



Fer-color

AA

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

SIGNIFICACION CLINICA

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 hemosiderosis, 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 METODO

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

- **Calibrador A plus** de Wiener lab.
- 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) Sustancias interferentes conocidas: 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.

d) 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.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

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

CONDICIONES DE REACCION

- 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 REACCION FINAL

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

CALCULO DE LOS RESULTADOS

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

S - B = S corregida

D - (B + BS) = D corregida

Fe (ug/dl) = D corregida x f

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

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

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de hierro, con cada determinación.

VALORES TEORICOS

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

En un grupo de 20 mujeres y 20 varones sanos, con edades oscilando entre los 18 y 51 años, se halló un rango de 55 a 175 ug/dl* con los siguientes promedios:

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

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

*Valores de referencia extraídos de archivos de Wiener lab. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

Hierro (ug/dl) x 0,179 = Hierro (umol/l)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 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 **Fer-color AA líquida** 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 **Fer-color AA líquida** es de 4 ug/dl.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación debe consultarse el Manual del Usuario del analizador en uso. Para la calibración debe emplearse **Calibrador A plus** de Wiener lab. de acuerdo a los requerimientos del analizador.

PRESENTACION

120 ml: - 1 x 100 ml Reactivo A
- 1 x 20 ml Reactivo B
- 1 x 20 ml Standard
(Cód. 1492360)

120 ml: - 2 x 50 ml Reactivo A
- 2 x 10 ml Reactivo B
(Cód. 1009285)

120 ml: - 2 x 50 ml Reactivo A
- 2 x 10 ml Reactivo B
(Cód. 1009336)

120 ml: - 2 x 50 ml Reactivo A
- 2 x 10 ml Reactivo B
(Cód. 1009613)

120 ml: - 2 x 50 ml Reactivo A
- 2 x 10 ml Reactivo B
(Cód. 1009921)*

BIBLIOGRAFIA

- 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, 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

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



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



Fer-color

AA

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 hemo. 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.

Os 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 freqüentes, 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 ferrozine 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 ferrozine 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

- **Calibrador A plus** da Wiener lab.
- Água desionizada.

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 demonstraram 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) Substâncias interferentes conhecidas: não se observa 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 triglicédeos 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.

d) 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.

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 ul
- 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 ul	-	-
Padrão	-	200 ul	-
Amostra	-	-	200 ul
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 ul	200 ul	200 ul
------------	--------	--------	--------

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:

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

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

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

$$100 \text{ ug/dl (Padrão)}^*$$

$$\text{onde: } f = \frac{\text{Padrão}}{P \text{ corrigido}}$$

* Se utilizar **Calibrador A plus**, consultar os valores assinados já que são lote específico. Neste caso, a leitura do calibrador deverá ser corrigir subtraindo o branco correspondente.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Processar dois níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com concentrações conhecidas de ferro, com cada determinação.

VALORES TEÓRICOS

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

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

VALORES DE REFERÊNCIA

Em um grupo de 20 mulheres e 20 homens saudáveis, com idades entre os 18 e 51 anos, foram encontradas faixas de 55 a 175 ug/dl* com as seguintes médias:

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

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

*Valores de referência extraídos de arquivos da Wiener lab. 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

- 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 analisadores automáticos e até 1000 ug/dl utilizando a técnica manual.

c) Limite de detecção: a mínima concentração de ferro detectável utilizando o método de **Fer-color AA líquida** 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 **Fer-color AA líquida** 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 **Calibrador A plus** da Wiener lab. segundo os requerimentos do analisador.

APRESENTAÇÃO

120 ml: - 1 x 100 ml Reagente A
- 1 x 20 ml Reagente B
- 1 x 20 ml Padrão

(Cód. 1492360)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagente A
- 2 x 10 ml Reagente B

(Cód. 1009285)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagente A
- 2 x 10 ml Reagente B

(Cód. 1009336)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagente A
- 2 x 10 ml Reagente B

(Cód. 1009613)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagente A
- 2 x 10 ml Reagente B

(Cód. 1009921)*

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 edição, 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

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



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



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após a 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



Fer-color

AA

Direct colorimetric method for iron determination in serum or plasma

SUMMARY

Iron is distributed in the body in different ways, including hemoglobin, tissue iron and myoglobin. Iron transport from one organ to another is performed by a carrier protein called apotransferrin. This complex is known as transferrin.

