

Esclusivamente per uso veterinario
Servizio clienti e assistenza tecnica +1-800-822-2947

Marzo 2007

N. parte: 500-7138, Rev. D

© 2005, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587, U.S.A.

1. Uso previsto

The VetScan® Il rotore reagente Profilo equino VetScan Plus usato con gli strumenti di chimica diagnostica di gasanalisi, immunodosaggi ed elettroliti VetScan Classic e VetScan VS2, impiega reagenti secchi e liquidi per fornire determinazioni quantitative *in vitro* di albumina (ALB), aspartato aminotransferasi (AST), azoto ureico ematico (BUN), calcio totale (CA⁺⁺), creatina chinasi (CK), creatinina (CRE), gamma glutamil transferasi (GGT), glucosio (GLU), bilirubina totale (TBIL) e anidride carbonica totale (tCO₂) in sangue intero eparinizzato, plasma eparinizzato o siero.

2. Sommario e spiegazione dei test

Il rotore reagente Profilo equino VetScan e gli strumenti di chimica diagnostica di gasanalisi, immunodosaggi ed elettroliti VetScan Classic e VetScan VS2 costituiscono un sistema diagnostico *in vitro* che coadiuva il veterinario nella diagnosi delle seguenti patologie:

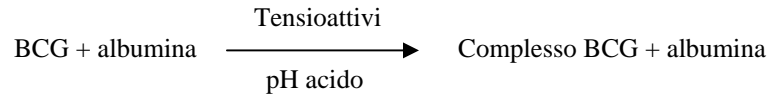
Albumina (ALB)	Malattia epatica e renale.
Aspartato aminotransferasi (AST)	Malattie epatiche, quali epatite e ittero virale; shock e danno muscolare. Usato in combinazione con CK per valutare il danno muscolare.
Azoto ureico ematico (BUN)	Malattie epatiche e renali.
Calcio (CA⁺⁺)	Malattie paratiroidee, ossee e renali croniche; tetanie.
Creatina chinasi (CK)	Danno muscolare, convulsioni, cardiopatia; ipotiroidismo; attività fisica intensa, inattività fisica e massa muscolare ridotta.
Creatinina (CRE)	Malattia renale.
Gamma glutamil transferasi (GGT)	Malattia epatica, tumori epatici primari e secondari.
Glucosio (GLU)	Diabete, iperglicemia, ipoglicemia e malattia epatica.
Bilirubina totale (TBIL)	Disturbi epatici.
Proteine totali (TP)	Disidratazione, malattia renale ed epatica, disturbi metabolici e nutrizionali.
Potassio (K⁺)	Malattia renale glomerulare o tubolare, insufficienza adrenocorticale, chetoacidosi diabetica, eccesso di potassio per endovena, sepsi, panipopituitarismo, emolisi <i>in vitro</i> , iperaldosteronismo, denutrizione, iperinsulinismo, alcalosi metabolica e perdita gastrointestinale.
Sodio (Na⁺)	Disidratazione, diabete insipido, perdita di liquidi gastrointestinali ipotonici, avvelenamento da sali, depressione selettiva della sete, perdite cutanee, ustioni, sudorazione, iperaldosteronismo, disturbi del SNC, iponatremia da diluizione, deplezione e psichica e sindrome da inappropriata secrezione di ADH
Anidride carbonica totale (tCO₂)	Alcalosi e acidosi metabolica primaria e alcalosi e acidosi respiratoria primaria.

Come per ogni test diagnostico, prima della diagnosi definitiva è opportuno considerare tutte le altre procedure di analisi, incluso lo stato clinico del paziente.

3. Principi della procedura

Albumina (ALB)

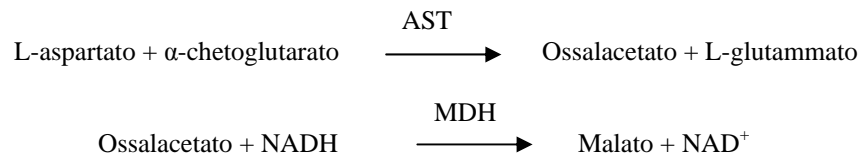
Le tecniche colorimetriche sono i metodi più frequentemente usati per misurare l'albumina. Il verde bromocresolo (BCG) è l'agente più comunemente usato per i metodi colorimetrici.¹



L'albumina legata è proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione. Questa è una reazione di endpoint che viene misurata bicromaticamente a 630 nm e 405 nm.

