

Χρήση

Η δοκιμασία Wako NEFA-HR(2) είναι μία χρωμογονική ενζυματική δοκιμασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό in-vitro των ελεύθερων λιπαρών οξέων (NEFA) στον ορό.

Περίληψη και εξήγηση της δοκιμασίας

Τα συνδεδεμένα με την αλβουμίνη ελεύθερα λιπαρά οξέα (NEFA) στον ορό είναι μια σημαντική πηγή ενέργειας στον περιφερικό ιστό. Η συγκέντρωση NEFA στον ορό εξαρτάται από την ισορροπία απορρόφησης μεταξύ ήπατος και περιφερικού ιστού και της απελευθέρωσης από τον λιπώδη ιστό. Σε περίπτωση σωματικής κόπωσης μειώνεται η περιεκτικότητα σε NEFA και αυξάνεται σε στέρηση τροφής, υποθερμία, σε πανικό λόγω στρες ή κατά το κάπνισμα. Αύξηση και μείωση παρατηρούνται και σε ζαχαρώδη διαβήτη, ηπατικές και ενδοκρινικές νόσους.

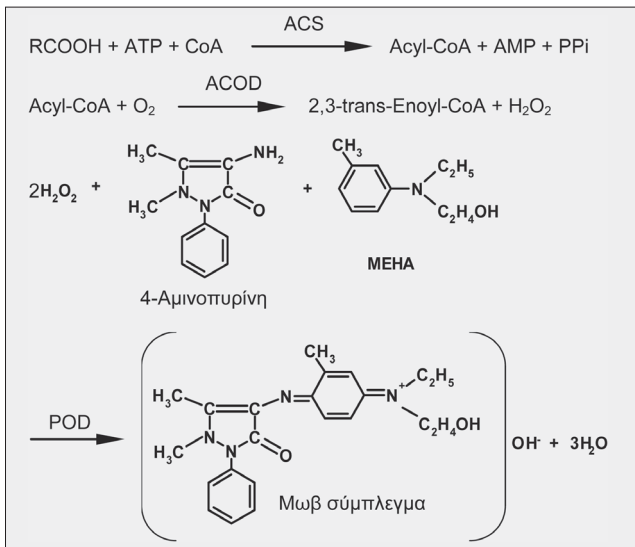
Τα NEFA προσδιορίζονται με μέθοδο εκχύλισης με οργανικό διαλύτη, η εκτέλεση της οποίας ήταν δυσχερής. Διαδόθηκε η ενζυματική μέθοδος με ακυλο-CoA οξειδάση (ACOD) λόγω της εξαιρετικής ειδικότητας και της ακρίβειας κατά την εκτέλεση. Το NEFA-HR(2) είναι ένα σετ αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων και βασίζεται στην ενζυματική μέθοδο με χρήση 3-μεθυλ-N-αιθυλ-N-(β-υδροξυαιθυλ)-ανιλίνης (MEHA) σαν μωβ χρωμογόνο. Επιτυγχάνονται αξιόπιστα αποτελέσματα χωρίς παρεμβολές από ασκορβικό οξύ και χολερυθρίνη.

Μέθοδος της δοκιμασίας

Τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (NEFA) στο δείγμα μεταβάλλονται με συνθετάση του ακυλο-CoA (ACS) σε ακυλο-CoA, AMP και φωσφορικό οξύ (PPi) με συμβολή του συνενζύμου A (CoA) και τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

Σχηματίζεται ακυλο-CoA το οποίο μετατρέπεται με συμβολή οξειδάσης του ακυλο-CoA (ACOD) σε ενούλοCoA και υπεροξειδίο υδρογόνου. Με παρουσία υπεροξειδάσης (POD) σχηματίζεται, με ποσοτική οξειδωση με 3-μεθυλ-N-αιθυλ-N-(β-υδροξυαιθυλ)-ανιλίνης (MEHA) και 4-Αμινοπυρίνης (4-AA), το υπεροξειδίο του υδρογόνου δίνει μωβ χρωματοσύμπλεγμα. Με τη μέτρηση της απορρόφησης του μωβ χρώματος μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων NEFA.

