

Zastosowanie

Wako NEFA-HR(2) jest oparty na enzymatycznej metodzie kolorymetrycznej testem do ilościowego oznaczenia *in vitro* wolnych kwasów tłuszczowych (NEFA) w surowicy krwi.

Streszczenie i objaśnienie testu

Krążące we krwi związane z albuminą wolne kwasy tłuszczowe (NEFA) są ważnym źródłem energii dla tkanek obwodowych.

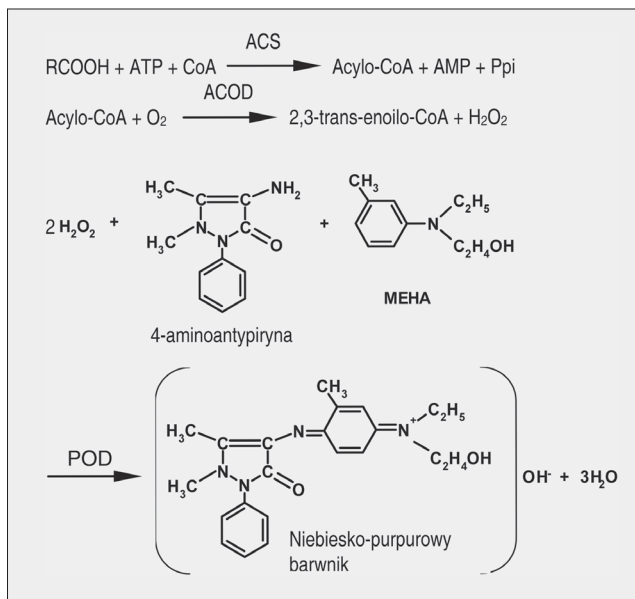
Stężenie NEFA we krwi jest zależne od równowagi pomiędzy ich wychwytem przez wątrobę oraz tkanki obwodowe i uwalnianiem do krwi przez tkankę tłuszczową. Poziom NEFA we krwi obniża się podczas wysiłku fizycznego, natomiast wzrasta podczas głodzenia, ekspozycji na zimno, panice wywołanej stresem lub podczas palenia papierosów. Wzrost i spadek NEFA obserwuje się przy cukrzycy, chorobach wątroby i chorobach endokrynologicznych.

Dawniej NEFA oznaczano stosując skomplikowaną metodę ekstrakcji próbek przy pomocy rozpuszczalników organicznych. Obecnie bardzo popularna jest metoda enzymatyczna wykorzystująca oksydazę Acylo-CoA zapewniającą wysoką specyficzność i prostotę metody oznaczania. Test NEFA-HR(2) do oznaczenia NEFA i bazyje na metodzie enzymatycznej wykorzystującej 3-metylo-N-etylo-N-(β-hydroksyetylo)-anilinę (MEHA) jako fioletowy barwnik. NEFA-HR(2) pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników nie zakłócanych obecnością kwasu askorbinowego i bilirubiny.

Zasada metody

Wolne kwasy tłuszczowe w reakcji z ATP i CoA w obecności syntetazy acylo-CoA zostają przekształcone w acylo-CoA i uwolniony zostaje kwas pirofosforowy (PPi). Acylo-CoA zostaje następnie utleniony przy pomocy oksydazy acylo-CoA (ACOD) i powstaje 2,3-trans-enoilo-CoA i cząsteczka nadtlenu wodoru. Następnie nadtlenek wodoru reaguje w sposób ilościowy z 3-metylo-N-etylo-N-(β-hydroksyetylo)-aniliną (MEHA) i 4-aminoantypiryną w obecności peroksydazy (POD) i powstaje niebiesko-purpurowy barwnik. Stężenie NEFA oblicza się na podstawie pomiaru absorpcji niebiesko-purpurowego barwnika.

Reakcja



Fizyczne i chemiczne oznaki niestabilności

Pojawienie się osadu w odczynniku lub uzyskanie wartości kontrolnych poza zakresem podanym przez producenta wskazują na niestabilność odczynnika.

Urządzenia

NEFA-HR(2) można używać na ogólnie dostępnych w handlu automatycznych analizatorach. Proszę zapoznać się z instrukcją obsługi analizatora. Jest niezbędne aby użytkownik sprawdził metodę w praktyce czyli w miejscu wykonywania analiz i na podstawie adekwatnej ilości próbek kontrolnych lub próbek osocza pobranych od pacjentów.

