

Finalidade

O Wako NEFA-HR(2) é um ensaio colorimétrico enzimático para a determinação quantitativa in vitro dos ácidos gordos livres (NEFA) presentes no soro.

Resumo e explicação do teste

Os ácidos gordos não esterificados (NEFA) ligados à albumina no soro constituem uma fonte de energia importante nos tecidos periféricos. A concentração de NEFAs no soro depende de um equilíbrio entre a sua absorção no fígado e nos tecidos periféricos e a sua libertação a partir dos tecidos adiposos. Durante os esforços físicos, o nível de NEFAs diminui, observando-se o seu aumento durante a carência alimentar, a subrefrigeração, o pânico causado por stress ou ao fumar. Observa-se também aumento e diminuição no caso de diabetes, doenças hepáticas e doenças endócrinas.

Determinavam-se os NEFAs por meio do método de extracção difícil de ser executada utilizando-se solventes orgânicos. O método enzimático utilizando-se a Acil-CoA-Oxidase (ACOD) é empregado frequentemente devido à sua excelente especificidade e execução precisa. O NEFA-HR(2) é um kit de reagentes para a determinação de ácidos gordos livres baseada no método enzimático empregando-se a 3-Metil-N-etil-N-(β-hidroxi-etil)-anilina (MEHA) como agente de cor violeta. Obtêm-se resultados seguros sem interferências por ácido ascórbico e bilirrubina.

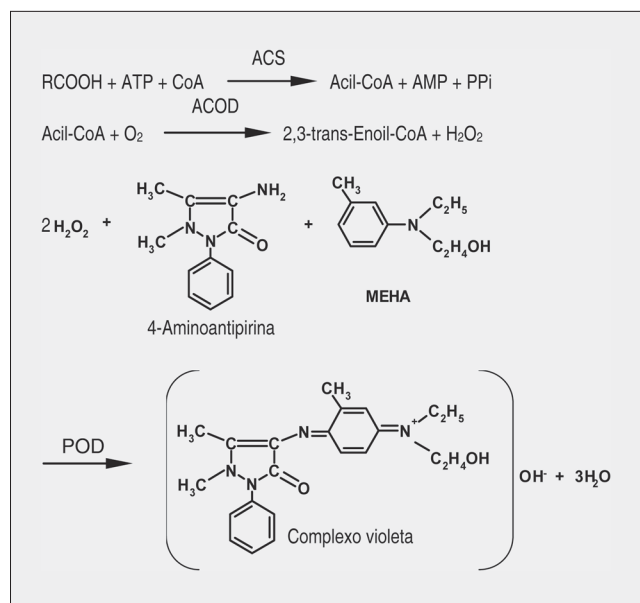
Princípio do ensaio

Ácidos gordos não esterificados (NEFA) presentes na amostra são transformados em Acil-CoA, AMP e ácido fosfórico (PPI) pela enzima Acil-CoA-Sintetase (ACS) na presença da Coenzima A (CoA) e do sal dissódico do trifosfato de adenosina (ATP).

A reacção origina Acil-CoA que é transformada em 2,3-trans-Enoil-CoA e peróxido de hidrogénio sob a acção da enzima Acil-CoA-Oxidase (ACOD). Na presença da Peroxidase (POD), forma-se agora um complexo colorido azul-violeta entre a 3-Metil-N-etil-N-(β-hidroxi-etil)-anilina (MEHA) e a 4-Aminoantipirina (4-AA) por acoplamento oxidativo.

Pode-se determinar a concentração de NEFAs medindo-se a absorção do complexo azul-violeta formado.

Reacção



Sinais físicos e químicos de instabilidade

A existência de um precipitado no reagente ou de valores de controlo fora dos limites especificados pelo fabricante indica a instabilidade dos reagentes.

