cód. 1770180)

2 x 50 mL **Reagente A**
2 x 10 mL **Reagente B**
(Cód. 1779613)

Referências

- I.C.S.H. - Am. J. Clin. Path. 56/4:543-545 (1971).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- Burtis,C.A.; Ashwood, E.R. - “Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry”, 5ª edición, 2001.
- Imbert-Bismut et al, - Clin. Chem., 47/11: 2059-2061, 2001.
- Tietz, N.W.; Rinker, A.D.; Morrison, S.R. - Clin. Chem. 40/4:546-551, 1994.
- Artiss, J.D. et al. - Clin. Biochem. 14/6:311-315, 1981.
- Smith, F.E. - Clin. Biochem. 17:306-310, 1984.
- NTP, National Toxicology Program, Departmen of Health and Human Service, Report of Carcinogens, 2005.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP15-A, 2001 / EP6-A, 2003 / EP17-A, 2004.

Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

SÍMBOLOS

 Este produto preenche os requisitos da Diretiva Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado na Comunidade Européia

 Uso médico-diagnóstico "in vitro"

 Conteúdo suficiente para <n> testes

 Data de validade

 Limite de temperatura (conservar a)

 Não congelar

 Risco biológico

 Volume após da reconstituição

 Conteúdo

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante

 Consultar as instruções de uso

 Calibrador

 Controle

 Controle Positivo

 Controle Negativo

 Número de catálogo



Fin y uso

Método colorimétrico directo para la determinación de hierro en suero o plasma

Significación clínica

El hierro se distribuye en el organismo de diferentes maneras, incluyendo hemoglobina, hierro tisular y mioglobina. El transporte de hierro de un órgano a otro se realiza mediante una proteína transportadora llamada apotransferrina. El complejo que forma con el hierro se conoce como transferrina.

La ferritina, localizada en casi todas las células del cuerpo, constituye una reserva de hierro disponible para la formación de la hemoglobina y otras proteínas que contienen el grupo hemo. La absorción de hierro ocurre principalmente en el duodeno. Tanto la ferritina como la transferrina están presentes en las células de la mucosa intestinal y juntas regulan la absorción de hierro.

Los mayores desórdenes del metabolismo de hierro se relacionan con su deficiencia o exceso, sin embargo, se han observado alteraciones en muchas otras enfermedades, incluyendo anemia, enfermedades cardiovasculares, hepatitis crónica, enfermedades renales e infecciones. La anemia por pérdida de hierro representa uno de los trastornos orgánicos más frecuentes, especialmente en niños, mujeres jóvenes, embarazadas y ancianos. También las úlceras gástricas o duodenales y carcinomas de estómago, constituyen causas de anemia ferropénica. Por el contrario, el exceso de hierro se asocia con otros desórdenes, como hemocromatosis y anemia sideroblástica.

Las técnicas fotométricas para la determinación de hierro en suero se basan en la formación de un complejo con un cromógeno, entre los cuales ferrozina y batofenantrolina han sido ampliamente usados.

El presente método emplea ferene, un agente quelante adicional, con el objetivo de aumentar la sensibilidad del ensayo colorimétrico. Este compuesto presenta una elevada absorptividad molar, es más sensible que ferrozina y facilita la detección de hierro.

Fundamentos del método

El hierro se libera del complejo de transferrina en medio ácido y se reduce a Fe (II) con ácido ascórbico. Seguidamente reacciona con el reactivo de color, ferene, dando un complejo color azul que se mide a 600 nm. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración de hierro.

Reactivos provistos

A. Reactivo A: solución de ácido cítrico 200 mM, ácido ascórbico 34 mM, tiourea 100 mM y tensioactivo.

B. Reactivo B: solución estabilizada de ferene > 3 mM.

S. Standard: solución de iones hierro (III) equivalente a 100 ug/dl.

Reactivos no provistos

- **Laborcal** de Laborlab.

- Agua desionizada.

Instrucciones para su uso

Reactivos Provistos: listos para usar.

