



## Adaptionsvorschrift für die quantitative Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum / Plasma mit dem Vet Photometer

**Best.Nr.** NEFA 013  
Inhalt R1 : 1 x 50 mL\*  
R1a: 1 x for 50 mL\*  
R2 : 1 x 25 mL\*  
R2a: 1 x for 25 mL\*

Zusätzlich erforderlich:  
NEFA - Standard (1x10 mL)\* Best.Nr. NEFA ST  
Diaglobal-Rundküvetten, 40 Stk. Best.Nr. LH 075  
\* Produkt der FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

**Methode**  
ACS-ACOD-Methode

**Testprinzip**  
s. Packungsbeilage FUJIFILM

**Probenmaterial**  
Humanes Serum und Plasma sowie Serum / Plasma von Rindern und anderen Großtieren.  
Stabilität im Serum: 2 Tage (+4°C). Es wird empfohlen, die Werte möglichst unmittelbar nach der Blutabnahme zu bestimmen, da verschiedene Serumenzyme Fette unter Bildung von Freien Fettsäuren spalten. Proben, die gelagert werden sollen, einfrieren.

**Reagenzien**  
Inhalt / Konzentrationen der gebrauchsfertigen Lösung:  
s. Packungsbeilage FUJIFILM

**Sicherheitshinweis**  
Das lyophilisierte Reagenz R1a enthält 0,8 % Natriumazid und ist gemäß EG-Verordnung als gesundheitsschädlich eingestuft.  
Auf der Faltschachtel bzw in der FUJIFILM - Packungsbeilage angegebene Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten.

**Lagerung und Haltbarkeit**  
Die Reagenzien sind bei +2°C bis +8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar.

**Messbedingungen**  
Messgerät: Vet Photometer Diaglobal  
Messwellenlänge: 520nm  
Temperatur: Raumtemperatur

**Hinweis**  
Für die Plasmagewinnung vor Ort empfehlen wir die Diaglobal-Minizentrifuge (Best.Nr. DZ 002).

**Herstellung der Reagenzien**  
Reagenz R1: Inhalt von Flasche R1a mit Lösung R1 (50 mL) mischen.  
Reagenz R2: Inhalt von Flasche R2a mit Lösung R2 (25 mL) mischen.  
Die gebrauchsfertigen Reagenzien bei +2 bis +8°C lagern und innerhalb eines Monats verbrauchen.

### Arbeitsanleitung

In Rundküvetten pipettieren:			
	Leerwert	Standard	Analyse
Reagenz R1	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Standard	--	50 µL	--
Probe	--	--	50 µL
Mischen und 10 Minuten bei RT stehen lassen.			
Reagenz R2	500 µL	500 µL	500 µL
Mischen und 10 Minuten bei RT stehen lassen. Standard und Analyse gegen Leerwert messen.			

**Vorgehensweise**

- Test <NEFA> anwählen.
- Küvette mit Leerwert in das Photometer einsetzen (Nullpunkteinstellung).
- Nach dem Signalton Küvette entfernen.
- Küvette mit Standard in das Photometer einsetzen, (die Standard-Extinktion wird im Display angezeigt).
- Küvette entfernen.
- Küvette mit Probe (= Analyse) in das Photometer einsetzen, das Messergebnis wird in mmol/L angezeigt.

**Berechnung**  
Der Algorithmus zur Berechnung ist im Gerät gespeichert.

NEFA-Konzentration c im Serum/Plasma:  
 $c \text{ [mmol/L]} = 1,00 \times \text{Ext. Analyse} / \text{Ext. Standard}$   
Umrechnung im mg/dL:  $\text{mmol/L} \times 28,25 = \text{mg/dL}$

**Leistungsdaten des Tests**  
s. Packungsbeilage FUJIFILM

**Hinweise zur Entsorgung**  
Abfallschlüsselnummer 180106:  
Küvetten mit Reagenz gelten als Sonderabfall.  
Reagenz nicht in Oberflächenwasser oder die Kanalisation gelangen lassen.  
Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften.  
Nichtkontaminierte und restentleerte Verpackungen können einer Wiederverwertung zugeführt werden.



