



**NÁVOD K POUŽITÍ**

**VOLNÁ VAZEBNÁ  
KAPACITA Fe 300**

**KATALOGOVÉ ČÍSLO 107**





SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **POUŽITÍ**

Souprava Volná vazebná kapacita železa 300 se používá ke stanovení volné vazebné kapacity železa v krevním séru na automatických analyzátoch.

## **SOUHRN**

Transferin je bílkovina, která je syntetizována v játrech a slouží jako transportní bílkovina pro železo a zároveň zajišťuje, že se tento prvek nevyskytuje v plasmě ve volné formě. Na molekulu transferinu jsou vázány dva atomy železa. Za fyziologických podmínek je kapacita transferinu nasycena železem asi z jedné třetiny, zbytek je označován jako volná vazebná kapacita železa.

Vzestup volné vazebné kapacity je pozorován při nedostatku železa v organismu. V případě nedostatku železa z důvodu malnutrice při které je snížena koncentrace bílkovin v organismu k tomuto vzestupu nedochází.

K poklesu volné vazebné kapacity dochází při vysoké koncentraci železa v organismu. Tento stav nastává při hemosideróze, hemochromatóze některých dalších stavech. K mírnému poklesu volné vazebné kapacity dochází i při reakci organismu na akutní zátěž<sup>1</sup>.

## **PRINCIP METODY**

Sérum je inkubováno v prostředí trisového pufru, který obsahuje železnaté ionty, jež se specificky vážou na transferin. Nezareagované železnaté ionty jsou následně stanoveny reakcí s Ferene S. Rozdíl mezi koncentrací železnatých iontů v pufru a koncentrací těchto iontů po vazbě na transferin odpovídá volné vazebné kapacitě. Celkovou vazebnou kapacitu vypočítáme jako součet volné vazebné kapacity a koncentrace sérového železa<sup>2</sup>.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **SLOŽENÍ SOUPRAVY**

1 PUFŘ	2 x 100 ml:	Trisový puřř	372 mmol/l
		Hydroxylamin-hydrochlorid	129 mmol/l
		Thiomočovina	65 mmol/l
		Detergenty, stabilizátory	
2 STANDARD	1 x 50 ml:	Standardní roztok Fe <sup>2+</sup>	90 µmol/l
3 CHROMOGEN	1 x 50 ml:	Ferene S	8,1 mmol/l

## **PŘÍPRAVA ČINIDEL**

1 PUFŘ, 2 STANDARD a 3 CHROMOGEN jsou řřipraveny k řřímému pouřřití. Pokud provádíme stanovení dvoučinidlově, lze z 1 PUFŘu a 2 STANDARDu řřipřřavit směsné řřinidlo v poměru 9 dílů 1 PUFŘu a 1 díl 2 STANDARDu, např. 45 ml 1 PUFŘu a 5 ml 2 STANDARDu. Stabilita směsného řřinidla je při 2 – 8 °C 30 dní.

## **STABILITA SOUPRAVY**

1 PUFŘ, 2 STANDARD a 3 CHROMOGEN jsou při teplotě 2 – 25 °C stabilní až do doby expirace.

## **POUŽITÝ MATERIÁL**

Ke stanovení se pouřřívá krevní sérum. Sérum lze skladovat při teplotě 20 – 25 °C 6 hodin, při 4 – 8 °C 3 dny a při teplotě -20 °C 1 rok<sup>3</sup>.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **POSTUP ANALÝZY**

	VZOREK [ $\mu$ l]	STANDARD [ $\mu$ l]	REAG. BLANK [ $\mu$ l]
DEST.VODA	–	60	160
SÉRUM	60	–	–
1 PUFR	900	900	900
2 STANDARD	100	100	–

Vše se promíchá a po 5 minutové inkubaci při 37 °C odečteme absorbanci blanku vzorku  $A_{vzBI}$  proti reagenčnímu blanku a přidáme:

	VZOREK [ $\mu$ l]	STANDARD [ $\mu$ l]	REAG. BLANK [ $\mu$ l]
3 CHROMOGEN	200	200	200

Promícháme a za dalších 5 minut odečteme absorbanci standardu  $A_{st}$  a vzorku  $A_{vz}$  proti reagenčnímu blanku. Měření se provádí při 596 nm (580-620 nm) v 10 mm kyvetách. V případě bichromatického měření se vedlejší vlnová délka nastaví na hodnotu 700 nm.