Precauciones

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Evitar la ingestión y el contacto con los ojos. El Reactivo A contiene tiourea. Estudios experimentales realizados con esta droga en animales han evidenciado un posible efecto carcinogénico.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Estabilidad e instrucciones de almacenamiento

Reactivos A y B: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Standard: es estable a temperatura ambiente (< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Indicios de inestabilidad o deterioro de los reactivos

Variaciones en las lecturas de Blancos de Reactivos y/o Standard indican contaminaciones ocasionales (agua, material de vidrio, etc.).

Un aumento en el valor de los Blancos indicará una contaminación con hierro.

Muestra

Suero o plasma heparinizado

a) Recolección: el paciente debe estar en ayunas y las extracciones deben practicarse siempre a la misma hora (preferentemente de mañana) ya que las fluctuaciones fisiológicas son significativas durante el día.

b) Aditivos: en caso de utilizar plasma como muestra debe usarse heparina como anticoagulante.

c) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero o plasma heparinizado pueden conservarse una semana en refrigerador (2-10°C) o hasta un año a -20°C.

Interferencias

No se observan interferencias por hemoglobina hasta 300 mg/dl, bilirrubina conjugada hasta 12 mg/dl, bilirrubina no conjugada hasta 35 mg/dl y heparina hasta 50 UI/ml. Los triglicéridos no interfieren hasta 1000 mg/dl utilizando técnica automática y 250 mg/dl con técnica manual. Si bien hemólisis ligeras no interfieren con este método, el International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) recomienda el uso de suero libre de hemólisis. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

Material requerido (no provisto)

- Espectrofotómetro o analizador automático.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- Cronómetro.

Condiciones de reacción

- Longitud de onda: 600 nm
- Temperatura de reacción: temperatura ambiente (< 25°C)
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 200 ul
- Volumen total de reacción: 1,4 ml

Procedimiento

En tres tubos marcados B (Blanco de Reactivos), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Agua bidestilada	200 ul	-	-
Standard	-	200 ul	-
Muestra	-	-	200 ul
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar. Leer la absorbancia del tubo D (Blanco de Suero BS) en espectrofotómetro a 600 nm llevando a cero el aparato con agua. Luego agregar:

Reactivo B	200 ul	200 ul	200 ul
------------	--------	--------	--------

Mezclar inmediatamente. Volver a leer cada tubo a los 5 minutos, llevando el aparato a cero con agua.

Estabilidad de la mezcla de reacción final

Los tubos deben ser leídos entre 5 y 30 minutos luego de completados los pasos del procedimiento.

Cálculo de los resultados

Corregir las lecturas de S y D, restándoles los Blancos correspondientes:

$S - B = S \text{ corregida}$

$D - (B + BS) = D \text{ corregida}$

$Fe \text{ (ug/dl)} = D \text{ corregida} \times f$

donde: $f = \frac{100 \text{ ug/dl (Standard)}}{S \text{ corregida}}$

* Si se emplea **Laborcal** consultar los valores asignados debido a que son lote específico. En este caso, la lectura del calibrador deberá corregirse restando el blanco correspondiente.

Ejemplo:

Muestra

Blanco de muestra: 0,048

D Muestra: 0.167

Absorbancia de muestra (D corregida): $0.167 - (0.048 + 0.028) = 0.167 - 0.076 = 0.091$

Standard

Blanco del standard: 0,028

S Standard: 0,090

Absorbancia del Standard (S corregida): $0.090 - 0.028 = 0.062$

Factor = $\frac{100 \text{ ug/dl}}{0.062} = 1613$

$Fe \text{ (ug/dl)} = 0.091 \times 1613 = 147 \text{ ug/dl}$

Método de control de calidad

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Laborcontrol 1** y **Laborcontrol 2** de Laborlab) con concentraciones conocidas de hierro, con cada determinación.