## Adaption instructions for the quantitative determination of free fatty acids in serum/plasma using the Vet Photometer

**Order no.** NEFA 013  
**Contents** R1 : 1 x 50 mL\*  
R1a: 1 x for 50 mL\*  
R2 : 1 x 25 mL\*  
R2a: 1 x for 25 mL\*

Additionally required:  
NEFA standard (1x10 mL)\* Order no. NEFA ST  
Diaglobal round cuvettes, 40 pcs. Order no. LH 075  
\* Product from FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

**Method**  
ACS-ACOD method

**Testing principle**  
See FUJIFILM package insert

**Sample material**  
Human serum / plasma as well as serum/plasma from cattle and other large animals.  
Stability in serum: 2 days (+4 °C). It is advisable to determine the values immediately after blood is taken, wherever possible, as various serum enzymes break down fats to form free fatty acids. Freeze samples that are to be stored.

**Reagents**  
Contents/concentrations of the ready-to-use solution: see FUJIFILM package insert

**Safety notice**  
The lyophilised reagent R1a contains 0.8% sodium azide and is classified as hazardous mixture according to EC regulations.  
Please observe warnings and precautionary measures stated on the box or package insert.

**Storage and shelf life**  
At +2 °C to +8 °C, the reagents will keep until the expiry date stated on the packaging.

**Measurement conditions**  
Instrument: Diaglobal Vet Photometer  
Measurement wavelength: 520 nm  
Temperature: Room temperature

**Note**  
For collecting plasma on-site, we recommend the Diaglobal minicentrifuge (order no. DZ 002).

**Preparation of reagents**  
Reagent R1: Mix contents of bottle R1a with solution R1 (50 mL).  
Reagent R2: Mix contents of bottle R2a with solution R2 (25 mL).  
Store the ready-to-use reagents between +2 °C and +8 °C and use within one month.

### Working instructions

Pipette into round cuvettes:			
	Blank	Standard	Analysis
Reagent R1	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Standard	--	50 µL	--
Sample	--	--	50 µL
Mix and leave to stand for 10 minutes at RT.			
Reagent R2	500 µL	500 µL	500 µL
Mix and leave to stand for 10 minutes at RT. Measure "Standard" and "Analysis" against "Blank".			

**Procedure**

- Select the <NEFA> test.
- Insert "Blank" cuvette into photometer (zero-point adjustment).
- Remove cuvette after the beep.
- Insert "Standard" cuvette into photometer (the display shows the standard absorbance).
- Remove cuvette.
- Insert cuvette containing sample (= "Analysis") into photometer; the measurement result is displayed in mmol/L.

**Calculation**  
The algorithm for the calculation is stored in the device.

NEFA concentration c in serum/plasma:  
 $c \text{ [mmol/L]} = 1.00 \times \text{Abs. Analysis} / \text{Abs. Standard}$   
Conversion to mg/dL:  $\text{mmol/L} \times 28.25 = \text{mg/dL}$

**Test performance characteristics**  
See FUJIFILM package insert

**Information on disposal**  
Waste code number 180106:  
Vials with reagent are considered hazardous waste. Do not allow reagent to reach surface water or sewage system.  
Dispose of in accordance with official regulations.  
Non-contaminated and completely empty packaging can be recycled.  
Non-contaminated and completely empty packaging can be recycled.

### Zweckbestimmung

Wako NEFA-HR(2) Test ist ein enzymatischer Farbtest 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.