Odczynniki

Zawartość i warunki przechowywania

R1 Set:	R1a: Odczynnik koloru A	Przechowywać w temp. 2–10 °C
	R1: Roztwór A	
R2 Set:	R2a: Odczynnik koloru B	Przechowywać w temp. 2–10 °C
	R2: Roztwór B	

Komponenter

R1 Set:

R1a:	(po rekonstytucji)	
Odczynnik koloru A	ACS	0,53 U/ml
	CoA	0,31 mmol/l
	ATP	4,3 mmol/l
	4-AA	1,5 mmol/l
	AOD	2,6 U/ml
	Azydek sodu	0,062 %
	(odczynnik koloru A liofilizowany)	(0,8 %)

R1: Roztwór A	Bufor fosforanowy, pH 7,0	50 mmol/l
	Azydek sodu	0,05 %

R2 Set:

R2a:	(po rekonstytucji)	
Odczynnik koloru B	ACOD	12 U/ml
	POD	14 U/ml

R2: Roztwór B	MEHA	2,4 mmol/l
----------------------	------	------------

Przygotowanie odczynników

R1: Zawartość butelki z odczynnikiem koloru A (R1a) dobrze zmieszać z roztworem A (R1). Zastosowanie przechowywać w temp. 2–10°C. Zużyć w ciągu 1 miesiąc.

R2: Zawartość butelki z odczynnikiem koloru B (R2a) dobrze zmieszać z roztworem B (R2). Zastosowanie przechowywać w temp. 2–10°C. Zużyć w ciągu 1 miesiąc.

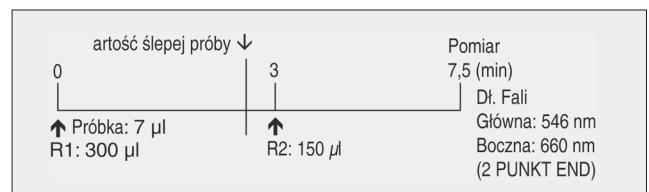
Przygotowanie próbek i ich przechowywanie

Do oznaczenia należy pobrać próbki surowicy krwi. Zaleca się, aby próbki oznaczać bezpośrednio po pobraniu, ponieważ enzymy takie jak lipaza lipoproteinowa, fosfolipaza itp. hydrolizują lipidy obecne we krwi i uwalnają kwasy tłuszczowe. Jeżeli niemożliwe jest natychmiastowe oznaczenie próbki przechowywać zamrożone. Trwałość: 2 dni przy temp. 4 °C.

Podanie *in vivo* heparyny powoduje zawyżenie uzyskanych wyników. W terapii heparynowej heparyna powoduje wzrost aktywności lipazy lipoproteinowej. Próbkę pobraną od tych pacjentów można oznaczyć tylko po wcześniejszym przygotowaniu.²

Standardowa procedura

Temperatura: 37 °C (Hitachi® 737)



Kalibrator: Wako NEFA Standard (dostarczany na osobne zamówienie.)

Obliczenie stężenia NEFA

Stężenie NEFA oblicza się na podstawie krzywej kalibracyjnej.

$$\text{Przeliczniki: mg/dl} = \text{mmol/l} \times 28,2$$

$$(\text{dotyczy kwasu oleinowego, MW(mol waga)} = 282)$$

$$\text{mmol/l (mval/l} = \text{mEq/l)} = \text{mg/dl} \times 0,035$$

Stosowanie automatycznych analizatorów

Parametry pracy należy ustawić zgodnie z instrukcją producenta urządzenia. Na życzenie wysyłamy aplikacje do automatycznych analizatorów.

Wyniki

Wyniki końcowe obliczane są automatycznie i drukowane w jednostkach stężenia mEq/l. Należy używać tej samej jednostki miary dla kalibratora.

Zakres wartości referencyjnych³

Mężczyźni: 0,1–0,60 mmol/L (2,8–16,9 mg/dL)
Kobiety: 0,1–0,45 mmol/L (2,8–12,7 mg/dL)

Ponieważ wartości uzależnione są od wieku, płci, diety, kraju i innych czynników każde I laboratorium powinno oznaczyć własny zakres wartości referencyjnych.

Charakterystyka testu

- (1) **Dokładność metody**
Jeżeli użyje się do testu kontrolnej próbki osocza o znanym stężeniu, to wartość pomiaru będzie znajdowała w zakresie $\pm 15\%$ znanego stężenia.
- (2) **Czułość**
a) Jeżeli użyjemy czystej wody jako próbki to absorbancja wyniesie nie więcej niż 0,140.
b) Jeżeli użyjemy standardu o znanym stężeniu (kwas oleinowy 1 mEq/l) to absorbancja znajdzie się w zakresie 0,100–0,380.
- (3) **Precyzja**
Jeżeli próbka będzie testowana "w jednym ciągu" 5 albo więcej razy to współczynnik wariantowy będzie nie wyższy niż 1,5 %.
- (4) **Zakres pomiaru**
0,01–4,00 mEq/l NEFA (przy użyciu procedur standardowych)

