

Účel použití

Test Wako NEFA-HR(2) je enzymatický kolorimetrický test ke kvantitativnímu stanovení (způsobem in vitro) volných mastných kyselin (NEFA) v séru.

Shrnující vysvětlení testu

Volné mastné kyseliny (NEFA) v séru, vázané na albumin, jsou důležitým dodavatelem energie do periferní tkáně. Koncentrace NEFA v séru závisí na přijímací rovnováze mezi játry a periferní tkání a na uvolňování z tukové tkáně. Při tělesné námaze obsah NEFA klesá, při vnechání potravy, podchlazení, stresu nebo kouření naopak stoupá. Se stoupání a klesání se rovněž setkáme u cukrovky, jaterních a endokrinních onemocnění.

NEFA se stanovovala pomocí extrakční metody, jejíž provádění bylo obtížné kvůli používání organických rozpouštědel. Díky své excelentní specifitě a preciznímu provádění se velmi se rozšířila enzymatická metoda s oxidázou na bázi acylové skupiny acyl-CoA (ACOD). NEFA-HR(2) je souprava činidel pro stanovení volných mastných kyselin a vychází z enzymatické metody s 3-metyl-N-etyl-N-(β-hydroxyetyl)-anilinem (MEHA) jako fialovým barevným činidlem. Dosahuje se tak spolehlivých výsledků bez odchylek způsobených kyselinou askorbovou a bilirubinem.

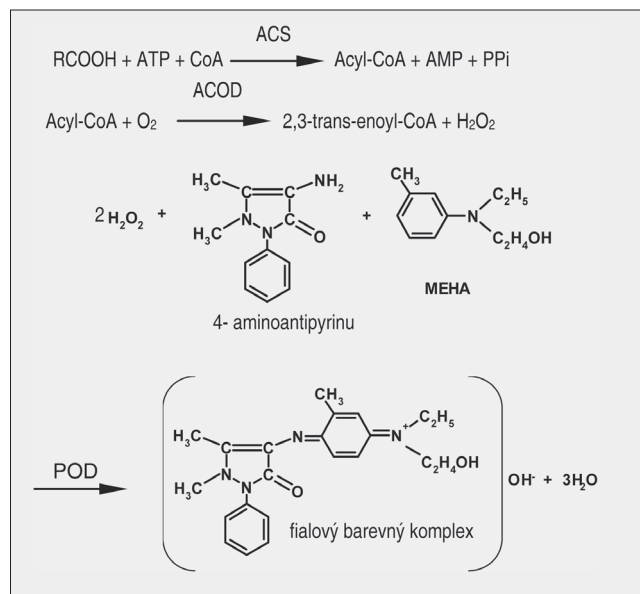
Princip testu

Neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) v testovaném vzorku se mění v důsledku syntézy skupiny acyl-CoA (ACS) na acyl-CoA, AMP a kyselinu fosforečnou (PPi) v součinnosti s koenzymem A (CoA) a adenosin-5-trifosfát-dvojsodné soli (ATP).

Vzniká tak skupina acyl-CoA, která se působením oxidázy na bázi skupiny acyl-CoA (ACOD) mění na 2,3-trans-enoyl-CoA a peroxid vodíku. V přítomnosti peroxidázy (POD) se působením 3-metyl-N-etyl-N-(β-hydroxyetyl)-anilinu (MEHA) a 4-aminoantipyrinu (4-AA) na základě oxidativního sloučení vytváří modrofialový barevný komplex.

Měřením absorpce modrofialové barvy pak lze stanovit koncentraci NEFA.

Reakce



Fyzikální a chemické příznaky nestability

Přítomnost usazenin v činidle, nebo pokud se kontrolní hodnoty pohybují mimo rozsah uvedeny výrobcem, jsou příznakem nestability činidla.

Přístroje

Činidlo je určeno pro používání v komerčně dodávaných automatických analyzátoch. Ohledně popisu podmínek a specifikací přístroje odkazujeme na manuál výrobce přístroje. Je nezbytně nutné na místě zajistit praktické ověření postupu, a sice určením dostatečného počtu adekvátních kontrolních vzorků a vzorků pacientů.

Postup na různých automatických analyzátoch

Zadejte parametry podle návodu k používání výrobce přístroje. Aplikace pro automatické analyzátoři zašleme na požádání.

Činidla

Obsah a podmínky skladování

| | | | |
|----------------|-------------|-------------------------------|------------------------|
| R1 Set: | R1a R1: | Barevné činidlo A Roztok A | Skladování při 2–10 °C |
| R2 Set: | R2a: R2: | Barevné činidlo B Roztok B | Skladování při 2–10 °C |

Složení

R1 Set:

| | | |
|--|---------------------------------------|---------------------|
| R1a: Barevné činidlo A | (po rekonstituuování) | |
| 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 |
| Azid sodný (barevné činidlo lyofilizováno) | | (0,8 %) |
| R1: Roztok A | Fosforečný pufr, pH 7,0 Azid sodný | 50 mmol/l 0,05 % |

R2 Set:

| | | |
|-------------------------------|-----------------------|------------|
| R2a: Barevné činidlo B | (po rekonstituuování) | |
| ACOD | | 12 U/ml |
| POD | | 14 U/ml |
| R2: Roztok B | MEHA | 2,4 mmol/l |

Výroba činidel

R1: Obsah jedné lahvičky barevného činidla A (R1a) dobře promíchejte s roztokem A (R1).

Tento pracovní roztok skladujte při teplotě 2–10 °C, použitelný je po dobu 1 měsíce.

R2: Obsah jedné lahvičky barevného činidla B (R2a) dobře promíchejte s roztokem B (R2).

Tento pracovní roztok skladujte při teplotě 2–10 °C, použitelný je po dobu 1 měsíce.

Získání a uchování vzorku

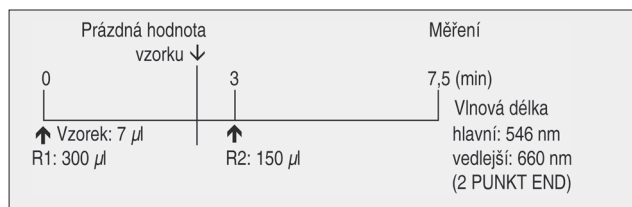
Pro měření by se měli používat vzorky séra.

Doporučuje se stanovit hodnoty bezprostředně po odběru krve, neboť enzymy jako lipoproteinová lipáza, fosfolipáza hydrolyzují tuky a vytvářejí se tak mastné kyseliny. Vzorky séra pro skladování zmrazte. Stabilita: 2 dny při 4 °C.

Heparin způsobuje stimulaci lipoproteinové lipázy, což má za následek zvýšenou hladinu volných mastných kyselin při heparinové terapii. Krev těchto pacientů se před vlastním měřením musí nejprve upravit.²

Standardní postup

Teplota: 37 °C (Hitachi® 737)



Kalibrátor: Wako NEFA Standard (dodává se zvlášť.)

Výpočet koncentrace NEFA

Koncentrace NEFA se stanoví pomocí kalibrační křivky.

$$\begin{aligned} \text{Přepočítávací koeficienty: } & \text{mg/dL} = \text{mmol/L} \times 28,2 \\ & \text{(vypočteno pro kyselinu olejovou, } M_r = 282 \text{ mol/L)} \\ & \text{mmol/L (mval/L} = \text{mEq/L)} = \text{mg/dL} \times 0,035 \end{aligned}$$

Výsledky

Konečné výsledky se vypočítají automaticky a vytisknou se v jednotkách koncentrace mEq/L. Pro kalibrátor použijte vždy stejnou měrnou jednotku.

Referenční rozsahy³

Muži: 0,1–0,60 mmol/l (2,8–16,9 mg/dl)
Ženy: 0,1–0,45 mmol/l (2,8–12,7 mg/dl)

Protože hodnoty závisí na věku, pohlaví, výživě, zemi a jiných faktorech, měla by si ždá laboratoř stanovit svoje vlastní hodnoty pro tento postup.

Výkonnostní údaje testu**(1) Správnost**

Pokud v testu použijete vzorek kontrolního séra, jehož koncentraci znáte, pak se změřená hodnota pohybuje v rozmezí $\pm 15\%$ známé koncentrace.

(2) Citlivost

- a) Jestliže se jako vzorek použije čistá voda, nečiní absorbance více než 0,140.
b) Jestliže se použije porovnávací vzorek se známou koncentrací (kyselina olejová 1 mEq/l), pak se absorbance pohybuje v rozmezí 0,100–0,380.

(3) Přesnost

Pokud se jeden vzorek testuje pětkrát a vícekrát, pak variační koeficient není větší než 1,5%.

(4) Rozsah měření

0,01–4,00 mEq/l NEFA (při standardním postupu)

Korelace

| Materiál vzorku | sérum |
|----------------------|--|
| Korelační koeficient | $r = 0,997$ ($n = 50$) |
| Regresní rovnice | $y = 1,013x - 0,043$ |
| y | Wako NEFA-HR(2) (metoda ACS – ACOD, mEq/l) |
| x | Wako NEFA C (metoda ACS – ACOD, mEq/l) |

Odchytky

- a) Bilirubin může lehce snížit hodnoty.
b) Kyselina askorbová a hemolýza nemají na hodnoty žádný podstatný vliv.
c) Citran, oxalát, EDTA a fluorid sodný v obvyklých množstvích nemají na výsledky měření žádný podstatný vliv.

Varování a preventivní bezpečnostní opatření

- Pouze pro aplikaci *in vitro*.
- Tento test smí provádět pouze vyškolený odborný personál. Platí příslušné národní a místní předpisy a zákony.
- U lidí nebo zvířat se nesmí aplikovat způsobem *in vivo*.
- Činidla se mohou použít pouze zde popsaným způsobem. Výsledky nemohou být garantovány, pokud se činidla použijí jiným způsobem nebo k jinému účelu.
- Při obsluze přístroje postupujte podle uživatelské příručky výrobce!
- Činidla skladujte za uvedených podmínek. Po uplynutí trvanlivosti uvedené na obalu se činidla již nesmí dále používat.
- Omylem zmrazená činidla již nepoužívejte! Takováto činidla by mohla vést ke špatným výsledkům.
- Delší skladování již načatých činidel se nedoporučuje. Po otevření činidla ho opět dobře zavřete a skladujte při uvedené teplotě.
- Nádoby a jiné potřeby používejte pouze k předepsanému testovacímu účelu.
- Lahvičky jsou zavřeny pod vakuem. Zátku proto odstraňujte pomalu, aby nemohla uniknout žádná látka.
- Pokud se činidlo NEFA používá společně s měřením cholesterolu nebo triacylglycerolu, může se stát, že enzymy cholesterol esterázy a lipoproteinová lipáza ulpí v jiných činidlech na kvyetě a dojde tak k ovlivnění stanovení hodnot NEFA.
- NEFA Standard se použije pro kalibraci.
- Tato analýza by neměla být jediným východiskem při provádění klinické diagnostiky.
- Činidla nedávejte do úst, očí nebo na kůži! Při kontaktu s pokožkou nebo očima postižené místo ihned opláchněte velkým množstvím vody.
- Pozor! Neřezejte hliníkovým uzávěrem, když je odstraněn.
- Při likvidaci činidel dodržujte regionální a národní předpisy. Roztok A obsahuje 3 mg/l kyanoželeznatánu draselného (1 mg/l jako kyan).
- Veškeré materiály, které by mohly přijít do kontaktu se vzorkem, považujte za potenciálně infekční. Zacházení s těmito materiály by mělo být v souladu se směrnici správné laboratorní praxe a mělo by probíhat způsobem, který odpovídá platným národním a mezinárodním předpisům.
- Azid sodný může s mědí nebo olovem vytvářet výbušné směsi. I když činidla obsahují pouze minimální množství azidu sodného, přesto by se po likvidaci činidla měly odpady vypláchnout velkým množstvím vody.

Kontrola jakosti

Program kontroly kvality se doporučuje pro všechny klinické laboratoře.

Odkazy na literaturu

- 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 Maßgröße: Freie Fettsäuren (FFS), S. 319–320 in Greiling / Grebner: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. edition, Schattauer (1995).

Informace pro objednávku

| Objednací číslo | Výrobek | Balení |
|-----------------|-------------------|------------------------------------|
| 434-91795 | NEFA-HR(2) R1 Set | R1a: 4 x po 50 ml R1: 4 x 50 ml |
| 436-91995 | NEFA-HR(2) R2 Set | R2a: 4 x po 25 ml R2: 4 x 25 ml |
| 270-77000 | NEFA Standard | CAL: 2 x 10 ml |