

Método

Colorimétrico (Ferrozine®).

Finalidade

Método para a determinação de Ferro em amostras de soro por reação de ponto final.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

Princípio

O íon férrico presente na amostra e unido à transferrina é libertado por ação do guanidínio e reduzido a ferro por ácido ascórbico. O íon ferroso forma um complexo colorido com o Ferrozine que se quantifica por espectrofotometria.

Significado Clínico

O ferro é distribuído no corpo em vários compartimentos diferentes: hemoglobina, mioglobina, tecidos (principalmente no fígado, baço, medula óssea). Apenas 0,1% do ferro total do corpo está presente no plasma.

A concentração sérica de ferro é afetada por muitas condições fisiológicas ou patológicas. A variação do dia de hoje é bastante marcada em pessoas saudáveis.

As principais alterações do metabolismo do ferro são a deficiência de ferro e a sobrecarga do mesmo. No entanto, podemos encontrar alterações de ferro em diversas doenças. O ferro sérico encontra-se aumentado em casos de hemocromatose, na intoxicação aguda por ferro, na cirrose ativa e hepatite aguda.

A concentração de ferro no soro está diminuída em muitos casos, mas não em todos os pacientes com anemia por deficiência de ferro e em distúrbios inflamatórios crônicos. A medição do ferro sérico não deve ser usada como teste para identificação de deficiência de ferro. O diagnóstico clínico não deve ser feito com base nos resultados de um único teste, mas deve integrar dados clínicos e laboratoriais.

Reagentes

Reagente Nº 1 – Tampão: Tampão 410 mmol/L (pH 4,5), Tiuréia 29 mmol/L e surfactantes.

Reagente Nº 2 – Reagente de Cor: Tampão 60 mmol/L (pH 4,0), Ferrozine 12 mmol/L, Ácido Ascórbico 30 mmol/L, Azida Sódica 0,5 g/L. (pH 4,0).

Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto, quando conservados na temperatura recomendada (2 a 8°C), bem vedados e se evitado de contaminação durante o uso.

Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados em temperatura que não exceda 30°C, até um limite de 120 horas. **Não congelar.**

Cuidados Especiais e Precauções

- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- Reagente com presença de material particulado, turbidez, absorvância do branco ao longo do limite indicado em "Parâmetros do ensaio".

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analisador bioquímico automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras, estantes;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro;
- Banho-maria.

Amostra

Soro. O Ferro é estável por 6 dias entre 2 e 8 °C ou 4 dias entre 15 e 25 °C, quando livres de contaminação.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos devem-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências e Limitações

Amostras devem ser colhidas em jejum e pela manhã para evitar as variações diurnas do ferro. Muitas vezes a contaminação pode ocorrer na coleta, armazenamento e manipulação da amostra.

A concentração de ferro no sangue pode ser alterada em função da idade, sexo, período menstrual, uso de contraceptivos orais e de estrogênios. Estudos demonstram que algumas drogas como: Anovulatórios, Estrógenos, Álcool e Cloranfenicol elevam os níveis de ferro sérico. Outras como: Cortisona, Corticotropina e ácido acetilsalicílico, reduzem os níveis de ferro sérico.

Concentrações de triglicérides até 1061 mg/dL, ácido ascórbico até 20,0 mg/dL e Bilirrubina até 18,0 mg/dL não produzem interferências significativas. *Presença de hemoglobina mesmo discreta produz interferências significativas nas amostras.*

Preparação dos Reagentes

Os reagentes estão prontos para uso.

Procedimento Técnico

Equipamentos Automáticos

Para uso em analisadores automáticos, verificar o protocolo de automação no site www.bioanalitica.com.br ou através do SAC.

Nota: Recomendamos o uso do Calibrador – Ref. BA052 para calibração. Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118.