Ferritin, present in most cells, constitutes an iron reservoir available for hemoglobin formation and further proteins containing the hemo group. Iron absorption is mainly produced in the duodenum. Both ferritin and transferrin are present in the intestinal mucous membrane cells and together they regulate iron absorption.

The main metabolism disorders are related to their deficiency or excess; however, alterations have been observed in many other diseases, including anemia, cardiovascular diseases, chronic hepatitis, renal diseases and infections.

One of the most frequently organic disorders found in clinical practice is the anemia caused by iron loss. It is usually observed in children, young and pregnant women, and the elderly. Gastric or duodenal ulcers and stomach carcinoma may also lead to ferroperenic anemia.

On the contrary, the iron excess is associated to other disorders such as hemosiderosis, hemochromatosis and sideroblastic anemia.

Photometric techniques for iron determination in serum are based on a chromogen complex formation, among which ferrozine and bathophenanthroline have been widely used. The present method uses ferene, and additional chelating agent, to increase the colorimetric assay sensitivity. This compound presents a high molar absorptivity, is more sensitive than ferrozine and facilitates iron detection.

PRINCIPLE

Serum iron is released from the transferrin complex in acid medium and is reduced to Fe (II) with ascorbic acid. Then it reacts with the color reagent, ferene, yielding a blue color complex measured at 600 nm. The obtained absorbance is directly proportional to the iron concentration.

PROVIDED REAGENTS

A. Reagent A: 200 mM citric acid solution, 34 mM ascorbic acid, 100 mM thiourea and surfactant.

B. Reagent B: ferene stabilized solution > 3 mM.

S. Standard*: ferric ions solution (III) equivalent to 100 ug/dl.

NON-PROVIDED REAGENTS

- Wiener lab. **Calibrador A plus.**
- Deionized water.

INSTRUCTION FOR USE

Provided Reagents: ready to use.

WARNINGS

Reagents are for "in vitro" diagnostic use. Avoid ingestion and direct contact with eyes.

Reagent A contains thiourea. Research studies performed in animals using this drug have shown a possible carcinogenic effect.

Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

All reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Reagents A and B: stable at 2-10°C until the expiration date stated on the box.

Standard: stable at room temperature (< 25°C) until the expiration date stated on the box.

INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

Variations in Reagent Blank and/or Standard readings indicate occasional contamination (water, glassware, etc.). Any increase in Blank values exhibits iron contamination.

SAMPLE

Serum or heparinized plasma

a) Collection: the patient must be fasting and withdrawals should be performed always at the same time (preferably in the morning) since physiological fluctuations are significant during the day.

b) Additives: use heparin as anticoagulant whenever plasma is used as sample.

c) Known interfering substances: no interference has been observed with hemoglobin up to 300 mg/dl, conjugated bilirubin up to 12 g/dl and heparin up to 50 IU/ml. Triglycerides do not interfere until a concentration of 1000 mg/dl using autoanalyzer and 250 mg/dl by manual procedure.

Although light hemolysis does not interfere with this method, the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) recommends the use of hemolysis free serum. See Young, D.S. in References for effect of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: serum or heparinized plasma may be stored up to one week at 2-10°C or up to one year at -20°C.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Spectrophotometer or autoanalyzer.
- Micropipettes and pipettes for measuring the stated volumes.
- Spectrophotometric tubes or cuvettes.
- Stopwatch.

ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 600 nm
- Reaction temperature: room temperature (< 25°C)
- Reaction time: 5 minutes
- Total reaction volume: 1.4 ml

PROCEDURE

In three labeled tubes: B (Reagent Blank), S (Standard) and U (Unknown) place as follow:

	B	S	U
Bidistilled water	200 ul	-	-
Standard	-	200 ul	-
Sample	-	-	200 ul
Reagent A	1 ml	1 ml	1 ml

Mix. Measure absorbance of U Tube (Serum Blank: BB) in spectrophotometer at 600 nm setting the instrument to zero with water. Then add:

Reagent B	200 ul	200 ul	200 ul
------------------	--------	--------	--------

Mix at once. Remeasure each tube after 5 minutes, setting the instrument to zero with water.