## **VÝPOČET**

$$\text{konc. VVK} [\mu\text{mol/l}] = 90 - \left[ \frac{90}{A_{st}} \cdot (A_{vz} - A_{vzBI}) \right]$$

90	Koncentrace standardu $\mu\text{mol/l}$
$A_{st}$	Absorbance standardu
$A_{vzBI}$	Absorbance blanku vzorku
$A_{vz}$	Absorbance vzorku



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **KALIBRACE A KONTROLA**

Ke kalibraci se používá 2 STANDARD, který je součástí soupravy Volná vazebná kapacita železa 300. Ke kontrole lze použít kontrolní séra dodávaná řadou firem, například Clin.Chem.Control 1 a 2 od firmy Sentinel CH.

## **REFERENČNÍ INTERVAL<sup>4</sup>**

Dospělí v séru při 37 °C

Muži, ženy                    32 – 56 μmol/l

## **ZNAKY ANALYTICKÉ METODY**

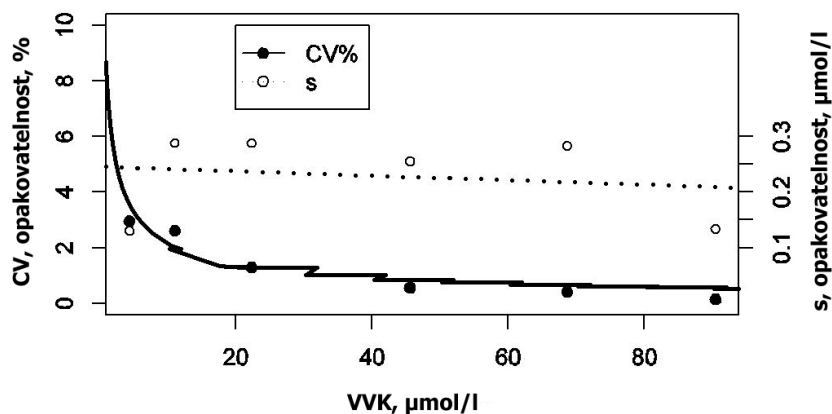
### ***NEPŘESNOST***

Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS<sup>5</sup>. Celkový počet pozorování byl N=80 u každé koncentrace séra. Výsledky v tabulce jsou platné pro měření na analyzátoru Hitachi 911 firmy Roche.

Vzorek	Průměr μmol/l	Směrodatná odchylka μmol/l				Celková CV %	N
		uvnitř série	mezi sériemi	mezi dny	celková		
Nízký sérový pool	20,5	0,64	0,19	0,56	0,87	4,2	80
Vysoký sérový pool	51,4	0,42	0,00	1,13	1,20	2,3	80

