

#### Destinazione d'uso

Il test Wako NEFA-HR(2) è un metodo enzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa *in vitro* degli acidi grassi liberi (NEFA) nel siero.

#### Riassunto e spiegazione del test

Gli acidi grassi non esterificati (NEFA) legati all'albumina nel siero sono un'importante fonte di energia dei tessuti periferici. La concentrazione di NEFA nel siero dipende dall'equilibrio tra l'assorbimento nel fegato e nei tessuti periferici ed il rilascio dal tessuto adiposo. In caso di sforzo fisico, il contenuto di NEFA si abbassa, e sale in caso di carenza alimentare, di ipotermia, di paura o fumo. Aumento e diminuzione si osservano anche in presenza di diabete, di patologie epatiche o endocrine.

I NEFA venivano dosati con un metodo con estrazione con una soluzione organica, che era complesso da eseguire. Si è ampiamente diffuso il metodo enzimatico con Acil-CoA ossidasi (ACOD) per l'eccellente specificità e la rapida esecuzione. NEFA-HR(2) è un kit di reagenti per la determinazione dei NEFA basato su un metodo enzimatico che utilizza 3-metil-N-etil-N-(β-idrossietil)-anilina (MEHA) come complesso colorato viola. Si ottengono risultati attendibili senza interferenze dovute ad acido ascorbico e bilirubina.

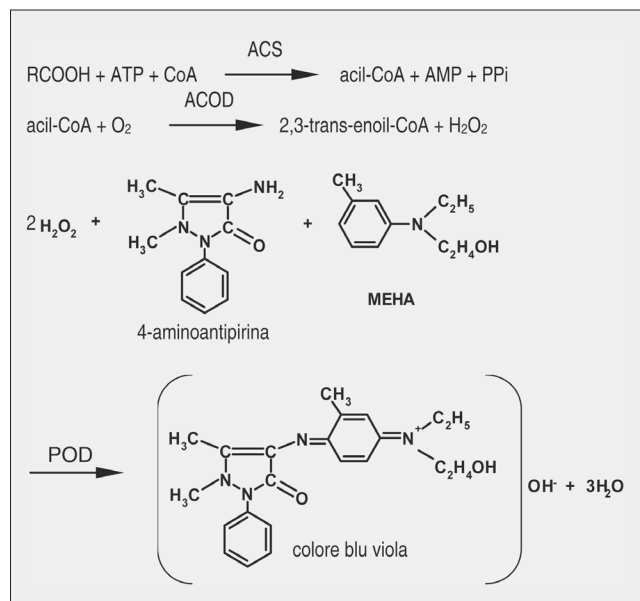
#### Principio del test

Gli acidi grassi non esterificati (NEFA) nel campione sono trasformati in Acyl-CoA, AMP e acido pirofosforico (PPi) per l'azione del Acyl-CoA sintetasi (ACS) in presenza del coenzima A (CoA) e dell'adenosina-5-trifosfato-sale disodico (ATP).

L'Acil-CoA ottenuta è ossidata e produce 2,3-trans-Enoil-CoA e perossido di idrogeno per l'azione dell'Acil-CoA ossidasi (ACOD). In presenza di perossidasi (POD), l'idrogeno perossidasi formatasi produce un complesso colorato blu-viola mediante condensazione quantitativa ossidativa con 3-metil-N-etil-N-(β-idrossietil)-anilina (MEHA) e 4-aminoantipirina (4-AA).

Attraverso la misurazione dell'assorbimento del colore blu-viola è possibile determinare la concentrazione di NEFA.

#### Reazione



#### Segni fisici e chimici di instabilità

La presenza di precipitati nel reagente o valori di controllo al di fuori dell'intervallo di accettabilità indicato dal produttore possono essere un segnale di instabilità del reagente.

#### Apparecchiature

Il reagente è designato per essere usato sulle apparecchiature di analisi disponibili in commercio. Per quanto attiene la descrizione dell'uso e delle specifiche dell'apparecchio far riferimento al manuale operativo. È indispensabile una convalida pratica da parte dell'utilizzatore della procedura nel luogo di utilizzo mediante l'analisi di un numero adeguato di sieri di controllo e di pazienti.