STABILITY OF FINAL REACTION

Tubes must be read within 5 and 30 minutes after completing the procedure steps.

CALCULATIONS

Correct S and U readings, subtracting the corresponding Blanks:

S - B = corrected S

U - (B + SB) = corrected U

Fe (ug/dl) = corrected U x f

$$\text{where: } f = \frac{100 \text{ ug/dl (Standard)*}}{\text{corrected S}}$$

* If **Calibrador A plus** is used, refer to the designed values since they are lot-specific. In this case, the calibrator reading should be corrected subtracting the corresponding blank.

QUALITY CONTROL METHOD

Test two levels of a quality control material (**Standatrol S-E 2 niveles**) with known iron concentration for each determination.

THEORETICAL VALUES

Men: 65 to 175 ug/dl (11.6 - 31.3 umol/l)

Women: 50 to 170 ug/dl (9 - 30.4 umol/l)

REFERENCE VALUES

Among a group of 20 healthy women and 20 healthy men, between 18 and 51 years of age, a range of 55-175 ug/dl* was observed, obtaining the following mean values:

Men: 114.6 ug/dl (20.5 umol/l)

Women: 103.3 ug/dl (18.5 umol/l)

* Reference values obtained from Wiener lab. records. Each laboratory should establish its own references values.

SI SYSTEM UNITS CONVERSION

Iron (ug/dl) x 0.179 = Iron (umol/l)

PROCEDURE LIMITATIONS

- Acceptable Blank values require prevention from possible water and reagent contamination with iron. The Reagent Blank, tested according to the packaged insert, should not be higher than 0.05 O.D. The water contribution to the blank should also be insignificant. Hence, the use of proven quality water is recommended.
- Reagent A may developed a slight yellowish color in time, which does not affect its reactivity.
- Material cleaning process: the labware used should be iron-free, submerge it for 6 hours into 10% HCl, eliminating the acidity with numerous washing steps using iron-free water. This material should be exclusively used for iron determination.

PERFORMANCE

a) Reproducibility: using CLSI (former NCCLS) EP15-A document as guideline, the following results were obtained:

Intra-assay precision (n = 20)

Level	S.D.	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 %

Total precision (n = 20)

Level	S.D.	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) Linearity: reaction is linear up to 1500 ug/dl in auto-analyzers and up to 1000 ug/dl using the manual technique.

c) Detection limit: the minimum detectable iron concentration using **Fer-color AA líquida** method is 4 ug/dl.

d) Quantification limit: the minimum iron concentration that may be quantitatively determined with acceptable precision and accuracy using **Fer-color AA líquida** method is 4 ug/dl.

PARAMETERS FOR AUTOANALYZERS

For programming instructions check the user manual of the autoanalyzer in use. For calibration, Wiener lab. **Calibrador A plus** should be used, according to the autoanalyzer requirements.

WIENER LAB. PROVIDES

120 ml: - 1 x 100 ml Reagent A
- 1 x 20 ml Reagent B
- 1 x 20 ml Standard

(Cat. N°: 1492360)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagent A
- 2 x 10 ml Reagent B

(Cat. N°: 1009285)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagent A
- 2 x 10 ml Reagent B

(Cat. N°: 1009336)

120 ml: - 2 x 50 ml Reagent A
- 2 x 10 ml Reagent B

(Cat. N°: 1009613)

120 ml : - 2 x 50 ml Reagent A
- 2 x 10 ml Reagent B

(Cat. N°: 1009921)*

REFERENCES

- 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, 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.

SYMBOLS

The following symbols are used in the packaging for Wiener lab. diagnostic reagents kits.