Korelacja

Materiał próbki	Osocze
Współczynnik korelacji	$r = 0,997$ (n = 50)
Równanie regresyjne	$y = 1,013x - 0,043$
y	Wako NEFA-HR(2) (Metoda ACS-ACOD, mEq/l)
x	Wako NEFA C (Metoda ACS-ACOD, mEq/l)

Interferencje

- a) Bilirubina może prowadzić do lekkiego zaniżenia wartości.
b) Kwas askorbinowy i hemoliza nie mają znacznego wpływu na wartości.
c) Cytryniany, szczawiany, EDTA i fluorek sodu w normalnych ilościach nie mają większego wpływu na wynik pomiaru.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Tylko do diagnostyki *in vitro*.
- Stosowanie tego testu jest zastrzeżone wyłącznie dla przeszkolonego personelu specjalistycznego. Zastosowanie mają odnośne państwowe i lokalne przepisy.
- Nie wolno stosować ani u ludzi, ani u zwierząt *in vivo*.
- Odczynniki należy używać wyłącznie do opisanych tu procedur. Nie gwarantuje się efektów, jeżeli będą stosowane inne procedury lub odczynniki będą używane do innych celów.
- Przy korzystaniu z aparatów należy postępować zgodnie z instrukcją obsługi urządzenia!
- Odczynniki przechowywać w podanych warunkach. Nie stosować odczynników po upływie daty ważności zamieszczonej na opakowaniu.
- Nie należy używać omyłkowo zamrożonych odczynników! Takie odczynniki mogą prowadzić do fałszywych wyników.
- Nie zaleca się dłuższego przechowywania napoczętych odczynników. Po napoczęciu opakowania należy ponownie dobrze zamknąć i przechowywać w podanej temperaturze.
- Pojemnik i inne materiały używać wyłącznie do opisanych tutaj testów.
- Butelki zamykane są pod zmniejszonym ciśnieniem. Korek należy ostrożnie, powoli wyjmować tak aby zawartość nie wydostała się z butelki.
- Jeżeli test NEFA będzie wykonywany w kuwetach w których oznaczano cholesterol lub trójglicerydy, może się zdarzyć, że enzymy z testów do oznaczania cholesterolu (esteraza) i trójglicerydów (lipaza lipoproteinowa) pozostaną na ściankach na kuwet i wpłyną na wartości oznaczenia NEFA.
- Do kalibracji używać tylko standardów NEFA.
- Ten test nie jest wyłączną podstawą do postawienia diagnozy klinicznej.
- Nie dopuścić do kontaktu odczynnika z ustami, oczami lub skórą! W przypadku zetknięcia ze skórą lub oczami należy natychmiast przemyć to miejsce dużą ilością wody.
- Uwaga! Niebezpieczeństwo skażenia się aluminium wieczkiem podczas otwierania butelki.
- Zlewki i nieużyte odczynniki usuwać stosując się do odnośnych państwowych i lokalnych przepisów. Roztwór A zawiera 3 mg/l cyjanożelazianu potasu (1 mg/l jako cyjanek).
- Wszystkie materiały, które zetkną się z próbkami osocza uważane są za potencjalnie zainfekowane. Obchodzenie się z tymi materiałami powinno odbywać się w zgodzie z wytycznymi dobrej praktyki laboratoryjnej, w zgodzie z obowiązującymi państwowymi i międzynarodowymi przepisami.
- Azydek sodu może tworzyć w połączeniu z miedzią lub ołowiem wybuchową mieszaninę. Mimo tego, że test NEFA zawiera bardzo małe ilości azydru sodu, podczas usuwania należy splukać rury kanalizacyjne dużą ilością wody.

Kontrola jakości

Zaleca się stworzenie programu kontroli jakości dla laboratoriów klinicznych.

Literatura

- Rogiers V, Stability of the long chain non-esterified fatty acid pattern in plasma and blood during different storage conditions. Clin Chim Acta. 84, 49–54 (1978).
- Krebs, M. et al., Prevention of *in Vitro* Lipolysis by Tetrahydrolipstatin. Clin. Chem. 46 (7), 950–954 (2000).
- Aufenanger, J. and Kattermann, R. Klinisch-chemische Meßgröße: Freie Fettsäuren (FFS), S. 319–320 in Greiling / Greßner: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. edition, Schattauer (1995).

Informacje dla zamówień

Nr produktu	Artykuł	Opakowanie
434-91795	NEFA-HR(2) R1 Set	R1a: 4 x na 50 ml R1: 4 x 50 ml
436-91995	NEFA-HR(2) R2 Set	R2a: 4 x na 25 ml R2: 4 x 25 ml
270-77000	NEFA Standard	CAL: 2 x 10 ml