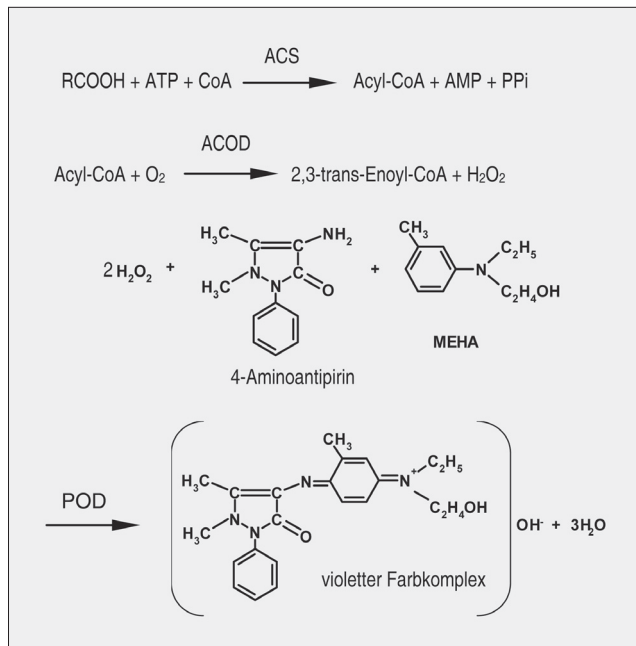
### Testprinzip

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)		0,062 % (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.

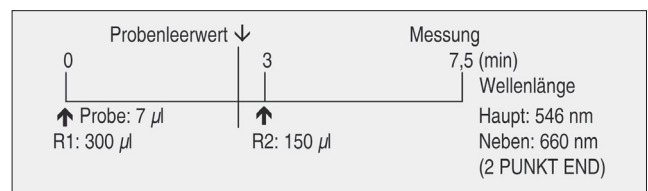
### Probengewinnung und -aufbewahrung

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

#### Intended use

The Wako NEFA-HR(2) reagent is an *in vitro* enzymatic colorimetric method assay for the quantitative determination of non-esterified fatty acids (NEFA) in serum.

#### Summary and explanation of the test

Non-esterified fatty acid (NEFA) in serum binding albumin, is used as an important energy source of peripheral tissues. The amount of NEFA in serum depends on a balance between intake in liver and peripheral tissues, and the release from adipose tissues. Amount of NEFA decreases by physical exercise, increases by starvation, cold, fear or smoking. And then increase or decrease of NEFA is observed in diabetes, hepatic diseases or endocrine diseases.

NEFA had been assayed by organic solvent extraction method, which was complicated to operate. Enzymatic method using Acyl-CoA oxidase (ACOD) has become widespread due to excellent specificity and concise procedure. NEFA-HR(2) is the reagent kit for NEFA assay based on enzymatic method using 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Aniline (MEHA) as a violet color agent.

It gives reliable results without interference from ascorbic acid and bilirubin.

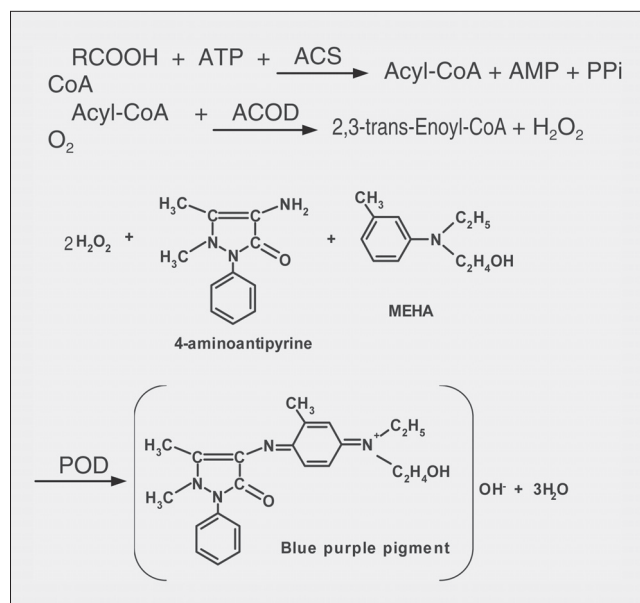
#### Principle of the method

Non-esterified fatty acid (NEFA) in sample is converted to Acyl-CoA, AMP and pyrophosphoric acid (PPi) by the action of Acyl-CoA synthetase (ACS), under coexistence with coenzyme A (CoA) and adenosine 5-triphosphate disodium salt (ATP).