 This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices

 Authorized representative in the European Community

 "In vitro" diagnostic medical device

 Contains sufficient for <n> tests

 Use by

 Temperature limitation (store at)

 Do not freeze

 Biological risks

 Volume after reconstitution

 Contents

 Batch code

 Manufactured by:

 Harmful

 Corrosive / Caustic

 Irritant

 Consult instructions for use

 Calibrator

 Control

 Positive Control

 Negative Control

 Catalog number



Nr kat.: 1492360 Nr kat.: 1009613
 Nr kat.: 1009285 Nr kat.: 1009921
 Nr kat.: 1009336

Fer-color

AA

Bezpośrednia metoda kolorymetryczna do oznaczania
 żelaza w surowicy krwi lub osoczu

WSTĘP

Żelazo rozmieszczone jest w organizmie w zróżnicowany sposób m. in. w hemoglobinie, jako żelazo tkankowe i w mioglobinie. Przenoszone jest przez białkowy nośnik zwany apotransferyną. Kompleks białka z żelazem jest znany jako transferyna. Ferrytyna jest obecna w większości komórek i stanowi rezerwar żelaza dostępny dla tworzenia hemoglobiny i innych białek zawierających grupę hemową. Wchłanianie żelaza zachodzi głównie w dwunastnicy. Zarówno ferrytyna jak i transferyna są obecne w komórkach błony śluzowej jelit i razem biorą udział w regulacji wchłaniania. Główne zaburzenia metaboliczne są związane z niedoborem lub nadmiarem; jakkolwiek zmiany w poziomie żelaza obserwuje się w wielu innych zaburzeniach takich jak astma, choroby sercowo-naczyniowe, przewlekłe zapalenie wątroby, choroby nerek i infekcje.

Jednym z najczęstszych zaburzeń organicznych w praktyce klinicznej jest niedokrwistość z niedoboru żelaza. Zwykle występuje u dzieci, młodzieży i kobiet w ciąży, jak również u osób starszych. Wrzody żołądka lub dwunastnicy a także rak żołądka może również prowadzić do niedokrwistości z niedoboru żelaza. Z drugiej strony nadmiar żelaza występuje w takich zaburzeniach jak: hemosyderoza, hemochromatoza i anemia sideroblastyczna.

Metody fotometryczne oznaczania żelaza w surowicy krwi są oparte na tworzeniu kompleksu barwnego. Najczęściej używane są ferrozyna i batofenantrolina. W opisywanej metodzie zastosowano ferene jako dodatkowy czynnik chelatujący aby zwiększyć czułość pomiaru kolorymetrycznego. Ten składnik dzięki swej wysokiej molarnej absorpcji jest bardziej czuły niż ferrozyna i ułatwia wykrywanie żelaza.

ZASADA DZIAŁANIA

Żelazo w surowicy krwi jest uwalniane z kompleksu transferyny w środowisku kwaśnym i zredukowane do żelaza Fe (II) przy pomocy kwasu askorbinowego. Następnie reaguje z barwnym odczynnikiem ferene zmieniając się w kompleks o błękitnym zabarwieniu. Pomiaru barwy reakcji dokonuje się przy długości fali 600 nm. Otrzymana absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia żelaza.

DOSTARCZANE ODCZYNNIKI

A. Odczynnik A: 200 mM kwasu cytrynowego, 34 mM kwasu askorbinowego, 100 mM tiomocznika i surfaktantu.

B. Odczynnik B: stabilizowany roztwór ferene > 3 mM.

S. Próba wzorcowa*: roztwór jonów żelazowych (III) odpowiednik dla 100 ug/dl.

NIEDOSTARCZONE ODCZYNNIKI

- Calibrador A plus Wiener lab.
- Woda dejonizowana.

INSTRUKCJA UŻYCIA

Dostarczane odczynniki: gotowe do zastosowania.

OSTRZEŻENIA

Odczynniki do diagnostyki in vitro. Odczynnik A zawiera tiomocznik. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano prawdopodobne działanie karcynogenne. R45: może powodować raka. S24/25: unikać kontaktu z oczami i skórą.

Stosować odczynniki zgodnie z procedurami dla laboratoriów klinicznych. Wszystkie odczynniki i materiał badany należy odrzucać zgodnie z lokalnymi przepisami.

TRWAŁOŚĆ I WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Odczynniki A i B: trwałe w temp. 2-10°C do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu.

Próba wzorcowa: trwała w temp. pokojowej (< 25°C) do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu.

BRAK TRWAŁOŚCI I POGORSZENIE JAKOŚCI ODCZYNNIKÓW

Różnice w odczytach próbek ślepych i/lub próbek wzorcowych wskazują na zanieczyszczenie (wodą, szkła, itp.). Jakkiekolwiek wartości podniesione w zakresie próby ślepej wskazują na zanieczyszczenie żelazem.