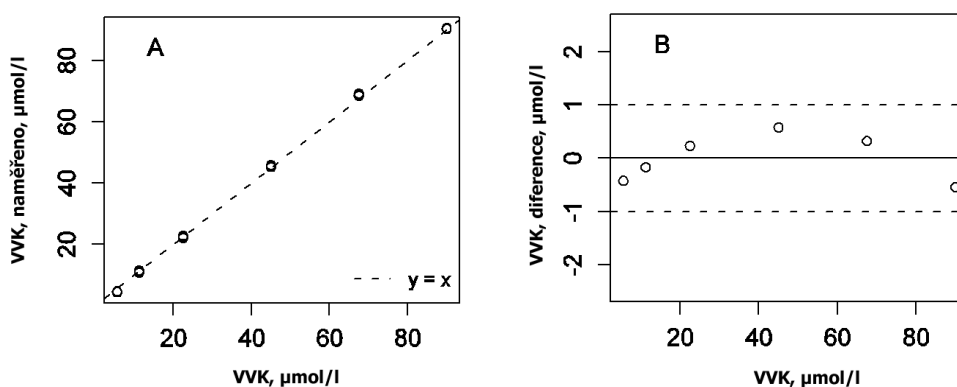
### ***PROFIL PŘESNOSTI***

Profil přesnosti byl sestaven na základě opakovaného měření vzorků sér pacientů a vzorků řaděných fyziologickým roztokem s koncentrací v rozmezí 5,6 – 90 μmol/l. Při koncentraci 5,6 μmol/l je variační koeficient (opakovatelnost) 2,6 % a s rostoucí koncentrací volné vazebné kapacity postupně klesá. Směrodatná odchylka (opakovatelnost) je ve sledovaném rozsahu prakticky konstantní.



### LINEARITA

Linearita stanovení koncentrace volné vazebné kapacity železa byla testována v oblasti koncentrací 5,6 – 90  $\mu\text{mol/l}$ . Při srovnání hodnot vypočtených lineární regrese a polynomem druhého řádu podle protokolu EP6-A programem<sup>6,7</sup> nepřesahují rozdíly z obou modelů 0,6  $\mu\text{mol/l}$ , relativní velikost difference je menší než požadované bias odhadnuté z biologické variability železa v séru (8,8 %) <sup>9,10</sup> i u nízkých koncentrací v oblasti meze stanovitelnosti. Z praktického hlediska linearita vyhovuje.



### Test linearity stanovení volné vazebné kapacity železa

**A.** Regresní přímka  $y = 1,019 \cdot x - 0,651$ ,  $r = 0,9997$ ,  $s_{y/x} = 0,535 \mu\text{mol/l}$ ,  $n = 30$ .

Polynom druhého řádu  $y = -1,372 + 1,075 \cdot x - 0,0006 \cdot x^2$ ,  $s_{y/x} = 0,333 \mu\text{mol/l}$ ,  $n = 30$ .

Úsek na ose y (-0,65  $\mu\text{mol/l}$ ) je statisticky signifikantní,  $p < 0,001$ .

Kvadratický člen polynomu druhého řádu je statisticky signifikantní,  $p < 0,001$ .

**B.** Diference mezi výpočtem z polynomu druhého řádu a přímkou nepřesahují 0,6  $\mu\text{mol/l}$ .



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

### **MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI**

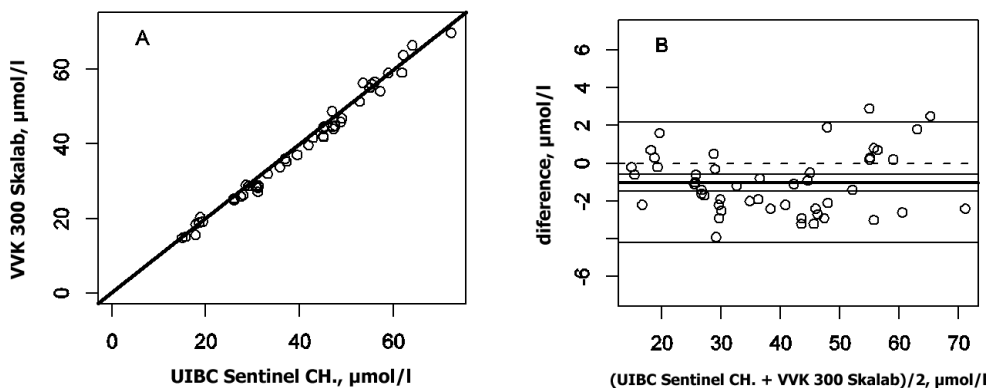
Výpočtem z opakovaného měření blanku ( $n = 20$ ) byla mez detekce odhadnuta na  $0,9 \mu\text{mol/l}$  a mez stanovitelnosti<sup>7</sup> na  $2,6 \mu\text{mol/l}$ .

