

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 guanidinio 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 excede 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 ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- Reagente com presença de material particulado, turbidez, absorbância 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 produzem 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.

1. Deixar os reagentes atingirem a temperatura de reação.

2. 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		

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

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

4. 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.

5. Determinar as absorbâncias do teste e calibrador em 560 nm (540 a 580 nm), acertando o zero com o branco. Obtém-se a absorbância 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 A1cor.

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

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

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

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.

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

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 µg/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

1. Stookey LL. Ferrozine-A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* 1970; 42: 779- 81.
2. Itano M. Serum Iron Survey. *Am J Clin Pathol* 1978; 70: 516-522.
3. Artiss JD, Vinogradov S, Zak B. Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. *Clin Biochem* 1981; 14: 311-315.
4. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AAC Press, 2000.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AAC Press, 2001.
7. 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.