Valores teóricos

Hombres: 65 a 175 ug/dl (11,6-31,3 umol/l)

Mujeres: 50 a 170 ug/dl (9-30,4 umol/l)

Valores de referencia

Hombres: 114,6 ug/dl (20,5 umol/l)

Mujeres: 103,3 ug/dl (18,5 umol/l)

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Conversión de unidades al sistema SI
Hierro (ug/dl) x 0,179 = Hierro (umol/l)

Limitaciones del procedimiento

- Ver "Interferencias"
- Valores de Blanco aceptables son necesarios para prevenir posibles contaminaciones del agua y los reactivos con hierro. El Blanco de Reactivos, procesado de acuerdo al Manual de Instrucciones, no debe ser superior a 0,05 D.O. debiendo ser además despreciable la contribución del agua en dicho Blanco. Para ello se recomienda el uso de agua de calidad comprobada.
- El Reactivo A puede adquirir un leve color amarillo con el transcurso del tiempo que no afecta su reactividad.
- Limpieza del material: todo el material de laboratorio empleado debe estar libre de hierro, para ello debe ser sumergido durante al menos durante 6 horas en HCl 10%, eliminando la acidez mediante numerosos lavados con agua libre de hierro. Todo el material debe ser empleado exclusivamente para la determinación de hierro.

Performance

a) **Reproducibilidad:** procesando de acuerdo al documento EP15-A del CLSI (ex-NCCLS), se obtuvo lo siguiente:

Precisión intraensayo (n = 20)

Nivel	D.S.	C.V.
61,84 ug/dl	± 0,87 ug/dl	1,40 %
116,89 ug/dl	± 0,46 ug/dl	0,39 %
236,31 ug/dl	± 0,72 ug/dl	0,31 %

Precisión total (n = 20)

Nivel	D.S.	C.V.
61,82 ug/dl	± 0,88 ug/dl	1,42 %
116,89 ug/dl	± 1,30 ug/dl	1,11 %
236,31 ug/dl	± 2,83 ug/dl	1,20 %

b) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 1500 ug/dl en autoanalizadores y hasta 1000 ug/dl en técnica manual.

c) **Límite de detección:** la mínima concentración de hierro detectable, utilizando el método de **Iron** de Laborlab es de 1 ug/dl.

d) **Límite de cuantificación:** la mínima concentración de hierro que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables con el método de **Iron** de Laborlab es de 4 ug/dl.

Parámetros para analizadores automáticos

Para las instrucciones de programación debe consultarse el Manual del Usuario del analizador en uso. Para la calibración debe emplearse **Laborcal** de Laborlab de acuerdo a los requerimientos del analizador.

Presentación

1 x 80 mL **Reactivo A**
1 x 16 mL **Reactivo B**
1 x 20 mL **Standard**
(Cód. 1770180)

2 x 50 mL **Reactivo A**
2 x 10 mL **Reactivo B**
(Cód. 1779613)

Bibliografía

- I.C.S.H. - Am. J. Clin. Path. 56/4:543-545 (1971).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCPress, 5th ed., 2000.
- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - "Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry", 5ª edición, 2001.
- Imbert-Bismut et al, - Clin. Chem., 47/11: 2059-2061, 2001.
- Tietz, N.W.; Rinker, A.D.; Morrison, S.R. - Clin. Chem. 40/4:546-551, 1994.
- Artiss, J.D. et al. - Clin. Biochem. 14/6:311-315, 1981.
- Smith, F.E. - Clin. Biochem. 17:306-310, 1984.
- NTP, National Toxicology Program, Department of Health and Human Service, Report of Carcinogens, 2005.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP15-A, 2001 / EP6-A, 2003 / EP17-A, 2004.

SÍMBOLOS



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Cáustico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control Negativo



Número de catálogo



Produtos para Laboratórios Ltda.
Estrada do Capão Bonito, 489
Guarulhos - SP- Brasil - CEP: 07263-010
CNPJ: 72.807.043/0001-94
Atendimento ao cliente:
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277
sac@laborlab.com.br
www.laborlab.com.br