Obtained Acyl-CoA is oxidized and yields 2,3-trans-Enoyl-CoA and hydrogen peroxide by the action of Acyl-CoA oxidase (ACOD). In the presence of peroxidase (POD), the hydrogen peroxide formed yields a blue purple pigment by quantitative oxidation condensation with 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Aniline (MEHA) and 4-aminoantipyrine (4-AA).

Non-esterified fatty acids (NEFA) concentration is obtained by measuring absorbance of the blue purple color.

#### Reactions



#### Physical or chemical indications of instability

The presence of precipitates in the reagents or values of control sera outside the manufacturer's acceptable range may be an indication of reagent's instability.

#### Instruments

The reagent is designed to be used on commercially available automated analyzers. Refer to the operating manual for a description of instrument operation and specifications. A validation by the user in practice at the customer's site in the form of measurements of adequate control or patient sera in sufficient number is indispensable.

#### Reagents

##### Contents and storage conditions

<b>R1 Set:</b>	R1a:	Color A	Store at 2–10 °C
	R1:	Solvent A	
<b>R2 Set:</b>	R2a:	Color B	Store at 2–10 °C
	R2:	Solvent B	

##### Ingredients

###### R1 Set:

<b>R1a: Color A</b>	<i>(when reconstituted)</i>	
	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
	Sodium azide (Color A lyophilized)	0.062 % (0.8 %)

<b>R1: Solvent A</b>	Phosphate Buffer, pH 7.0	50 mmol/l
	Sodium azide	0.05 %

###### R2 Set:

<b>R2a: Color B</b>	<i>(when reconstituted)</i>	
	ACOD	12 U/ml
	POD	14 U/ml

<b>R2: Solvent B</b>	MEHA	2.4 mmol/l
----------------------	------	------------

#### Reagent preparation

R1: Prepare R1 by mixing one bottle of Color A and Solvent A. After preparing the R1, store at 2–10 °C and use within 1 month.

R2: Prepare R2 by mixing one bottle of Color B and Solvent B. After preparing the R2, store at 2–10 °C and use within 1 month.

#### Specimen collection and preparation

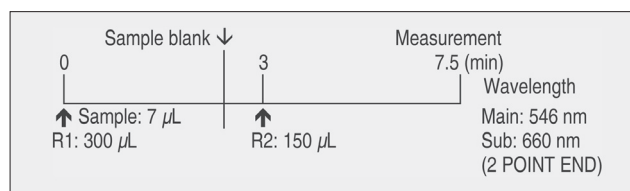
Serum can be used as specimen.

Assay samples immediately after collection, because the enzymes such as lipoprotein lipase, phospholipase etc. hydrolyze lipids and form fatty acids. Freeze sample, when a serum is stored. Stability: 2 days at 4 °C.<sup>1</sup>

*In vivo* heparin addition causes wrongly increased values. Because of stimulation of the lipoprotein lipase by heparin samples of patients under heparin treatment blood can be used for this determination only after appropriate pre-treatment.<sup>2</sup>

#### Standard procedure

Temperature: 37 °C (Hitachi® 737)



Calibrator: Wako NEFA Standard (available separately)

#### Calculation of NEFA concentration

Calculate NEFA concentration from the calibration curve which was created from absorbance of calibrator.

$$\begin{aligned} \text{Conversion factors: } &\text{mg/dL} = \text{mmol/L} \times 28.2 \\ &\text{(calculated for oleic acid, MW = 282)} \\ &\text{mmol/L (mval/L} = \text{mEq/L)} = \text{mg/dL} \times 0.035 \end{aligned}$$

#### Application to the various automatic analyzers

Input the parameters according to the instructions of instruments to perform the measurement. Instrument applications are available upon request.

