

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 vynechání potravy, podchlazení, stresu nebo kouření naopak stoupá. Se stoupáním a klesáním 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.

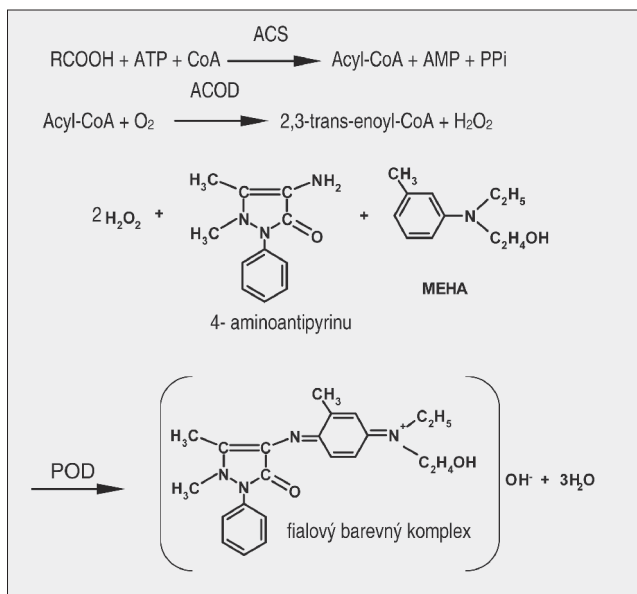
Princip testu

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	50 mmol/l
	Azid sodný	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

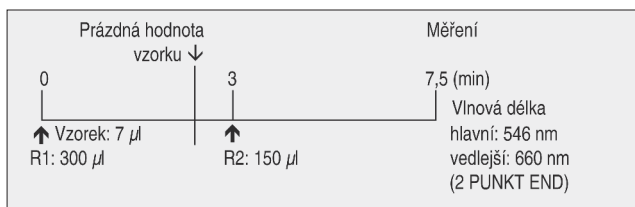
Pro měření by se měli používat vzorky séra.

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 používejte 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 zá 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)

Odchyly

- 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.
- Nádobky a jiné potřeby používejte pouze k předepsanému testovacímu účelu.
- Lahvičky jsou zavřeny pod vakuem. Zátka 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 kyanoželeznanu 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.

Označování v souladu s nařízením (ES) č. 1272/2008

- Produkt je klasifikován a označen podle nařízení CLP.
- Produkt neobsahuje SVHC podle REACH článku 57 >0,1 %.

Nebezpečné komponenty k etiketování

- Acyl Coenzym A Oxidase
- Peroxidase

Výstražné symboly nebezpečnosti



Nebezpečí

Standardní věty o nebezpečnosti

- Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.
- Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

Pokyny pro bezpečné zacházení

- Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
- [V případě nedostatečného větrání] použijte vybavení pro ochranu dýchacích cest.
- PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.
- Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře.
- Zabraňte uvolnění do životního prostředí
- Obsahuje Ascorbate Oxidase. Může vyvolat alergickou reakci.
- Obsahuje Směs látek 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on a 2-methyl-2H-isothiazol-3-on, maleimide. Může vyvolat alergickou reakci.

Kontrola jakosti

Program kontroly kvality se doporučuje pro všechny klinické laboratoře.

Odkazy na literaturu

1. 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).
2. Krebs, M. et al., Prevention of *In Vitro* Lipolysis by Tetrahydrolipstatin. Clin. Chem. 46 (7), 950–954 (2000).
3. 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).

Informace pro objednávku

Objednávací 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