- Deixar os reagentes atingirem a temperatura de reação.
- Pipetar em tubos de ensaio:

	Branco	Teste	Calibrador
Reagente (1)	800 µL	800 µL	800 µL
Amostra		100 µL	
Calibrador			100 µL
Água deionizada	100 µL		

- Homogeneizar e determinar as absorvâncias do teste e calibrador em 560nm (540 a 580 nm), acertando o zero com água deionizada. Obtém-se a absorvância A₁.

	Branco	Teste	Calibrador
Reagente (2)	200 µL	200 µL	200 µL

- Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.
- Determinar as absorvâncias do teste e calibrador em 560 nm (540 a 580 nm), acertando o zero com o branco. Obtém-se a absorvância A₂.

Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para leitura fotométrica.

Cálculos

A leitura A₁ do teste e do calibrador deve ser corrigida para o volume final da reação obtendo-se A_{1cor}.

$$\text{Teste } A_{1\text{cor}} = \text{Teste } A_1 \times 0,82$$

$$\text{Calibrador } A_{1\text{cor}} = \text{Calibrador } A_1 \times 0,82$$

$$\text{Ferro } (\mu\text{g/dL}) = \frac{\text{Teste } (A_2 - A_{1\text{cor}})}{\text{Calibrador } (A_2 - A_{1\text{cor}})} \times \text{Ccal}$$

Ccal: Concentração do Calibrador.

Exemplo:

Teste

$$A_1 = 0,037$$

$$A_2 = 0,082$$

$$A_{1\text{cor}} = 0,037 \times 0,82 = 0,030$$

Calibrador

$$A_1 = 0,017$$

$$A_2 = 0,115$$

$$A_{1\text{cor}} = 0,017 \times 0,82 = 0,014$$

Concentração Calibrador: 245 µg/dL.

$$\text{Ferro } (\mu\text{g/dL}) = \frac{0,082 - 0,030}{0,115 - 0,014} \times 245 = 126$$

Características do Desempenho

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = 11,675 + 0,927* Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,991.

Sensibilidade

Uma amostra não contendo Ferro, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média e o desvio padrão foram calculados a partir de 20 determinações. A sensibilidade que indica o limite de detecção do método é 2,5271 µg/dL.

Linearidade

A reação é linear até 1000 µg/dL. Para amostras com valores acima de 30 mg/dL, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 150 mmol/L (0,85%), repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (µg/dL)	45,49	79,10	197,58
Desvio Padrão (µg/dL)	2,83	2,11	3,52
Coeficiente de Variação (%)	6,22	2,66	1,78

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (µg/dL)	15,01	103,30	191,88
Desvio Padrão (µg/dL)	0,43	4,95	7,08
Coeficiente de Variação (%)	2,86	4,79	3,69

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Soro

Recém-nascidos: 100 - 250 µg/dL

Lactente: 40 - 100 µg/dL

Crianças: 50 - 120 µg/dL

Homens: 65 - 170 µg/dL

Mulheres: 50 - 170 µg/dL

Conversão: Unidades convencionais (µg/dL) x 0,179 = Unidade do SI (µmol/L).

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles e calibradores da Bioanalítica que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
 - A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens /cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens.
- No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- Stokey LL. Ferrozine-A new spectrophotometric reagent for iron. Anal Chem 1970; 42: 779-81.
- Itano M. Serum Iron Survey. Am J Clin Pathol 1978; 70: 516-522.
- Artiss JD, Vinogradov S, Zak B. Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. Clin Biochem 1981; 14: 311-315.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACCC Press, 2000.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACCC Press, 2001.
- Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA208-50	50 mL	1 x 40 mL	1 x 10 mL
BA208-100	100 mL	2 x 40 mL	2 x 10 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União

CEP: 31160-360 - Belo Horizonte MG - Brasil

Tel. +55 31 3657-0051

www.bioanalitica.com.br

E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br

CNPJ: 20.264.948/0001-61 - Indústria Brasileira

SAC: 0800 006 8111

E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.