Aspartato aminotransferasi (AST)

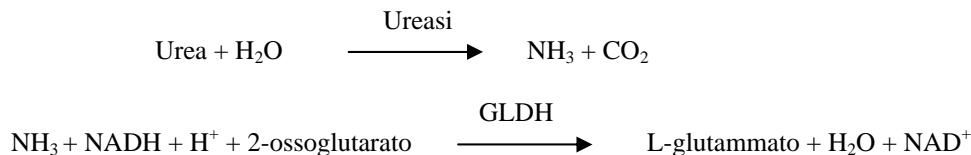
Il metodo Abaxis AST è una modificazione del metodo di riferimento IFCC.^{2,3} Questo metodo catalizza la reazione di L-aspartato e α -chetoglutarato in ossalacetato ed L-glutamato. L'ossalacetato è convertito in malato e l' NADH viene ossidato in NAD^+ dall'enzima malato deidrogenasi (MDH).



La velocità di variazione nell'assorbanza causata dalla conversione di NADH in NAD^+ è determinata bicromaticamente a 340 nm e 405 nm. Questa velocità è direttamente proporzionale alla quantità di AST presente nel campione.

Azoto ureico ematico (BUN)

Il sistema Abaxis impiega una reazione enzimatica accoppiata, in cui l'ureasi idrolizza l'urea in ammoniaca e anidride carbonica.⁴ Combinando l'ammoniaca con 2-ossoglutarato e nicotinammide adenin dinucleotide (NADH) ridotto, l'enzima glutammato deidrogenasi (GLDH) ossida l' NADH in NAD^+ .

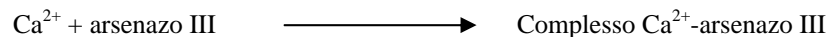


La velocità di variazione della differenza di assorbanza tra 340 nm e 405 nm è causata dalla trasformazione di NADH in NAD^+ ed è direttamente proporzionale alla quantità di urea presente nel campione.

Calcio totale (Ca^{++})

Il metodo di riferimento per il calcio è la spettroscopia ad assorbimento atomico, che è però inadatta ad analisi di routine.¹⁵ I metodi spettrofotometrici che utilizzano indicatori metallocromici a base di *o*-cresoftaleina complexone (CPC) o arsenazo III sono quelli più comunemente usati.⁶⁻⁸ L'arsenazo III presenta un'elevata affinità per il calcio e non è temperatura-dipendente come il CPC.

Il calcio presente nel campione prelevato dal paziente si lega con l'arsenazo III formando un complesso calcio-colorante.



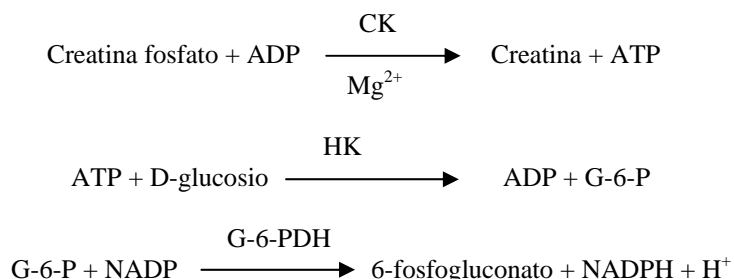
La reazione di endpoint viene controllata a 405 nm, 467 nm e 600 nm. La quantità di calcio nel campione è proporzionale all'assorbanza.

Creatina chinasi (CK)

La creatina chinasi catalizza la fosforilazione reversibile della creatina da parte dell'adenosina trifosfato (ATP). Le reazioni di fosforilazione e defosforilazione sono rispettivamente favorite da condizioni alcaline (ottimali a 9,0) e condizioni acide (ottimali a pH 6,5, a 37 °C). I primi metodi di misurazione della CK si basavano sulla "reazione *forward*" con creatina fosfato e adenosina difosfato (ADP) come prodotti.⁹⁻¹¹ La sensibilità di questi test è risultata inferiore a causa di problemi con fattori interferenti. La procedura di scelta utilizza invece una "reazione inversa" abbinata a una reazione per produrre NADPH, che è direttamente correlato ai livelli di CK.¹²⁻¹⁴

La procedura di misurazione di CK adottata da Abaxis è una variante del metodo International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).¹⁵ Le modificazioni chiave sono frazione di volume del campione, tampone e temperatura. È stata aggiunta N-acetil cisteina (NAC) per riattivare CK.¹⁶ Il magnesio è usato come cofattore sia per CK che per esochinasi. È stato aggiunto EDTA come stabilizzatore per NAC e per la rimozione di vari cationi, quali calcio e ferro, che inibiscono CK. Sono stati inoltre aggiunti P¹, P⁵-di (adenosina-5')pentafosfato e adenosina monofosfato (AMP) per inibire l'adenilato chinasi, un altro enzima eritrocitario e muscoloscheletrico che reagisce con i substrati usati per misurare CK.

