

### Zweckbestimmung

Wako NEFA-HR(2) Test ist ein enzymatischer Farbttest zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der freien Fettsäuren (NEFA) im Serum.

### Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Albumingebundene freie Fettsäuren (NEFA) im Serum sind ein wichtiger Energielieferant im peripheren Gewebe. Die NEFA-Konzentration im Serum ist abhängig von einem Aufnahmegleichgewicht zwischen Leber und peripheren Gewebe und einer Freisetzung aus dem Fettgewebe. Bei körperlicher Anstrengung fällt der NEFA Gehalt ab und er steigt an bei Nahrungskarenz, Unterkühlung, bei Stresspanik oder beim Rauchen. Anstieg und Abnahme werden auch beobachtet bei Diabetes, Leber- und endokrinen Erkrankungen.

NEFA wurde mit der Extraktionsmethode bestimmt, die durch den Einsatz organischer Lösungsmittel schwierig durchzuführen war. Weitverbreitet hat sich die enzymatische Methode mit Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) wegen der exzellenten Spezifität und der präzisen Durchführung. NEFA-HR(2) ist ein Reagenzkit für die Bestimmung Freier Fettsäuren und basiert auf einer enzymatischen Methode mit 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) als violettes Farbgagens. Es werden verlässliche Ergebnisse ohne Interferenzen durch Ascorbinsäure und Bilirubin erzielt.

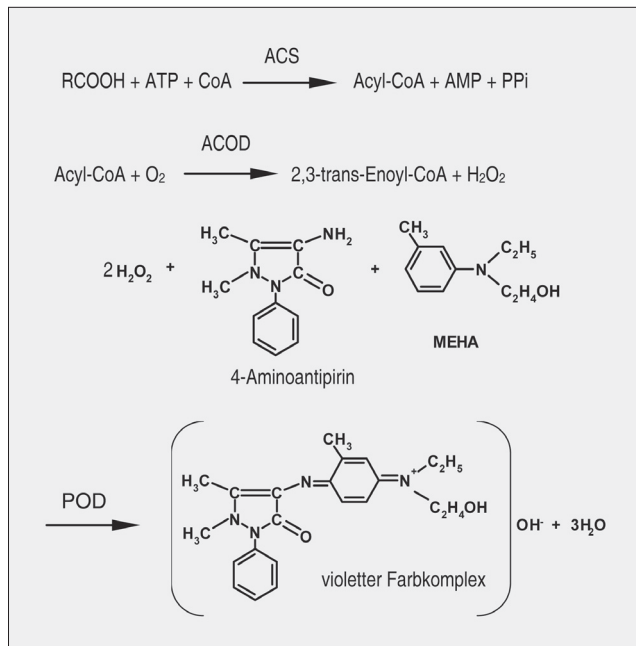
### Testprinzip

Unveresterte Fettsäuren (NEFA) in der Probe werden durch Acyl-CoA Synthetase (ACS) zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure (PPi) umgesetzt unter Mitwirkung von Coenzym A (CoA) und Adenosin-5-Triphosphat-Dinatriumsalz (ATP).

Es entsteht Acyl-CoA was unter Einwirkung von Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. In Anwesenheit von Peroxidase (POD), wird unter Einwirkung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) durch oxidative Kupplung ein blau-violetter Farbkomplex gebildet.

Durch die Messung der Absorption der blau-violetten Farbe kann die NEFA-Konzentration bestimmt werden.

### Reaktionen



### Physikalische und chemische Anzeichen von Instabilität

Das Vorhandensein eines Niederschlags im Reagenz oder Kontrollwerte außerhalb des vom Hersteller angegebenen Bereichs sind ein Hinweis auf die Instabilität des Reagenzes.

### Geräte

Das Reagenz ist zur Verwendung auf kommerziell erhältlichen Analysenautomaten vorgesehen. Bezüglich einer Beschreibung der Gerätebedienung und -spezifikation weisen wir auf das Handbuch des Geräteherstellers. Eine praktische Validierung des Verfahrens vom Anwender am Einsatzort durch Bestimmung einer ausreichenden Anzahl adäquater Kontroll- und Patientenserum ist unerlässlich.

