

## Zastosowanie

Wako NEFA –HR(2) jest opartym 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.

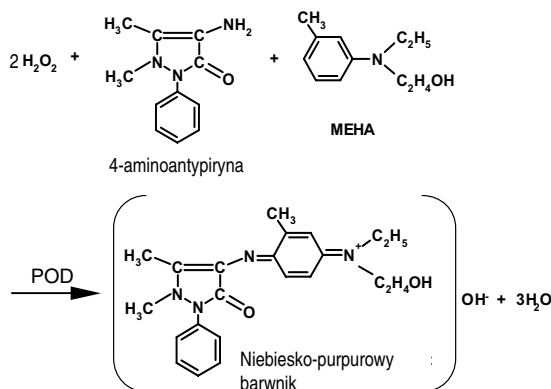
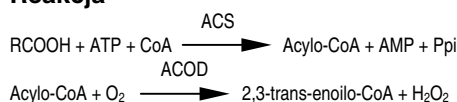
Stężenie NEFA we krwi jest zależne od równowagi pomiędzy ich wychwytem przez wątrobę oraz tkanki obwodowe i uwalnianiem do krwi przez tkankę tłuszczową. Poziom NEFA we krwi obniża się podczas wysiłku fizycznego, natomiast wzrasta podczas głodzenia, ekspozycji na zimno, panice wywołanej stresem lub podczas 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 zapewniająca wysoką specyficzność i prostotę metody oznaczenia. Test NEFA-HR(2) do oznaczenia NEFA i bazuje 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 AMP oraz 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

<b>R1 Set:</b>	R1a: Odczynnik koloru A	Przechowywać w temp. 2 - 10°C
	R1: Roztwór A	
<b>R2 Set:</b>	R2a: Odczynnik koloru B	Przechowywać w temp. 2 - 10°C
	R2: Roztwór B	

### Skład

<b>R1 Set:</b>	<i>(po rekonstytucji)</i>	
<b>R1a:</b>		
<b>Odczynnik koloru A</b>	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	0,055% (jako R1)
	(odczynnik koloru A liofilizowany)	(0,8%)
<b>R1: Roztwór A</b>	Bufor fosforanowy, pH 7,0	50 mmol/l
	Azydek sodu	0,05%
<b>R2 Set:</b>	<i>(po rekonstytucji)</i>	
<b>R2a:</b>		
<b>Odczynnik koloru B</b>	ACOD	12 U/ml
	POD	14 U/ml
<b>R2: Roztwór B</b>	MEHA	2,4 mmol/l

## Przygotowanie odczynników

- R 1: Zawartość butelki z odczynnikiem koloru A (R1a) rozpuścić w roztworze A (R1). Po rozpuszczeniu przechowywać w temp. 2 - 10°C. Zużyć w ciągu 10 dni.
- R 2: Zawartość butelki z odczynnikiem koloru B (R2a) rozpuścić w roztworze B (R2). Po rozpuszczeniu przechowywać w temp. 2 - 10°C. Zużyć w ciągu 3 tygodni.

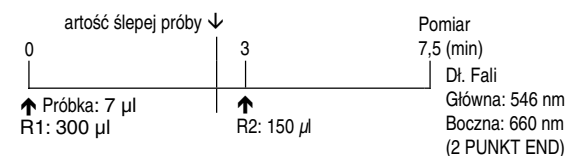
## Przygotowanie próbek i ich przechowywanie

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 uwalniają kwasy tłuszczowe. Jeżeli niemożliwe jest natychmiastowe oznaczenie próbki przechowywać zamrożone. Trwałość: 2 dni przy temp. 4°C<sup>1</sup>.

Podanie *in vivo* heparyny powoduje zawyżenie uzyskanych wyników. W terapii heparynowej heparyna powoduje wzrost aktywności lipazy lipoproteinowej, próbki pobrane od tych pacjentów można oznaczyć tylko po wcześniejszym przygotowaniu<sup>2</sup>.

## 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.

## Stosowanie w automatycznych analizatorach

Parametry pracy należy ustawić zgodnie z instrukcją producenta urządzenia. Na życzenie wysyłamy aplikację 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 referencyjnych<sup>3</sup>

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 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 czystszej 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) **Precyzyja**  
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 wartości.
- 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 wieczkiem 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 azotku sodu, podczas usuwania należy spuścić rury kanalizacyjne dużą ilością wody.
- Ten zestaw (R1) zawiera składniki, który są klasyfikowane według dyrektywy 1999/45/EG.

**Symbol i oznaczenie niebezpieczeństwa**

Xn Szkodliwy dla zdrowia

**Ryzyka:**

- R 22: Działa szkodliwie po połknięciu  
R 52/53: Działa szkodliwie na organizmy wodne; może powodować długą utrzymującą się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym.

**Środki bezpieczeństwa:**

- S 28: Zanieczyszczoną skórę natychmiast przemyć dużą ilością wody  
S 45: W przypadku awarii lub jeżeli źle się poczujesz, niezwłocznie zasięgnij porady lekarza - jeżeli to możliwe, pokaż etykietę  
S 60: Produkt i opakowanie usuwać jako odpad niebezpieczny.  
S 61: Unikać zrzutów do środowiska. Postępować zgodnie z instrukcją lub kartą charakterystyki.

**Kontrola jakości**

Zaleca się stworzenie programu kontroli jakości dla laboratoriów klinicznych.

**Literatura**

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/Greifner: 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