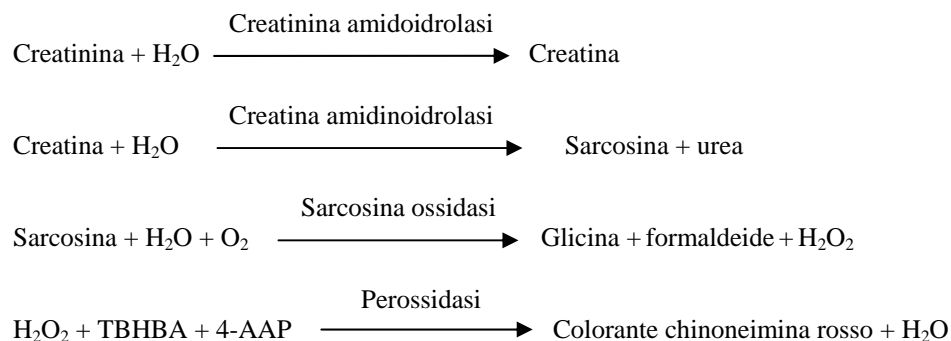
La creatina chinasi catalizza la formazione di creatina e ATP da creatina fosfato e ADP a pH 6,7. Con esochinasi (HK) come catalizzatore, l'ATP reagisce con il D-glucosio formando ADP e D-glucosio-6-fosfato (G-6-P), che a sua volta reagisce con nicotinammide adenin dinucleotide fosfato (NADP) in presenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH) per produrre G-6-P e NADPH.



La formazione di NADPH è misurata come variazione nell'assorbanza a 340 nm rispetto a 405 nm. Questa variazione di assorbanza è direttamente proporzionale all'attività della creatina chinasi nel campione.

Creatinina (CRE)

Il metodo Jaffe, originariamente introdotto nel 1886, è tuttora comunemente usato per determinare i livelli di creatinina nel sangue. L'attuale metodo di riferimento abbinava l'uso di terra di Fuller (floridina) e la tecnica di Jaffe per incrementare la specificità della reazione.^{17,18} Sono stati messi a punto metodi enzimatici che risultano più specifici per la creatinina di quanto non lo siano le diverse varianti della tecnica di Jaffe.^{19,20,21} I metodi basati sull'enzima creatinina amidoidrolasi eliminano il problema dell'interferenza dello ione ammonio che si riscontra nelle tecniche che utilizzano creatinina iminoidrolasi.²²

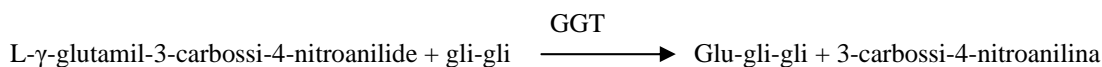


Per determinare la concentrazione di creatinina nel campione si utilizzano due cuvette. La creatina endogena viene misurata nella cuvetta in bianco, che viene sottratta dalla combinazione di creatina endogena e creatina formata dalle reazioni enzimatiche nella cuvetta del test. Una volta eliminata dai calcoli la creatina endogena, la concentrazione di creatinina è proporzionale all'intensità del colore rosso sviluppato. La reazione di endpoint è data dalla differenza di assorbanza tra 550 nm e 630 nm.

Gamma glutamil transferasi (GGT)

I primi metodi quantitativi sviluppati per misurare la gamma glutamil transferasi (GGT) comportavano una seconda reazione per formare un colorante azoico che si combinava con un cromoforo.^{23,24} La sostituzione di L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide come substrato nella reazione ha eliminato la fase di formazione del colorante.²⁵ Date le scarse solubilità e stabilità di L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, questa procedura è stata modificata al fine di usare il substrato L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide.²⁶ Il metodo GGT raccomandato dall'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) si basa sul secondo substrato, con glicilglicina come altro substrato.²⁷

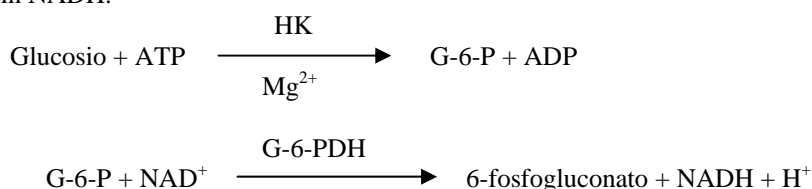
Abaxis ha modificato il metodo IFCC per la reazione a 37 °C. L'aggiunta di campione contenente gamma glutamil transferasi ai substrati L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide e glicilglicina (gli-gli) causa la formazione di L- γ -glutamyl-glicilglicina (glu-gli-gli) e 3-carbossi-4-nitroanilina.



L'assorbanza di questa reazione di velocità viene misurata a 405 nm. La produzione di 3-carbossi-4-nitroanilina è direttamente proporzionale all'attività GGT nel campione.