#### Uso su diverse apparecchiature di analisi

Inserite i parametri attenendosi alle istruzioni per l'uso del costruttore dell'apparecchio. Su richiesta sono disponibili applicazioni per le apparecchiature di analisi.

#### Reagenti

##### Contenuto e condizioni di conservazione

<b>R1 Set:</b>	R1a: Reagente colore A	Conservare a 2–10 °C
	R1: Solvente A	
<b>R2 Set:</b>	R2a: Reagente colore B	Conservare a 2–10 °C
	R2: Solvente B	

##### Componenti

<b>R1 Set:</b>	<i>(dopo ricostituzione)</i>	
<b>R1a:</b>	ACS	0,53 U/ml
<b>Reagente colore A</b>	CoA	0,31 mmol/l
	ATP	4,3 mmol/l
	4-AA	1,5 mmol/l
	AOD	2,6 U/ml
	Sodio Azide	0,062 %
	(Reagente colore liofilizzato)	(0,8 %)
<b>R1: Solvente A</b>	Fosfato-tampone, pH 7,0	50 mmol/l
	Sodio Azide	0,05 %
<b>R2 Set:</b>	<i>(dopo ricostituzione)</i>	
<b>R2a:</b>	ACOD	12 U/ml
<b>Reagente colore B</b>	POD	14 U/ml
<b>R2: Solvente B</b>	MEHA	2,4 mmol/l

#### Preparazione dei reagenti

R1: Preparare l'R1 mescolando il contenuto di un flacone di reagente colore A (R1a) con il solvente A (R1), conservare a 2–10 °C ed utilizzare entro 1 mese.

R2: Preparare l'R2 mescolando il contenuto di un flacone di reagente colore B (R2a) con il solvente B (R2), conservare a 2–10 °C ed utilizzare entro 1 mese.

#### Prelievo e conservazione dei campioni

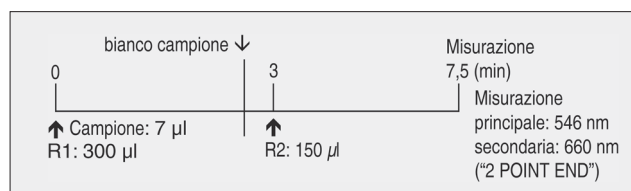
Dovranno essere usati dei campioni di siero per la determinazione.

Analizzare i campioni subito dopo il prelievo, perché enzimi come la lipoproteinlipasi, la fosfolipasi etc. idrolizzano i lipidi e formano acidi grassi. Per conservare i sieri congelarli. Stabilità: 2 giorni a 4 °C.<sup>1</sup>

La terapia con eparina provoca un errato aumento dei valori. Poiché la lipoproteina lipasi viene stimolata dall'eparina presente nei campioni dei pazienti trattati, il sangue di questi pazienti può essere usato solo dopo un appropriato pretrattamento per questa determinazione.<sup>2</sup>

#### Procedura standard

Temperatura 37 °C (Hitachi® 737)



Calibratore: Wako NEFA Standard (disponibile separatamente)

#### Calcolo della concentrazione di NEFA

La concentrazione di NEFA viene determinata con una curva di calibrazione.

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

$$(\text{calcolati per l'acido oleico, MW} = 282)$$

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

#### Risultati

I risultati finali sono calcolati automaticamente ed espressi in unità di concentrazione mEq/l. Usare sempre la stessa unità di misura anche per il calibratore.

#### Intervali di riferimento<sup>3</sup>

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

Poiché i valori dipendono da età, sesso, alimentazione, provenienza e da altri fattori, ogni laboratorio dovrebbe determinare i propri intervalli di riferimento per questa procedura.