Equipamentos de medição

O reagente destina-se à utilização com equipamentos de análise correntes no comércio. Com relação a uma descrição do uso e das especificações do equipamento sugerimos a consulta do respectivo manual de instruções do fabricante. É imprescindível que o utilizador faça uma validação do processo na prática e no local de aplicação, executando o ensaio numa quantidade suficiente de soros de pacientes e controlos adequados.

Aplicação em diferentes equipamentos de análise

Introduzir os parâmetros de acordo com as indicações dadas no manual de instruções do fabricante do equipamento. Enviamos as aplicações para equipamentos de análise sob encomenda

Reagentes

Conteúdo e condições de armazenamento

R1 Set:	R1a: Reagente de cor A	Armazenar a 2–10 °C
	R1: Solução A	
R2 Set:	R2a: Reagente de cor B	Armazenar a 2–10 °C
	R2: Solução B	

Componentes

R1 Set:

R1a:	(após a reconstituição)	
Reagente de cor 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
	Azida de sódio (Reagente cor liofilizado)	0,062 % (0,8 %)

R1: Solução A	Tampão fostato pH 7,0	50 mmol/l
	Azida de sódio	0,05 %

R2 Set:

R2a:	(após a reconstituição)	
Reagente de cor B	ACOD	12 U/ml
	POD	14 U/ml

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

Preparação dos reagentes

R1: Misturar bem o conteúdo de um frasco do reagente colorido A (R1a) com a solução A (R1). Armazenar a solução de uso obtida entre 2–10 °C e utilizá-la dentro de 1 mês.

R2: Misturar bem o conteúdo de um frasco do reagente colorido B (R2a) com a solução B (R2). Armazenar a solução de uso obtida entre 2–10 °C e utilizá-la dentro de 1 mês.

Obtenção e conservação das amostras

Deve-se utilizar amostras de soro para os ensaios.

Recomenda-se determinar os valores imediatamente após a recolha de sangue, pois as enzimas nele presentes, como por ex. a Lipase lipoprotéica e a Fosfolipase, hidrolisam as gorduras libertando-se ácidos gordos. Por favor, congelar as amostras de soro para conservá-las. Estabilidade: 2 dias a 4 °C.¹

A heparina estimula a actividade da Lipase lipoprotéica, observando-se um aumento na concentração de ácidos gordos livres em pacientes sob terapia com heparina. O ensaio com o sangue de tais paciente só pode ser executado após um tratamento preliminar do sangue.²

Processo padrão

Temperatura: 37 °C (Hitachi® 737)

Valor branco amostra ↓	Medição
0	7,5 (min)
↑ Amostra: 7 µl	Compr. de onda
↑ R1: 300 µl	Principal: 546 nm
↑ R2: 150 µl	Secundário: 660 nm
	(2 PONTOS FIM)

Calibrador: Wako NEFA Standard (pode ser obtido separadamente.)

Cálculo da concentração de NEFAs

Determina-se a concentração dos NEFAs com base numa curva padrão.

Factores de conversão: mg/dl = mmol/l x 28,2
(calculados p/um MW(peso molecular) de 282 de ácido oleico)
mmol/l (mval/l = mEq/l) = mg/dl x 0,035

Resultados

Os resultados são calculados automaticamente e impressos em unidades de concentração mEq/l. Utilizar sempre a mesma unidade de medição para o calibrador.

Intervalos de referência³

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

Uma vez que os valores dependem da idade, do sexo, da alimentação, do país e de outros factores, cada laboratório deve determinar os seus próprios valores para este processo.

Dados sobre o desempenho do ensaio**(1) Exactidão**

Utilizando para o ensaio uma amostra de soro controlo de concentração conhecida, o valor de medição obtido encontrar-se-á no intervalo de $\pm 15\%$ da concentração conhecida.

(2) Sensibilidade

- Se utilizar água pura como amostra, a absorção não deve ser superior a 0,140.
- Se utilizar um padrão de concentração conhecida (ácido oleico 1 mEq/l), a absorção deve estar entre 0,100–0,380.