### **INTERFERENCE**

Experimentálně bylo ověřeno, že při stanovení volné vazebné kapacity v séru neinterferuje hemoglobin do koncentrace  $2,0 \text{ g/l}$ , bilirubin neinterferuje do koncentrace  $450 \mu\text{mol/l}$  a triacylglyceroly do koncentrace  $17,0 \text{ mmol/l}$ . Pokud je analyzovaný vzorek kontaminován cheláty, jsou výsledky volné vazebné kapacity železa falešně vyšší.

### **SROVNÁNÍ SE SOUPRAVOU SENTINEL UIBC Liquid**

Bylo analyzováno 50 vybraných vzorků pacientů metodou stanovení volné vazebné kapacity železa pomocí soupravy firmy SENTINEL UIBC Liquid na analyzátoru Hitachi 911. Stejně vzorky byly analyzovány soupravou VVK 300 firmy Skalab na shodném analyzátoru. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga a Babloka<sup>8</sup> a metodou diferenčního grafu. Pro vyhodnocení byl použit program<sup>7</sup>. Na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nelze směrnici regresního vztahu odlišit od hodnoty 1, rovněž tak úsek na ose y je statisticky nevýznamný, přímka prochází počátkem. Bias způsobený nelinearitou je ve středu referenčního intervalu ( $44 \mu\text{mol/l}$ )  $3,0 \%$ .



### Srovnání stanovení vazebné kapacity železa metod UIBC Sentinel Ch. a VVK 300 Skalab

- A.** Passing-Bablokova regrese. Regresní rovnice  $y = 0,989 \cdot x - 0,825$ ,  $r = 0,990$ . Intervaly spolehlivosti koeficientů jsou v tabulce.
- B.** Diferenční graf. Průměrná diference  $-1,02 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ , párový t-test), medián diferencí  $= 1,15 \mu\text{mol/l}$  je rovněž signifikatní (Wilcoxonův párový test,  $p < 0,001$ ).

### Srovnání metody stanovení UIBC Sentinel Ch a VVK 300 Skalab

Passingova-Bablokova regrese	n	Směrnice (95% CI)	Intercept (95% CI)	r *
	50	0,989 ** (0,955 do 1,032)	- 0,825 ** (- 2,304 do 0,240)	0,990

\* pořadový korelační koeficient

\*\* NS nesignifikantní

Diferenční graf potvrzuje malý konstantní rozdíl mezi porovnávanými metodami  $-1,02 \mu\text{mol/l}$ , který je statisticky významný ( $p < 0,001$ , párový t-test), medián diferencí  $-1,15 \mu\text{mol/l}$  je rovněž signifikatní (Wilcoxonův párový test,  $p < 0,001$ ). Navzdory statické významnosti testovaných diferencí mezi metodami jsou rozdíly malé ve srovnání se značnou biologickou variabilitou stanovení železa v séru.





SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **LITERATURA**

1. Racek J et al. Klinická biochemie, Galen, Praha, s. 64 - 65, 1999, ISBN 80-7262-023-1.
2. Persijn JP, van der Slik W, Riethorst A. Determination of serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC), 1971,35(1):91-8.
3. Jabor A, Zámečník M. Preamalytická fáze 2005, Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. ČLS JEP a SEKK, Praha 2005, s. 133. ISBN 80-239-5198-X.
4. Richterich R., Colombo JP. Clinical Chemistry. Theory, Practice and Interpretation. John Wiley and Sons, NY, 1981, p. 346. ISBN 0471278092.
5. NCCLS EP5-A. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Approved Guideline. NCCLS, 1997.
6. NCCLS EP6-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved guideline. NCCLS, Wayne, PA, 2003.
7. Linnet K: A Program for Statistical Analysis in Clinical Biochemistry. Version 4.2.0. Denmark.1997-2001.
8. Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedures for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. J Clin Chem Clin Biochem. 1983;21:709-720.
9. Ricos C, Alvarez V, Cava F et.al. Current databases on biologic variation:pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500.
10. <http://www.westgard.com/guest32.htm>. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error. The 2006 update. Dostupné březem, 2007.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

**Datum poslední revize: 24. 6. 2015**

Výrobce:



**SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy**  
Tel.: +420 461 531 163  
Mobil: +420 777 176 107, +420 777 324 399  
Fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