#### Performance del test

- (1) **Accuratezza**  
Quando un siero di controllo a concentrazione nota viene analizzato, il valore di misurazione cade in un intervallo di  $\pm 15\%$  del valore della concentrazione nota.
- (2) **Sensibilità**
  - a) Se come campione viene usata acqua distillata, l'assorbanza non è maggiore di 0,140.
  - b) Se viene usata una concentrazione standard nota (acido oleico 1 mEq/l), l'assorbanza è compresa tra 0,100–0,380.
- (3) **Precisione**  
Se un campione viene analizzato non meno di 5 volte in una seduta, il coefficiente di variazione (CV) non è maggiore di 1,5 %.
- (4) **Intervallo di misurazione**  
0.01–4.00 mEq/l NEFA (in caso si usi la procedura standard)

#### Correlazione

Campione	Siero
Coefficiente di correlazione	$r = 0,997$ (n = 50)
Equazione di regressione	$y = 1,013x - 0,043$
y	Wako NEFA-HR(2) (metodo ACS - ACOD, mEq/l)
x	Wako NEFA C (metodo ACS - ACOD, mEq/l)

#### Interferenze

- a) La presenza di bilirubina provoca una lieve diminuzione dei valori.
- b) Acido ascorbico ed emolisi non hanno alcuna incidenza significativa sui valori.
- c) Citrato, ossalato, EDTA e fluoruro di sodio nelle normali quantità non hanno alcuna incidenza significativa sul risultato della misurazione né máleresultatet.

#### Avvertenze e misure precauzionali

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- L'uso e l'applicazione di questo test è riservata esclusivamente a personale specializzato in possesso di formazione specifica. Far riferimento alle norme ed alle leggi vigenti a livello nazionale e locale.
- Non può essere usato *in vivo* sull'uomo o su animali.
- Usare i reagenti sopra descritti esclusivamente per la finalità qui descritta. Non può essere garantito alcun risultato se i reagenti vengono impiegati in altre procedure o per altri scopi.
- Per l'uso delle apparecchiature si prega di seguire il manuale operativo del costruttore in condizioni appropriate.
- Conservare i reagenti alle condizioni indicate. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sulle etichette di ogni flacone di reagente.
- Non utilizzare i reagenti congelati per sbaglio. Tali reagenti possono dare risultati errati.
- Si sconsiglia la conservazione prolungata dei reagenti aperti. Dopo l'apertura, richiuderli bene e conservarli alla temperatura indicata.
- Utilizzare i contenitori e i materiali solo allo scopo descritto per questa procedura.
- I flaconi sono chiusi sottovuoto. Togliere i tappi lentamente per impedire la fuoriuscita del materiale liofilo.
- Quando il reagente NEFA viene usato insieme ai reagenti per il colesterolo od i trigliceridi, può accadere che gli enzimi colesterolo esterasi e lipoproteina lipasi presenti nei reagenti inseriti nelle cuvette possano influire sui valori della determinazione dei NEFA.
- Usare lo Standard NEFA per la calibrazione.
- Questa analisi non dovrà costituire l'unico fattore determinante per la definizione di una diagnosi clinica.
- Non portare i reagenti a contatto con la bocca, gli occhi o la pelle! In caso di contatto sciacquare immediatamente con acqua abbondante.
- Attenzione a non tagliarsi con i tappi in alluminio quando vengono rimossi dal flacone.
- Per lo smaltimento dei reagenti, attenersi alla normativa regionale e nazionale. La soluzione A contiene 3 mg/l di ferrocianuro di potassio. (1 mg/l come ciano).
- Tutti i materiali compresi i reagenti ed i loro contenitori che vengono a contatto con il campione dovranno essere considerati come potenzialmente infettivi.
- Il sodio azide può formare miscele esplosive con il rame o il piombo. Anche se i reagenti contengono solo quantità minime di sodio azide, gli scarichi dovranno essere sciacquati abbondantemente con acqua dopo lo smaltimento dei reagenti.

#### Controllo dei qualità

Si consiglia un programma di controllo di qualità per tutti i laboratori clinici.

#### Letteratura

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 / Greßner: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. edition, Schattauer (1995).

#### Informazioni per ordinare

Codice	Prodotto	Confezione
434-91795	NEFA-HR(2) R1 Set	R1a: 4 x per 50 ml R1: 4 x 50 ml
436-91995	NEFA-HR(2) R2 Set	R2a: 4 x per 25 ml R2: 4 x 25 ml
270-77000	NEFA Standard	CAL: 2 x 10 ml