(3) Precisão

Se uma amostra for medida 5 vezes ou mais, o coeficiente de variação não deve ser superior a 1,5 %.

(4) Intervalo de medição

0,01–4,00 mEq/l NEFA (ao aplicar o processo padrão)

Correlação

Material da amostra	Soro
Coeficiente de correlação	$r = 0,997$ (n = 50)
Equação de regressão	$y = 1,013x - 0,043$
y	Wako NEFA-HR(2) (Método ACS - ACOD, mEq/l)
x	Wako NEFA C (Método ACS - ACOD, mEq/l)

Interferências

- A presença de bilirrubina pode causar uma pequena diminuição nos valores medidos.
- O ácido ascórbico e a hemólise não influem de maneira significativa nos resultados.
- O citrato, o oxalato, o EDTA e o fluoreto de sódio nas concentrações habituais não têm nenhuma influência importante no resultado da medição.

Advertências e medidas de precaução

- Somente para uso *in vitro*.
- Este ensaio deve ser executado unicamente por pessoal técnico qualificado. Aplicam-se os regulamentos e as leis nacionais e regionais correspondentes.
- Inapropriado para uso interno em seres humanos ou animais.
- Os reagentes devem ser utilizados unicamente para o ensaio aqui descrito. Não garantimos nenhum resultado se os reagentes forem usados em outros processos ou para outras finalidades.
- Para operar o equipamento, ter em atenção as indicações dadas no manual de instruções do fabricante!
- Armazenar os reagentes sob as condições indicadas. Não utilizar os reagentes após a data de validade indicada na embalagem.
- Não reutilizar os reagentes que foram congelados por engano! Tais reagentes podem levar a resultados incorrectos.
- Não recomendamos guardar os reagentes abertos por muito tempo. É favor fechar bem a embalagem depois de aberta e armazená-la à temperatura indicada.
- Utilizar os recipientes e outros materiais apenas para os fins descritos para o ensaio.
- Os frascos foram fechados sob vácuo. Abrir lentamente o fecho para que não haja perda de nenhum material.
- Quando o reagente NEFA é utilizado junto com um ensaio para a determinação de colesterol ou triglicéridos, as enzimas Colesterol esterase e Lipase lipoprotéica presentes nos outros reagentes podem aderir à tina e afectar os valores de medição dos NEFAs.
- Utilizar o padrão NEFA (NEFA Standard) para a calibração.
- Este ensaio não deve ser a única base para a obtenção do diagnóstico clínico.
- Evitar o contacto dos reagentes com a boca, os olhos e a pele! Em caso de contacto com a pele ou os olhos, lavar as partes afectadas com bastante água.
- Cuidado! O fecho em alumínio pode causar cortes ao ser removido.
- Quando for descartar os reagentes, ter em atenção os regulamentos locais e nacionais correspondentes. A solução A contém 3 mg/l de ferricianeto de potássio (1 mg/l como cianeto).
- Todos os materiais que entraram em contacto com a amostra devem ser considerados como potencialmente infecciosos. O manejo de tais materiais deve estar de acordo com as directrizes das boas práticas de laboratório e ser executado de maneira a corresponder às determinações nacionais e internacionais.
- A azida de sódio pode formar misturas explosivas com cobre ou chumbo. Mesmo quando os reagentes contêm quantidades mínimas de azida de sódio, o seu local de descarte deve ser muito bem enxaguado com água.

Controlo de qualidade

Recomenda-se um programa de controlo de qualidade a todos os laboratórios clínicos.

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).

Informações sobre a encomenda

No encomenda	Produto	Embalagem
434-91795	NEFA-HR(2) R1 Set	R1a: 4 x para 50 ml R1: 4 x 50 ml
436-91995	NEFA-HR(2) R2 Set	R2a: 4 x para 25 ml R2: 4 x 25 ml
270-77000	NEFA Standard	CAL: 2 x 10 ml