Αντίδραση



Φυσικοχημικές ενδείξεις αστάθειας

Η ύπαρξη ιζήματος στο αντιδραστήριο ή τιμές ελέγχου πέραν των ορίων που αναφέρει ο κατασκευαστής αποτελούν ένδειξη για αστάθεια του αντιδραστηρίου.

Συσκευές

Το αντιδραστήριο σχεδιάστηκε για χρήση σε αυτόματους αναλυτές που προσφέρονται στο εμπόριο. Ως προς την περιγραφή του χειρισμού του αναλυτή και τις προδιαγραφές παραπέμπουμε στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή της συσκευής. Μία πρακτική αξιολόγηση της διαδικασίας από τον χρήστη στον τόπο χρήσης με προσδιορισμό επαρκούς αριθμού κατάλληλων ορών ελέγχου και ασθενών είναι απαραίτητη.

Εφαρμογή σε αυτόματους αναλυτές

Εισάγετε τις παραμέτρους σύμφωνα με τις Οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή του αναλυτή. Εάν μας το ζητήσετε σας αποστέλλουμε εφαρμογές για αυτόματους αναλυτές.

Αντιδραστήρια

Περιεχόμενο και συνθήκες φύλαξης

| | | |
|----------------|--|-------------------|
| R1 Set: | R1a: Αντιδραστήριο χρώσης A R1: Διάλυμα A | Φύλαξη σε 2-10 °C |
| R2 Set: | R2a: Αντιδραστήριο χρώσης B R2: Διάλυμα B | Φύλαξη σε 2-10 °C |

Συστατικά

| | | |
|-------------------------------|--|-------------|
| R1 Set: | | |
| R1a: | <i>(μετά την ανασύσταση)</i> | |
| Αντιδραστήριο χρώσης 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 |
| | Αζωτούχο νάτριο (λυοφιλιποποιημένο αντιδραστήριο χρώσης) | 0,062 % |
| R1: Διάλυμα A | Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH7,0 | 50 mmol/l |
| | Αζωτούχο νάτριο | 0,05 % |
| R2 Set: | | |
| R2a: | <i>(μετά την ανασύσταση)</i> | |
| Αντιδραστήριο χρώσης B | ACOD | 12 U/ml |
| | POD | 14 U/ml |
| R2: Διάλυμα B | MEHA | 2,4 mmol/l |

Παρασκευή των αντιδραστηρίων

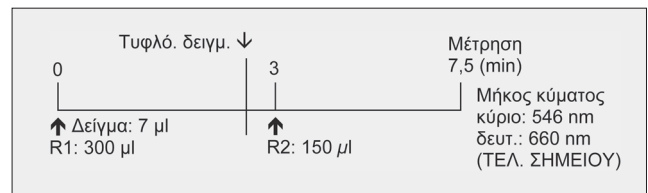
- R1: Αναμινύετε καλά το περιεχόμενο μιας φιάλης με αντιδραστήριο χρώσης A (R1a) με Διαλύτη A (R1). Φύλαξη του διαλύματος χρήσης στους 2-10 °C και κατανάλωση εντός 1 μηνός.
R2: Αναμινύετε καλά το περιεχόμενο μιας φιάλης με αντιδραστήριο χρώσης B (R2a) με Διαλύτη B (R2). Φύλαξη του διαλύματος χρήσης στους 2-10 °C και κατανάλωση εντός 1 μηνός.

Συλλογή και φύλαξη δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό να χρησιμοποιούνται δείγματα ορών. Συνιστάται ο άμεσος προσδιορισμός των τιμών μετά τη λήψη αίματος, διότι τα ένζυμα όπως η λιπάση λιποπρωτεΐνης, φωσφολιπάση κ.λπ. υδrolύουν τα λιπαρά και σχηματίζονται λιπαρά οξέα. Για τη φύλαξη να καταψύχονται τα δείγματα ορού. Σταθερότητα 2 ημέρες στους 4 °C. Η ηπαρίνη in vtro προκαλεί τη διέγερση της λιπάσης λιποπρωτεΐνης, πράγμα που οδηγεί σε αύξηση των λιπαρών οξέων σε θεραπεία ηπαρίνης. Το αίμα αυτών των ασθενών μπορεί να προσδιοριστεί μόνο κατάλληλη με προεπεξεργασία.

Διαδικασία εκτέλεσης

Θερμοκρασία: 37 °C (Hitachi® 737)



Βαθμονομητής: Wako NEFA Standard (προσφέρεται χωριστά.)

Υπολογισμός της συγκέντρωσης NEFA

Η συγκέντρωση NEFA προσδιορίζεται με τη βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης.

$$\text{Παράγοντες μετατροπής: } \text{mg/dL} = \text{mmol/L} \times 28,2$$

$$\text{(υπολογιζόμενο για το ελαϊκό οξύ, MW = 282)}$$

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

Αποτελέσματα

Τα τελικά αποτελέσματα υπολογίζονται αυτομάτως και εκτυπώνονται σε μονάδες συγκέντρωσης mEq/L. Να χρησιμοποιείτε πάντα την ίδια μονάδα μέτρησης για τον βαθμονομητή.

Όρια αναφοράς³

Άνδρες: 0,1-0,60 mmol/l (2,8-16,9 mg/dl)
Γυναίκες: 0,1-0,45 mmol/l (2,8-12,7 mg/dl)

Επειδή οι τιμές εξαρτώνται από την ηλικία, το φύλο, τη διατροφή, τη χώρα και από άλλους παράγοντες, πρέπει κάθε εργαστήριο να προσδιορίζει δικές του τιμές για αυτή τη διαδικασία.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

- (1) **Ορθότητα**
Εάν στη δοκιμασία χρησιμοποιηθεί ένα δείγμα ορού ελέγχου γνωστής συγκέντρωσης, τότε η τιμή μέτρησης κυμαίνεται σε $\pm 15\%$ της γνωστής συγκέντρωσης.
- (2) **Ευαισθησία**
a) Εάν χρησιμοποιηθεί καθαρό νερό σαν δείγμα, η απορρόφηση δεν είναι μεγαλύτερη από 0,140.
b) Εάν χρησιμοποιηθεί ένα πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης (ελαϊκό οξύ 1 mEq/L), η απορρόφηση είναι 0,100–0,380.
- (3) **Ακρίβεια**
Εάν γίνει δοκιμασία σε ένα δείγμα 5 ή περισσότερες φορές εντός ενός κύκλου, ο συντελεστής διασποράς (CV) δεν είναι μεγαλύτερος από 1,5 %.
- (4) **Εύρος μέτρησης**
0,01–4,00 mEq/L NEFA (με εφαρμογή των διαδικασιών εκτέλεσης)

Συσχέτιση

| Υλικό δείγματος | Ορός |
|-----------------------------|---|
| Συντελεστής συσχέτισης | $r = 0,997$ ($n = 50$) |
| Εξίσωση γραμμικής εξάρτησης | $y = 1,013x - 0,043$ |
| y | Wako NEFA-HR(2) (ACS – ACOD-Methode, mEq/l) |
| x | Wako NEFA C (ACS – ACOD-Methode, mEq/l) |

Παρεμβολές

- a) Η χολερυθρίνη μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών.
b) Το ασκορβικό οξύ και η αιμόλυση δεν επιδρούν σημαντικά στις τιμές.
c) Το κιτρικό άλας, ο οξαλικός σίδηρος, το EDTA και το φθοριούχο νάτριο σε συνηθισμένες ποσότητες δεν έχουν σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα της μέτρησης.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Μόνο για διαγνωστική χρήση *in-vitro*.
- Η εφαρμογή αυτής της δοκιμασίας επιτρέπεται μόνο σε εκπαιδευμένο και ειδικευμένο προσωπικό. Ισχύουν οι σχετικές εθνικές και τοπικές προδιαγραφές και νόμοι.
- Δεν επιτρέπεται η χρήση σε ανθρώπους και ζώα *in-vivo*.
- Τα αντιδραστήρια να χρησιμοποιούνται μόνο για την πιο πάνω περιγραφόμενη δοκιμασία. Δεν εγγυούμεθα τη σωστή λειτουργία σε περίπτωση που τα αντιδραστήρια χρησιμοποιηθούν σε άλλες δοκιμασίες και για άλλους σκοπούς.
- Κατά την χρήση αναλυτών να ακολουθείτε τις οδηγίες στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή!
- Φύλαξη των αντιδραστηρίων υπό τις αναφερόμενες συνθήκες. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία κάθε αντιδραστηρίου.
- Σε περίπτωση εκ παραδρομής κατάψυξης των αντιδραστηρίων, να μην χρησιμοποιούνται! Τα αντιδραστήρια αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
- Μετά το άνοιγμα, συνιστάται η άμεση χρήση των αντιδραστηρίων. Αφού ανοιχτεί ένα αντιδραστήριο, να το κλείσετε καλά και να το φυλάξετε στην συνιστώμενη θερμοκρασία.
- Να χρησιμοποιείτε τους περιέκτες και τα άλλα υλικά μόνο για τον περιγραφόμενο σκοπό της δοκιμασίας.
- Οι φιάλες έχουν κλειστεί αεροστεγώς. Να απομακρύνετε αργά το πώμα, ώστε να μην διαφύγει υλικό.
- Εάν χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο NEFA ταυτόχρονα για προσδιορισμό χοληστερίνης ή τριγλυκεριδίων, δεν αποκλείεται να προσροφηθούν τα ένζυμα χοληστερόλη εστεράση και λιποπρωτεΐνη λιπάση του αντιδραστηρίου στην κυβέτα και να επηρεάζονται οι τιμές του NEFA.
- Να χρησιμοποιείτε το πρότυπο NEFA.
- Αυτή η δοκιμασία να μην αποτελεί τη μοναδική βάση για την κατάρτιση κλινικής διάγνωσης.
- Σε περίπτωση επαφής με το στόμα, το δέρμα ή τα μάτια, να τα πλύνετε αμέσως με πολύ νερό.
- Προσοχή! Μη κοπείτε με το αλουμινένιο πώμα όταν το έχετε αφαιρέσει.
- Κατά τη απόρριψη των αντιδραστηρίων να ακολουθείτε τις τοπικές και εθνικές προδιαγραφές. Το διάλυμα A περιέχει 3 mg/L σιδηροκυανούχο κάλιο. (1 mg/L ως κυάνιο).
- Όλα τα υλικά, συμπεριλαμβανομένων των αντιδραστηρίων, που έρχονται σε επαφή με το δείγμα να θεωρούνται ως ενδεχομένως μολυσματικά.
- Το αζίδιο του νατρίου μπορεί μαζί με χαλκό ή μόλυβδο να σχηματίσει εκρηκτικά μίγματα. Αν και αν τα αντιδραστήρια περιέχουν μόνο μηδαμινές ποσότητες αζωτούχου νατρίου, να ξεπλυθούν οι αποχετεύσεις εντατικά με νερό, μετά την απόρριψη των αντιδραστηρίων.

Έλεγχος ποιότητας

Συνιστάται πρόγραμμα ελέγχου ποιότητας για όλα τα κλινικά εργαστήρια.

Βιβλιογραφία

- 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 Tetrahydrolipostatin. Clin. Chem. 46 (7), 950–954 (2000).
- Aufenanger, J. and Kattermann, R. Klinisch-chemische Meßgröße: Freie Fettsäuren (FFS), S. 319–320 in Greiling / Grebner: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. edition, Schattauer (1995).

Πληροφορίες για παραγγελία

| Αρ. παραγγ. | Προϊόν | Συσκευασία |
|-------------|-------------------|-------------------------------------|
| 434-91795 | NEFA-HR(2) R1 Set | R1a: 4 x για 50 mL R1: 4 x 50 mL |
| 436-91995 | NEFA-HR(2) R2 Set | R2a: 4 x για 25 mL R2: 4 x 25 mL |
| 270-77000 | NEFA Standard | CAL: 2 x 10 mL |