### Reagenzien

#### Inhalt und Lagerbedingungen

<b>R1 Set:</b>	R1a: Farbreagenz A R1: Lösung A	Lagerung bei 2–10 °C
<b>R2 Set:</b>	R2a: Farbreagenz B R2: Lösung B	Lagerung bei 2–10 °C

#### Bestandteile

##### R1 Set:

<b>R1a: Farbreagenz A</b>	(nach Rekonstitution)	
ACS		0,53 U/ml
CoA		0,31 mmol/l
ATP		4,3 mmol/l
4-AA		1,5 mmol/l
ADD		2,6 U/ml
Natriumazid (Farbreagenz lyophilisiert)		(0,8 %)
<b>R1: Lösung A</b>	Phosphat-Puffer, pH 7,0 Natriumazid	50 mmol/l 0,05 %

##### R2 Set:

<b>R2a: Farbreagenz B</b>	(nach Rekonstitution)	
ACOD		12 U/ml
POD		14 U/ml
<b>R2: Lösung B</b>	MEHA	2,4 mmol/l

### Herstellung der Reagenzien

R1: Den Inhalt einer Flasche Farbreagenz A (R1a) mit der Lösung A (R1) gut mischen. Die Gebrauchslösung bei 2–10 °C lagern und innerhalb 1 Monats verbrauchen.

R2: Den Inhalt einer Flasche Farbreagenz B (R2a) mit der Lösung B (R2) gut mischen. Die Gebrauchslösung bei 2–10 °C lagern und innerhalb 1 Monats verbrauchen.

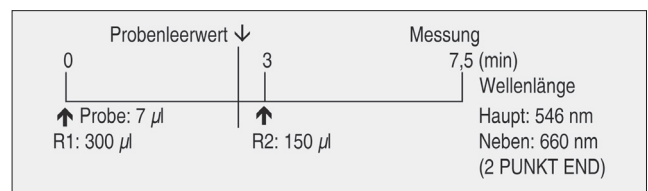
### Probengewinnung und -aufbewahrung

Für die Bestimmung sollten Serumproben verwendet werden. Es wird empfohlen die Werte unmittelbar nach der Blutabnahme zu bestimmen, denn Enzyme wie Lipoproteinlipase, Phospholipase hydrolysieren die Fette und es bilden sich Fettsäuren. Zur Lagerung die Serumproben bitte einfrieren. Stabilität: 2 Tage bei 4 °C.

Heparin bewirkt eine Stimulierung der Lipoprotein Lipase, was zu einem Anstieg der Freien Fettsäuren unter Heparintherapie führt. Das Blut dieser Patienten kann nur mittels einer Vorbehandlung bestimmt werden.²

### Standard-Verfahren

Temperatur: 37 °C (Hitachi® 737)



Kalibrator: Wako NEFA Standard (separat lieferbar)

### Berechnung der NEFA-Konzentration

Die NEFA-Konzentration wird mit Hilfe einer Kalibrationskurve bestimmt.

$$\begin{aligned} \text{Umrechnungsfaktoren: } & \text{mg/dl} = \text{mmol/l} \times 28,2 \\ & \text{(bezogen auf Oleinsäure, MW (Mol. Gew.)} = 282) \\ & \text{mmol/l (mval/l} = \text{mEq/l)} = \text{mg/dl} \times 0,035 \end{aligned}$$

### Anwendung auf verschiedenen Analysenautomaten

Geben Sie die Parameter entsprechend der Gebrauchsanweisung des Geräteherstellers ein. Applikationen für Analysenautomaten versenden wir auf Anfrage.

### Ergebnisse

Die Endergebnisse werden automatisch berechnet und in Konzentrationseinheiten mEq/l ausgedrückt. Benutzen Sie immer auch die gleiche Maßeinheit für den Kalibrator.

### Referenzbereiche³

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

Da die Werte von Alter, Geschlecht, Ernährung, Land und anderen Faktoren abhängig sind, sollte jedes Labor seine eigenen Werte für dieses Verfahren bestimmen.