MATERIAŁ BADANY

Surowica krwi lub heparynizowane osocze

a) Pobranie: pacjent ma być na czczo a pobory dokonane w tym samym czasie, najlepiej rano ze względu na fizjologiczne znaczące zmiany w ciągu dnia.

b) Substancje dodatkowe: w przypadku osocza zastosować heparynę jako antykoagulant.

c) Znane interakcje: nie obserwowano interakcji przy poziomie hemoglobiny do 300 mg/dl, skoniugowanej bilirubiny do 12 g/dl oraz heparyny do 50 IU/ml. Trójglicerydy nie wpływają na badanie do stężenia 1000 mg/dl przy zastosowaniu analizatora automatycznego oraz 250 mg/dl przy metodzie ręcznej.

Mimo że lekka hemoliza nie daje interferencji, w tej metodzie zaleca się zgodnie z rekomendacjami International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) używać surowicy wolnej od hemolizy. Sprawdź źródło: Young, D.S.

w sprawie wpływu leków w tej metodzie

d) Trwałość i instrukcja przechowywania: surowica lub heparynizowane osocze mogą być przechowywane przez tydzień w temperaturze 2-10°C lub przez rok zamrożone w temperaturze -20°C.

WYMAGANE MATERIAŁY I SPRZĘT (niedostarczane)

- Spektrofotometr lub analizator automatyczny.
- Mikropipety lub pipety do pomiaru objętości.
- Próbkę do spektrofotometru lub kuwety.
- Stoper.

WARUNKI DLA PRZEPROWADZENIA TESTU

- Długość fali: 600 nm
- Temperatura reakcji: temperatura pokojowa (< 25°C)
- Czas reakcji: 5 minut
- Całkowita objętość reakcji: 1,4 ml

PROCEDURA

W trzech oznaczonych odpowiednio próbkach: B (Odczynnik ślepy), S (Próba wzorcowa) i U (Próba nieznana) umieścić odpowiednio:

	B	S	U
Woda podwójnie destylowana	200 ul	-	-
Próba wzorcowa	-	200 ul	-
Materiał badany	-	-	200 ul
Odczynnik A	1 ml	1 ml	1 ml

Wymieszać. Ustawić spektrofotometr na zero na wodzie i odczytać absorbancję próbki U (Surowica Ślepa:SB) przy długości fali 600 nm. Następnie dodać:

Odczynnik B	200 ul	200 ul	200 ul
--------------------	--------	--------	--------

Wymieszać raz. Ustawić aparat na zero i odczytać pomiar próbek ponownie po 5 minutach.

TRWAŁOŚĆ KOŃCOWEJ REAKCJI

Próbki powinny zostać odczytane w czasie 5-30 minut od zakończenia procedury badania.

OBLICZENIA

Dokonać korekty w odczytach S i U, odejmując odpowiednie próby ślepe:

S - B = skorygowane S

U - (B + SB) = skorygowane U

Fe (ug/dl) = skorygowane U x f

gdzie: $f = \frac{100 \text{ ug/dl (Próba wzorcowa)*}}{\text{skorygowane S}}$

* Przy zastosowaniu **Calibrador A plus** należy podstawić wartości podane, które są zależne od serii. W tym przypadku odczyty kalibratora powinny być skorygowane poprzez odjęcie odpowiedniej próby ślepej.

METODA KONTROLI JAKOŚCI

W trakcie przeprowadzania badania, należy przeprowadzić analizę na dwóch poziomach (Standatrol S-E 2 niveles) ze znanym stężeniem żelaza dla każdego oznaczenia.

TEORETYCZNY ZAKRES WARTOŚCI

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

Kobiety: 50 do 170 ug/dl (9 - 30,4 umol/l)

WARTOŚCI REFERENCYJNE

Na podstawie obserwacji grupy 20 zdrowych kobiet i 20 zdrowych mężczyzn, w przedziale wiekowym 18-51 lat mających zakres wartości 55-175 ug/dl*, określono następujące średnie wartości:

Mężczyźni: 114,6 ug/dl (20,5 umol/l)

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

*Zakres wartości referencyjnych uzyskano z dokumentacji Wiener lab.