#### Results

The final results are automatically calculated and printed in concentration. The results are given in mEq/L. Always use the same unit for the calibrator.

#### Expected values<sup>3</sup>

Men:	0.1–0.60 mmol/L (2.8–16.9 mg/dL)
Women:	0.1–0.45 mmol/L (2.8–12.7 mg/dL)

Since expected values are affected by age, sex, diet, geographical location and other factors, each laboratory should establish its own expected values for this procedure.

#### Performance characteristics

- (1) **Accuracy**  
When a control serum of known concentration is assayed, the assay value falls within the range of  $\pm 15\%$  of the known concentration.
- (2) **Sensitivity**
  - a) When purified water is assayed, the absorbance is not more than 0.140.
  - b) When a standard of given concentration (oleic acid 1 mEq/L) is assayed, the absorbance is 0.100–0.380.
- (3) **Precision**  
When a sample is assayed not less than 5 times in a run, CV of absorbance is not more than 1.5 %.
- (4) **Measurement range**  
0.01–4.00 mEq/l NEFA (In the case of using the standard procedure)

#### Korrelation

Specimen	Serum
Correlation coefficient	$r = 0.997$ (n = 50)
Regression equation	$y = 1.013x - 0.043$
y	Wako NEFA-HR(2) (ACS – ACOD method, mEq/l)
x	Wako NEFA C (ACS – ACOD method, mEq/l)

#### Interfering substances

- a) Bilirubin gives slightly negative effect on the assay.
- b) Ascorbic acid and hemolysis do not have significant effects on the assay.
- c) Citrate, oxalate, EDTA and sodium fluoride do not have significant influences on the assay when they are used in their usual amounts.

#### Warnings and precautions

- For *In-vitro*-diagnostic use only.
- The usage and application of this test is reserved for professional use only. Please refer to respective national and local regulations and legislation.
- Not to be used internally in humans or animals.
- Do not use the reagents described above for any purpose other than described herein. Performance cannot be guaranteed if the reagents are used in other procedures or for other purposes.
- Operate the instruments according to operator's manuals under appropriate conditions.
- Store the reagents under the specified conditions. Do not use reagents past the expiration date stated on each reagent container label.
- Do not use reagents which were frozen in error. Such reagents may give false results.
- After opening the reagents, it is recommended to use them immediately. When the opened reagents are stored, cap the bottles and keep them under the specified conditions.
- Do not use the containers and other materials in the package for any purposes other than those described herein.
- The vial is stoppered at reduced pressure. Slowly remove the stopper in order not to release the powder in the vial.
- When the reagent for NEFA is used at the same time as reagent for cholesterol and triglyceride, the cholesterol esterase and lipoprotein lipase in the reagent are adsorbed to cuvettes and may interfere the measured value of NEFA.
- Use NEFA Standard for calibration.
- This assay should not be used as the sole determinant for clinical diagnosis.
- If the reagents come in contact with the mouth, eyes or skin, wash off immediately with a large amount of water.
- Be careful not to cut yourself with the aluminum cap when remove it from the vial.
- When discarding the reagents, dispose of them according to local or national regulations. Solvent A contains 3 mg/L potassium ferrocyanide (1 mg/L as cyan).
- All the devices including reagents and reagent bottles contacted with specimen should be considered potentially infectious.
- Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive compounds. Even though the reagent contains minute quantity of sodium azide, drains should be flushed well with a large amount of water, when discarding the reagents.

#### Quality control

A quality control program is recommended for all clinical laboratories.

#### References

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).

#### Ordering information

Code No.	Product	Package
434-91795	NEFA-HR(2) R1 Set	R1a: 4 x for 50 ml R1: 4 x 50 ml
436-91995	NEFA-HR(2) R2 Set	R2a: 4 x for 25 ml R2: 4 x 25 ml
270-77000	NEFA Standard	CAL: 2 x 10 ml