#### Leistungsdaten des Tests

- (1) **Richtigkeit**  
Wird eine Kontrollserumprobe bekannter Konzentration im Test eingesetzt, liegt der Messwert im Bereich von  $\pm 15\%$  der bekannten Konzentration.
- (2) **Sensitivität**  
a) Wird reines Wasser als Probe eingesetzt, beträgt die Absorption nicht mehr als 0,140.  
b) Wird ein Standard bekannter Konzentration (Ölsäure 1 mEq/l) eingesetzt, liegt die Absorption im Bereich von 0,100–0,380.
- (3) **Präzision**  
Wird eine Probe in einem Lauf 5-mal oder häufiger getestet, liegt der VK nicht höher als 1,5 %.
- (4) **Meßbereich**  
0,01–4,00 mEq/l NEFA (Bei Anwendung der Standard-Verfahren)

#### Korrelation

Probenmaterial	Serum
Korrelationskoeffizient	$r = 0,997$ ( $n = 50$ )
Regressionsgleichung	$y = 1,013x - 0,043$
y	Wako NEFA-HR(2) (ACS – ACOD-Methode, mEq/l)
x	Wako NEFA C (ACS – ACOD-Methode, mEq/l)

#### Interferenzen

- a) Bilirubin kann zu einer leichten Verminderung der Werte führen.
- b) Ascorbinsäure und Hämolyse haben keinen bedeutenden Einfluss auf die Werte.
- c) Zitrat, Oxalat, EDTA und Natriumfluorid in den üblichen Mengen haben keinen wesentlichen Einfluss auf das Messergebnis.

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für *In-vitro*-Anwendungen.
- Die Anwendung dieses Tests ist ausschließlich ausgebildetem Fachpersonal vorbehalten. Es gelten die einschlägigen nationalen und regionalen Vorschriften und Gesetze.
- Darf beim Menschen oder Tier nicht *In-vivo* angewendet werden.
- Die Reagenzien sind ausschließlich für das hier beschriebene Verfahren zu verwenden. Eine Leistung kann nicht garantiert werden, wenn die Reagenzien in anderen Verfahren oder für andere Zwecke eingesetzt werden.
- Bei der Gerätebedienung bitte das Benutzerhandbuch des Herstellers beachten!
- Lagerung der Reagenzien unter den angegebenen Bedingungen. Reagenzien nach dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Irrtümlich eingefrorene Reagenzien nicht mehr verwenden! Solche Reagenzien können zu falschen Ergebnissen führen.
- Längere Aufbewahrung der angebrochenen Reagenzien wird nicht empfohlen. Nach dem Anbruch bitte wieder gut verschließen und bei der angegebenen Temperatur lagern.
- Die Behälter und andere Materialien nur für den beschriebenen Testzweck verwenden.
- Die Flaschen sind unter Vakuum verschlossen. Den Stopfen bitte langsam entfernen damit kein Material entweichen kann.
- Wenn das NEFA Reagenz zusammen mit einer Cholesterin oder Triglyzeridbestimmung verwendet wird, kann es vorkommen, dass die Enzyme Cholesterin Esterase und Lipoprotein Lipase in den anderen Reagenzien an der Küvette anhaften und die Werte der NEFA Bestimmung beeinflussen.
- Den NEFA Standard für die Kalibration benutzen.
- Dieser Assay sollte nicht alleinige Grundlage für die Erstellung einer klinischen Diagnose sein.
- Die Reagenzien nicht an Mund, Augen, oder Haut bringen! Bei Kontakt mit der Haut oder den Augen umgehend mit viel Wasser spülen.
- Vorsicht! Nicht mit dem Aluminiumverschluss schneiden, wenn dieser entfernt wird.
- Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die regionalen und nationalen Vorschriften zu beachten. Lösung A enthält 3 mg/l Kaliumisocyanid. (1 mg/l als Zyan).
- Alle Materialien die mit Probe in Berührung kommen sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Der Umgang mit diesen Materialien sollte in Übereinstimmung mit den Leitlinien guter Laborpraxis und in einer Weise erfolgen, die den geltenden nationalen und internationalen Bestimmungen entspricht.
- Natriumazid kann mit Kupfer oder Blei explosive Gemische bilden. Auch wenn die Reagenzien nur minimale Mengen Natriumazid enthalten, sollten die Abflüsse ausgiebig mit Wasser gespült werden, nachdem die Reagenzien entsorgt wurden.

#### Qualitätskontrolle

Ein Qualitätskontrollprogramm wird für alle klinischen Laboratorien empfohlen.

#### Literatur

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).

#### Bestellinformation

Best.-Nr.	Produkt	Packung
434-91795	NEFA-HR(2) R1 Set	R1a: 4 x für 50 ml R1: 4 x 50 ml
436-91995	NEFA-HR(2) R2 Set	R2a: 4 x für 25 ml R2: 4 x 25 ml
270-77000	NEFA Standard	CAL: 2 x 10 ml