Zaleca się by każde laboratorium ustaliło własne zakresy i wartości referencyjne.

KONWERSJA JEDNOSTEK SI

Żelazo (ug/dl) x 0.179 = Żelazo (umol/l)

OGRANICZENIA PROCEDURY

- Dopuszczalne wartości Próby ślepej: oznaczanie oligoelementów wymaga zapobiegania przed zanieczyszczeniem wody i odczynnika. Zgodnie z umieszczoną informacją na ulotce wartość Próby ślepej odczynnika nie może być wyższa niż 0,05 O.D. Dodanie wody do próby ślepej również nie powinno być znaczące. Stąd zaleca się zastosowanie wody o sprawdzonej jakości.

- Odczynnik A może przybrać z czasem jasno żółtą barwę, nie wpływa to negatywnie na reakcję.

- Procedura czyszczenia sprzętu: używany sprzęt laboratoryjny powinien być wolny od żelaza, należy go zanurzyć na 6 godzin w 10% HCl, a następnie wielokrotnie płukać wodą pozbawioną żelaza w celu wypłukania kwasowości. Materiał użyty powinien być wysokiej jakości i wolny od żelaza.

CHARAKTERYSTYLA TESTU

a) Powtarzalność: na podstawie wytycznych dokumentu CLSI (wcześniej NCCLS) EP15-A otrzymano następujące wartości:

Precyzja w trakcie badania (n = 20)

Poziom	S.D.	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 %

Całkowita precyzja (n = 20)

Poziom	S.D.	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) Linijność: reakcja jest linijna w analizatorach automatycznych do wartości 1500 ug/dl a w metodzie manualnej

do 1000 ug/dl.

c) Graniczna wykrywalność: minimalne wykrywalne stężenie żelaza w metodzie Fer-color AA líquida wynosi 4 ug/dl.

d) Graniczna ilość oznaczana: najmniejsze stężenie żelaza, które może zostać oznaczone przy pomocy metody Fer-color AA líquida i z zachowaniem precyzji i dokładności wynosi 4 ug/dl.

PARAMETRY DLA ANALIZATORÓW AUTOMATYCZNYCH

Należy zapoznać się z instrukcją obsługi urządzenia w celu programowania analizatorów automatycznych. Do kalibracji użyć Wiener lab Calibrador A plus zgodnie z wymaganiami dla poszczególnych analizatorów.

WIENER LAB. DOSTARCZA

120 ml: - 1 x 100 ml Odczynnik A

- 1 x 20 ml Odczynnik B

- 1 x 20 ml Próba wzorcowa

(Nr kat.: 1492360)

120 ml: - 2 x 50 ml Odczynnik A

- 2 x 10 ml Odczynnik B

(Nr kat.: 1009285)

120 ml: - 2 x 50 ml Odczynnik A

- 2 x 10 ml Odczynnik B

(Nr kat.: 1009336)

120 ml: - 2 x 50 ml Odczynnik A

- 2 x 10 ml Odczynnik B

(Nr kat.: 1009613)

120 ml: - 2 x 50 ml Odczynnik A

- 2 x 10 ml Odczynnik B

(Nr kat.: 1009921)

ŹRÓDŁA

- 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", 5^a 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.

Oznaczenia

Następujące symbole są zastosowane na opakowaniach zestawów odczynników diagnostycznych.

 Ten produkt spełnia wymagania Dyrektywy Europejskiej 98/79 EC dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy "in vitro"

 Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej

 Wyrób do diagnostyki "in vitro"

 Zawartość wystarczająca dla <n> badań

 Użyć przed

 Ograniczenie dopuszczalnych temperatur

 Nie zamrażać

 Ryzyko biologiczne

 Objętość po rozpuszczeniu

 Zawartość

 numer serii

 Wytwórca

 Substancja szkodliwa

 Substancja żrąca

 Substancja drażniąca

 Przed użyciem zapoznać się z instrukcją

 Kalibrator

 Próba kontrolna

 Próba kontrolna dodatnia

 Próba kontrolna ujemna

 Numer katalogowy

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-27



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina