

**IDeA sTfR IEMA**  
**Imunoenzymometrické stanovení rozpustného transferinového**  
**receptoru**  
**Kat.č. 67044**

**Návod k použití**

**Říjen 2003**

**Určený účel použití**

**Klinický význam rozpustného transferinového receptoru**

**Princip testu**

**Reagencie**

**Přístroje**

**Manipulace se vzorkem; skladování vzorku**

**Pracovní postup**

**Omezení metody**

**Kontrola jakosti**

**Výpočet výsledků**

**Referenční intervaly**

**Analytické parametry měření**

**Literatura (viz originální příbalová informace)**



**Orion Diagnostica**

**ISO9001**  
**CERTIFIED**

Výrobce: Orion Diagnostica Oy  
P.O.BOX 83  
FIN-02101 Espoo, Finsko  
Tel. +358-10-42995  
Fax.+358-10-4297546  
[www.oriondiagnostica.fi](http://www.oriondiagnostica.fi)

**CE**

## Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Použitelné do



Viz návod k použití



Katalogové číslo



Číslo šarže



Teplotní rozmezí



Enzymový konjugát

**CONJ ENZ 50x**

Koncentrace kalibrátoru

**CAL A**

Kontrola

**CONTROL**

Reakční tlumivý roztok

**BUF AS**

Koncentrát substrátu

**SUBS pNPP 50x**

Tlumivý roztok pro substrát

**BUF SUBS**

Stopovací roztok

**SOLN STOP**

Koncentrát promývacího roztoku

**BUF WASH 25x**

Roztok pro ředění vzorku

**DIL SPE**

Obsahuje  $\text{NaN}_3$ .

**CONT  $\text{NaN}_3$**

Obsahuje Kathon

**CONT KATHON**

Škodlivé



## URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

IDeA® sTfR IEMA test firmy Orion Diagnostica je kvantitativní imunoenzymový test určený pro in vitro měření koncentrace rozpustného transferinového receptoru (sTfR) v lidském séru nebo plazmě jako pomůcka při diagnostice sideropenické anémie a pro diferenciaci sideropenické anémie a anémie u chronických nemocí.

## KLINICKÝ VÝZNAM ROZPUSTNÉHO TRANSFERINOVÉHO RECEPTORU

Pro identifikaci podprahového nedostatku zásob železa je nutný vysoce citlivý a specifický test. Nevysvětlená anémie z nedostatku železa je důvodem k rozsáhlému vyšetřování gastrointestinálního traktu, neboť vředy nebo maligní tumory často způsobují velké ztráty krve. Schopnost detekce potřeby suplementace železem u kriticky nemocných, t.j. detekovat funkční nedostatek železa u chronicky nemocných a při léčbě erythropoetinem má zásadní důležitost. Nedávno se ukázalo, že vzrůstá subklinický, tj. neanemický nedostatek železa, což je klinicky relevantní pro psychosomatický vývoj dětí a dorostu.

Tradiční laboratorní testy ke zjišťování stavu železa – sérové železo, transferin, celková vazebná kapacita (TIBC), saturace transferinu a feritin – jsou značně ovlivněny akutní fází, která často komplikuje klinickou interpretaci výsledků testů. Sérové železo a saturace transferinu je navíc ovlivněn diurnálním kolísáním až ze 30-40%. Výsledkem snahy po zlepšení laboratorního testování bylo zavedení testu k detekci rozpustného transferinového receptoru jako potenciálního nástroje ke stanovení diagnózy nedostatku železa.

V krvi je železo přenáшено transferinem, který s ním tvoří komplex. Komplex transferin – železo se váže na povrchu buňky na specifický transferinový receptor (CD 71). Transferinový receptor je transmembránový glykoprotein se dvěma identickými polypeptidovými řetězci (190 kD) vázanými disulfidickými můstky, který přepravuje železo z extracelulárního prostředí do cytosolu. Přítomnost transferinového receptoru je charakteristickým rysem každé buňky s výjimkou dospělých erytrocytů. Rozpustné transferinové receptory přítomné v séru nebo v plazmě jsou oddělené formy tkáňových receptorů, původem převážně (z 80%) z vyvíjejících se erytrocytů. Počet transferinových receptorů na buněčném povrchu reflektuje požadavky buňky na železo v návaznosti na dostupné zdroje. Nižší zásobování železa má za následek urychlení syntézy transferinových receptorů. Je zřejmé, že infekce, zánětlivá onemocnění, malignity nebo rychlý růst nezpůsobují žádné signifikantní změny koncentrovaného sérového rozpustného transferinového receptoru. Proto je klinická interpretace měření sTfR citelně jednodušší a mnohem spolehlivější než např. feritin.

Stanovení sTfR jsou zvláště užitečná při rozlišení sideropenické anémie od anémie způsobené chronickými chorobami (anémie způsobené infekcí, zánětlivá onemocnění, malignita), signalizuje funkční nedostatek železa u pacientů léčených erythropoetinem, při rozpoznávání železa u dětí a těhotných žen. U nekomplikovaných případů se používá feritin pro stanovení úbytku nebo vyčerpání zásob železa a sTfR jako indikátor snížení zásobování železa na tkáňové úrovni. Rozpustný TfR je považován za první parametr, který signalizuje sideropenickou erytropoézu. Bylo publikováno, že sTfR detekuje také subklinický, tj. neanemický, nedostatek železa.

Vzhledem k tomu, že expanze TfR závisí na rovnováze mezi zásobováním železem a množstvím železa požadovaného pro erytropoézu, je evidentní, že klinický stav, ve kterém dochází ke zvýšení erythropoetické aktivity, zvyšuje také koncentrace sTfR. K takovým stavům patří hyperplastické nebo neefektivní erytropoézy včetně hemolytické anémie, myelodysplastických syndromů, megaloblastických anémií a  $\beta$ -thalasemií. STfR je vhodný k diferenciaci diagnostice nedostatku železa a thalasmické anémie u heterotické  $\beta$ -thalasémie.

## PRINCIP TESTU

IdeA® sTfR IEMA test je založen na nekompetitivní imunoenzymové technice „sendvičového typu“. Kalibrátory nebo vzorky nejdříve reagují s monoklonální protilátkou proti sTfR, která je navázána na mikrotitrační destičce. Po promytí nenavázaného antigenu je přidána monoklonální protilátka značená enzymem, která reaguje a tvoří sendvičovou formaci. Po inkubaci a promytí nenavázaného enzymového konjugátu je množství zbylého konjugátu v mikrotitrační destičce přímo úměrné koncentraci antigenu. Množství enzymového konjugátu je měřeno pomocí reakce substrátu, která produkuje barevný koncový produkt. Výsledky neznámých vzorků lze odečíst z kalibrační křivky.

**REAGENCIE****Materiály dodávané k soupravě**

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
<b>STfR IEMA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKA</b> Připravena k použití. 96 jamek s navázanou myší protilátkou proti sTfR.	12 x 8 jamek	2...8°C v původním obalu do data expirace. <i>Po použití pečlivě uzavřete.</i>
<b>KONJUGÁT PROTILÁTKY PROTI sTfR S ENZYMEM</b> Skladovací roztok (50x koncentrovaný) monoklonální myší protilátky proti sTfR konjugované s enzymem alkalická fosfatáza. NaN <sub>3</sub> .	1 lahvička, 0,5 ml Naředit 1:51 reakčním tlumivým roztokem, viz tab.1	2...8°C do data expirace.  <i>Připravte jen množství, které spotřebujete.</i>
<b>STfR IEMA KALIBRÁTORY</b> Lyofilizovány, lidský sTfR v lidském/umělém séru, označené A až F. <i>Přesné hodnoty jsou uvedeny na zvláštní příbalové informaci (QA report), která je v soupravě.</i> <i>Kalibrováno proti internímu master kalibračnímu setu.</i> Kathon, NaN <sub>3</sub> .	6 lahviček  Rekonstituujte přidavkem 500 µl destilované vody.	2...8°C do data expirace.  2...8°C 8 týdnů po rekonstituci, delší dobu při -20°C
<b>sTfR IEMA KONTROLY 1&amp;2</b> Lyofilizovány, lidský sTfR v lidském séru. <i>Přesné hodnoty jsou uvedeny na zvláštní příbalové informaci (QA report), která je v soupravě.</i> Kathon, NaN <sub>3</sub> .	2 lahvičky  Rekonstituujte přidavkem 500 µl destilované vody.	2...8°C do data expirace.  2...8°C 8 týdnů po rekonstituci, delší dobu při -20°C
<b>sTfR IEMA REAKČNÍ TLUMIVÝ ROZTOK</b> PBS tlumivý roztok je připraven k použití. NaN <sub>3</sub> , červené barvivo.	1 lahvička  50 ml	2...8°C do data expirace.
<b>sTfR IEMA KONCENTRÁT SUBSTRÁTU</b> 50x koncentrovaný roztok p-NPP.	1 lahvička, 0,5 ml Naředit 1:51 tlumivým roztokem pro substrát, viz tab.1	2...8°C do data expirace. <i>Naředený roztok chraňte před světlem a spotřebujte jej během 1 týdne.</i>
<b>sTfR IEMA TLUMIVÝ ROZTOK PRO SUBSTÁT</b> Připraven k použití. NaN <sub>3</sub> .	1 lahvička, 25 ml	2...8°C do data expirace.
<b>sTfR IEMA STOPOVACÍ ROZTOK</b> Připraven k použití. 2N NaOH	1 lahvička, 10 ml	2...8°C do data expirace.
<b>sTfR IEMA KONCENTRÁT PROMÝVACÍHO ROZTOKU</b> 25x koncentrovaný. Kathon.	1 lahvička, 40 ml Naředit přidavkem 960 µl destilované vody.	2...8°C do data expirace. Naředený roztok je stabilní 12 týdnů.
<b>sTfR IEMA ROZTOK PRO ŘEDĚNÍ VZORKŮ</b> Tlumivý roztok pro ředění vzorků je připraven k použití.	1 lahvička 15 ml	2...8°C do data expirace.

Reagencie obsahují jako konzervační činidla Kathon a NaN<sub>3</sub>, čtěte „Upozornění a varování“.

Poznámka! Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení vzorku.

**UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ****VAROVÁNÍ 1: Pro diagnostické použití in vitro.**

Není určeno pro interní nebo externí použití u lidí nebo u zvířat. Nemíchejte substance ze souprav různých šarží. Používejte pouze substance jedné šarže soupravy. Nepoužívejte reagencie po datu expirace, které je vytištěno na každém štítku balení.

Nepipetujte ústy. Při práci je zakázáno jíst, pít nebo kouřit. Používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Po skočení práce s těmito látkami si důkladně umyjte ruce. Ukápnutý materiál je nutno okamžitě omýt velkým množstvím vody. Materiály použité k čištění by měly být likvidovány dle předpisů.

**VAROVÁNÍ 2:** Se všemi vzorky pacientů je nutno pracovat jako s **potenciálně infekčním** materiálem. Výchozím materiálem pro kalibrátory a kontroly je lidská krev, která byla testována licencovanými

reagenciemi a shledána negativní na HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátky. Vzhledem k tomu, že žádný známý test nemůže dát jistotu, že materiál není infekční, pracujte s ním jako s materiálem potenciálně infekčním.

**VAROVÁNÍ 3:** Reagencie obsahují **azid sodný (NaN<sub>3</sub>)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azidu sodného, který je v této koncentraci škodlivý při vdechnutí, polknutí a při kontaktu s kůží. Při prodloužené expozici existuje nebezpečí vážného poškození zdraví. Reagencie po rekonstituci a reagencie, které jsou připraveny k použití, obsahují < 0,1% azidu sodného, což se nepovažuje za škodlivou koncentraci. Azid sodný může reagovat s olovenými nebo měděnými uzávěry za tvorby vysoce explozivních azidů příslušných kovů. Jako prevenci tvorby azidů opláchněte materiály při likvidaci velkým množstvím vody. Příležitostně mohou být kovové uzávěry opláchnuty také 10% hydroxidem sodným. Azid sodný tvoří toxický plyn, pokud je v kontaktu s kyselinami.

**VAROVÁNÍ 4:** Lyofilizované reagencie obsahují 1,5% Kathon jako konzervační činidlo. Koncentrát promývacího roztoku obsahuje 1,25% Kathon jako konzervační činidlo. Zabraňte kontaktu s kůží. Rekonstituované reagencie a reagencie připravené k použití obsahují 0,1% Kathon jako konzervační činidlo, což se nepovažuje za škodlivou koncentraci.

**VAROVÁNÍ 5:** Stopovacím roztokem je 0,2 N NaOH. Je korozivní, pracujte s ním opatrně.

## PŘÍSTROJE

K měření lze použít jakoukoliv třepačku s možností rychlého třepání, promývačku mikrotitračních destiček a jakýkoliv fotometr pro tyto destičky (s možností měřit absorpce při 405 nm). Doporučujeme přístroj pravidelně kalibrovat. Detaily o instalaci, použití, údržbě a kalibraci přístroje zjistíte v návodu k jeho použití.

## MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU

Ačkoliv se doporučuje jako vzorek sérum, lze použít také vzorek plazmy (heparin nebo citrát). Nepoužívejte vzorky EDTA plazmy. Vzorky séra lze skladovat 2 dny při laboratorní teplotě, 7 dní při 2 – 8°C a delší dobu při –20°C. Zabraňte opakovanému rozmražení a opětovnému zmražení vzorku.

## PRACOVNÍ POSTUP

### Materiály potřebné, ale nedodávané v soupravě

PIPETY pro přesné pipetování 20µl, 50 µl, 200µl a 500 µl

TŘEPAČKU pro mikrotitrační destičky s možností rychlého třepání

PROMÝVAČKU pro mikrotitrační destičky

FOTOMETR pro mikrotitrační destičky

BUNIČITÁ VATA

KRYCÍ FÓLIE PARAFILM

DESTILOVANÁ VODA

## REKONSTITUCE/PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

**Kalibrátory a kontroly:** Kalibrátory a kontroly vytemperujte na laboratorní teplotu. Do každé z lahvíček sTfR kalibrátorů a kontrol přesně odměřte 500 µl destilované vody. Lahvičku uzavřete a dobře promíchejte jemným kroužením, aniž by se vytvořila pěna. Před použitím nechte 30 minut stát.

**Enzymový konjugát:** Požadovaný objem připravíte ředěním skladovacího koncentrátu konjugovaného roztoku protilátky proti sTfR reakčním tlumivým roztokem (1:51) za použití jednorázového plastického kontejneru (viz. tab. 1).

**Roztok substrátu:** Požadovaný objem připravíte smícháním koncentrátu substrátu a tlumivého roztoku pro substrát v poměru 1:51 za použití tmavé skleněné lahvičky (viz. tab.1).

**Promývací roztok:** Koncentrát promývacího roztoku nařed'te destilovanou vodou do objemu 1000 ml (40 ml + 960 ml).

**Tabulka 1** Ředění konjugátu protilátky a roztoku substrátu v poměru 1:51

Počet proužků	Enzymový konjugát/ koncentrovaný roztok substrátu (µl)	Reakční tlumivý roztok/ tlumivý roztok pro substrát (ml)
---------------	---	---

str.7originální příbalové informace

## Pracovní postup

1. Všechny reagensie, vzorky a kontroly **vytemperujte** na laboratorní teplotu (18...25°C).
2. **Odstraňte** přebytek stripů z rámečku mikrotitrační destičky a **vraťte** je zpět do obalu, který uzavřete.
3. **Napipetujte** 20μl kalibrátorů, kontrol a patientských sér do jamek mikrotitrační destičky. Pracujte v duplikátech.
4. Do každé jamky **přidejte** 200μl reakčního tlumivého roztoku.
5. Destičku **inkubujte** 1 hodinu při laboratorní teplotě (18...25°C) na třepače **při rychlém třepání**.
6. Pomocí promývačky **promyjte** destičku 4x promývacím roztokem (300 – 450 μl/jamku). Odstraňte všechnu přebytečnou tekutinu poklepáním na buničitou vatu.
7. Do každé jamky **přidejte** 200μl naředěného konjugátu monoklonální protilátky proti sTfR s enzymem.
8. Destičku **inkubujte** 1 hodinu při laboratorní teplotě (18...25°C) na třepače při rychlém třepání.
9. Pomocí promývačky **promyjte** destičku 4x promývacím roztokem (300 – 450μl/jamku). Odstraňte všechnu přebytečnou tekutinu poklepáním na buničitou vatu.
10. Do každé jamky **přidejte** 200μl naředěného roztoku pro substrát.
11. Destičku **inkubujte** 30 minut při 18...25°C (bez třepání).
12. Enzymovou reakci **ukončete** přidáním 50 μl stopovacího roztoku do každé jamky ve stejném sledu, ve kterém byl přidán roztok substrátu. **Třepete** na třepače 1 – 2minuty při rychlém třepání.
13. **Změřte** absorpce při 405 nm za použití fotometru pro mikrotitrační destičky.

## OMEZENÍ METODY

Jako základ pro jakékoli diagnostické a terapeutické rozhodnutí musí být výsledky jednotlivých testů podloženy jinými klinicky relevantními daty. Vzorky obsahující heterofilní protilátky mohou způsobovat chybné výsledky.

## KONTROLA KVALITY

Doporučujeme všem laboratorním používat interní program kontroly kvality tak, že se současně analyzují séra s nízkou i vysokou hraniční koncentrací normálního rozmezí. Doporučujeme, aby si každá laboratoř vytvořila vlastní přijatelné rozmezí pro kontrolní vzorky. Průměr kontrolního rozmezí by měl být uvnitř přijatelného rozmezí daného výrobcem. K měření kontrolních hodnot použijte alespoň dvou různých šarží.

## VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Při automatickém výpočtu výsledků doporučujeme použít spline funkci. Výsledky lze odečíst manuálně z kalibrační křivky vynesené v semilogaritmických souřadnicích .

1. **Vypočítejte** průměr hodnot absorbací všech duplikátů.
2. **Odečtěte** hodnoty nulového kalibrátoru od hodnot kalibrátorů a neznámých vzorků.
3. **Vyneste** kalibrační křivku na logaritmický nebo lineární grafický papír tak, že hodnoty absorbací budou na ose y a známé hodnoty koncentrací sTfR (mg/l) na ose x.
4. Z kalibrační křivky **odečtěte** koncentrace sTfR v neznámých vzorcích.

**Obr. 1** Typická kalibrační křivka (absorbance vs. koncentrace sTfR na lineárním grafickém papíře). Příklad.  
str.9 originální příbalové informace

**Tabulka 1** Typická kalibrační křivka a výpočet výsledků. Příklad.

Jamka	Absorbance	Čistá absorbance	sTfR(mg/l)
str.9 originální příbalové informace			
Unkn = neznámý vzorek			

## REFERENČNÍ HODNOTY

U zjevně zdravých dospělých osob a u dětí byly naměřeny následující referenční hodnoty sTfR, uvedené v tabulce 2.

**Tabulka 2** Referenční hodnoty sTfR v séru ( Suominen P., 1997, 2000)

Věk	n	Referenční rozmezí (mg/l) 2,5% a 97,5% referenční meze
6měsíců – 4 roky	52	1,6 – 4,0 mg/l
4 – 10 let	60	1,5 – 3,7 mg/l
10 – 16 let	160	1,4 – 3,4 mg/l
dospělý > 16 let	119	1,3 – 3,3 mg/l
Cut-off pro IDE (dospělí)		2,8 mg/l
Cut-off pro IDA (dospělí)		3,3 mg/

## ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

### Měřicí rozmezí

Přibližně 0,5 – 9 mg/l v závislosti na koncentraci nejnižšího a nejvyššího kalibrátoru.

### Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulového kalibrátoru, je lepší než 0,1 mg/l.

### Linearita

Sérové vzorky lze ředit do poměru 1:5 ředícím roztokem pro vzorky.

### Metoda standardního přídatku (recovery)

Známa množství sTfR byla přidána k patientským sérum, které obsahovaly sTfR. Standardní přídatky byly v rozmezí od 91,1 do 102%, s průměrnou hodnotou 94,9%.

### Preciznost (precision)

Vzorky s různou koncentrací sTfR byly analyzovány k určení intra-assay a inter-assay variability.

**Tabulka 3** Intra-assay / inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 10 replikátů			Inter-assay preciznoet 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (mg/l)	CV %	Vzorek	Průměr (mg/l)	CV %

str. 10 originální příbalové informace

### Interferující látky

Koncentrace sérového bilirubinu neinterferují s měřením sTfR do koncentrace 280  $\mu$ mol/l. Na měření sTfR nemá vliv ani hemoglobin do koncentrace 2 g/l. Nedoporučujeme používat vysoce lipemická séra. Heterofilní protilátky s testem interferují.

### Specifická

Nebyla nalezena žádná křížová reakce u sérového albuminu do koncentrace 40 g/l, u gama globulinu do 20 g/l a transferinu do 3 g/l.

### Literatura

# IDEA® ROZPUSTNÝ TRANSFERINOVÝ RECEPTOR IEMA KAT.Č. 67044

## OBSAH SOUPRAVY

( 96 TESTŮ)

sTfR IEMA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKA  
ENZYMOVÝ KONJUGÁT PROTI LÁTKY PROTI sTfR  
sTfR IEMA KALIBRÁTORY  
sTfR IEMA KONTROLY 1&2  
sTfR IEMA REAKČNÍ TLUMIVÝ ROZTOK  
sTfR IEMA KONCENTRÁT SUBSTRÁTU  
sTfR IEMA TLUMIVÝ ROZTOK PRO SUBSTÁT  
sTfR IEMA STOPOVACÍ ROZTOK  
sTfR IEMA KONCENTRÁT PROMÝVACÍHO ROZTOKU  
sTfR IEMA ROZTOK PRO ŘEDĚNÍ VZORKŮ

## SOUHRN PRACOVNÍHO POSTUPU

(všechny objemy jsou v µl)

	Kalibrátor	Kontrola	Neznámý vzorek
Pipetování vzorku	20	20	20
Pipetování reakčního tlumivého roztoku	200	200	200
Inkubace 1h při laboratorní teplotě na třepačce za rychlého třepání	x	x	x
Aspirace a promývání 4x	x	x	x
Pipetování konjugátu	200	200	200
Inkubace 1h při laboratorní teplotě na třepačce za rychlého třepání	x	x	x
Aspirace a promývání 4x	x	x	x
Pipetování naředěného substrátu	200	200	200
Inkubace 30 minut při laboratorní teplotě	x	x	x
Pipetování stopovacého roztoku	50	50	50
Rychlé třepání na třepačce 1-2 minuty	x	x	x
Měření absorbancí při 405 nm	x	x	x

Idea® je ochranná známka firmy Orion Corporation.

Sídlo v ČR:

Orion Diagnostica-organizační složka  
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6  
Tel. 233 350 533  
[www.oriondiagnostica.cz](http://www.oriondiagnostica.cz)

Originální příbalová informace:

67044 E04-CZ01

Datum poslední revize textu:

2.2.2005