

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.

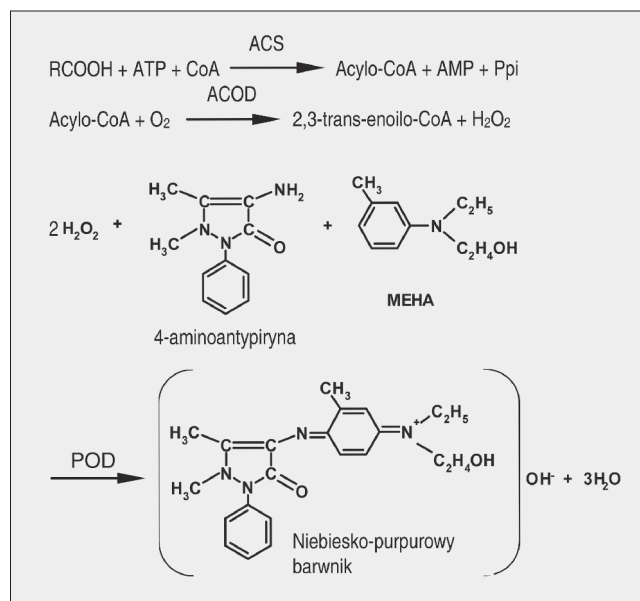
Stężenie NEFA we krwi jest zależne od równowagi pomiędzy ich wychwytem przez wątrobę oraz tkanki obwodowe i uwalnianiem do krwi przez tkankę tłuszczową. Poziom NEFA we krwi obniża się podczas wysiłku fizycznego, natomiast wzrasta podczas głodzenia, ekspozycji na zimno, panice wywołanej stresem lub podczas 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 metodykę 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.

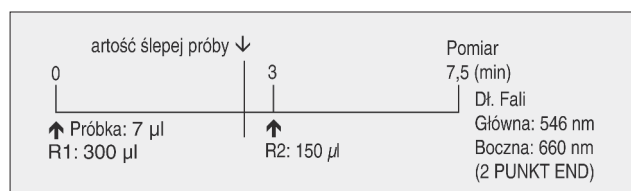
Przygotowanie próbek i ich przechowywanie

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.

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

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

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

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 wartość.
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 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.

Oznakowanie zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008

- Produkt jest klasyfikowany i oznakowany zgodnie z przepisami CLP.
- Produkt nie zawiera SVHC ramach REACH Artykuł 57 >0,1%.

Składniki określające niebezpieczeństwo do etykietowania

- Acył Coenzym A Oxidase
- Peroxidase

Piktogramy określające rodzaj zagrożenia**Niebezpieczeństwo****Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia**

- Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
- Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Zwroty wskazujące środki ostrożności

- Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
- [W przypadku nieodpowiedniej wentylacji] stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych.
- W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
- W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUCIĘ / lekarzem.
- Unikać uwolnienia do środowiska.
- Zawiera Ascorbate Oxidase. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.
- Zawiera mieszaninę 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu, maleimide. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.

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 / GreBner: 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