Glucosio (GLU)

Le prime misurazioni della concentrazione di glucosio furono effettuate con metodi basati sulla riduzione del rame (ad esempio Folin-Wu e Somogyi-Nelson).^{28, 29, 30} La mancanza di specificità delle tecniche di riduzione del rame ha portato allo sviluppo di procedure quantitative che utilizzano gli enzimi esochinasi e glucosio ossidasi. Il test del glucosio Abaxis è una variante del metodo dell'esochinasi proposto come base del metodo di riferimento per il glucosio.³¹ La reazione del glucosio con l'adenosina trifosfato (ATP), catalizzata dall'esochinasi (HK), produce glucosio-6-fosfato (G-6-P) e adenosina difosfato (ADP). La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH) catalizza la reazione di G-6-P in 6-fosfogluconato e la riduzione del nicotinammide adenin dinucleotide (NAD⁺) in NADH.



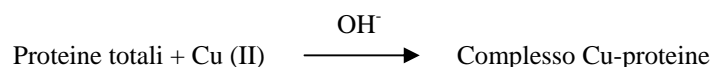
Bilirubina totale (TBIL)

I livelli di bilirubina totale sono stati generalmente misurati con test basati sull'impiego di acido solfanilico diazotato^{32, 33} o l'enzima bilirubina ossidasi.³⁴⁻³⁶ Il metodo di test della bilirubina totale usato in questo rotore, impiega una misurazione fotometrica tricromatica diretta del campione diluito per determinare la concentrazione di bilirubina totale. La lunghezza d'onda primaria usata per misurare direttamente la bilirubina totale è 467 nm. Le misurazioni aggiuntive a 340 e 405 nm sono usate per correggere l'assorbanza della bilirubina in funzione delle assorbanze da altre possibili sostanze endogene nel campione. Il conseguente valore di assorbanza a 467 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di bilirubina totale basato sulla calibrazione della bilirubina nel siero di cavallo.

Proteine totali (TP)

Il metodo delle proteine totali è una modifica della reazione del biureto, nota per la sua precisione, accuratezza e specificità,³⁷ che è stata originariamente sviluppata da Riegler e successivamente modificata da Weichselbaum, Dumas, et al. La reazione del biureto è un potenziale metodo di riferimento delle proteine totale.³⁸⁻⁴⁰

Nella reazione del biureto, la soluzione proteica è trattata con ioni rame [Cu(II)] in un terreno fortemente alcalino. Vengono aggiunti tartrato di sodio e potassio e ioduro di potassio per impedire rispettivamente la precipitazione di idrossido di rame (II) e l'autoriduzione del rame.³⁷ Gli ioni Cu(II) reagiscono con i legami peptidici tra gli atomi di ossigeno del gruppo carbonilico e di azoto del gruppo ammidico formando un complesso colorato Cu-proteine.



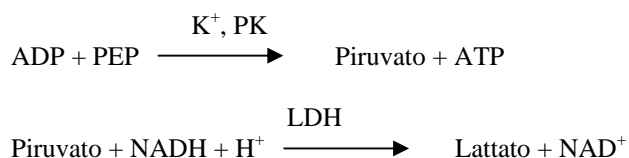
La quantità di proteine totali presenti nel campione è direttamente proporzionale all'assorbanza del complesso Cu-proteine. Il test delle proteine totali è una reazione di endpoint e l'assorbanza è data dalla differenza in assorbanza tra 550 nm e 850 nm.

Potassio (K⁺)

Sono stati sviluppati metodi spettrofotometrici che consentono di misurare la concentrazione di potassio con i normali strumenti di chimica clinica. Il metodo enzimatico basato sull'attivazione della piruvato chinasi con il potassio presenta linearità eccellente e

sensibilità trascurabile alle sostanze endogene.^{51, 52, 53} L'interferenza dagli ioni sodio e ammonio è rispettivamente minimizzata mediante aggiunta di Kryptofix e glutammino sintetasi.²⁰

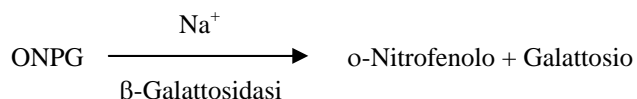
Nella reazione enzimatica accoppiata, la piruvato chinasi (PK) defosforila il fosfoenolpiruvato (PEP) formando piruvato. La lattato deidrogenasi (LDH) catalizza la trasformazione del piruvato in lattato. Al contempo, l' NADH viene ossidato in NAD^+ .



La velocità di cambiamento dell'assorbanza causata dalla trasformazione dell' NADH in NAD^+ è direttamente proporzionale alla quantità di potassio presente nel campione.

Sodio (Na^+)

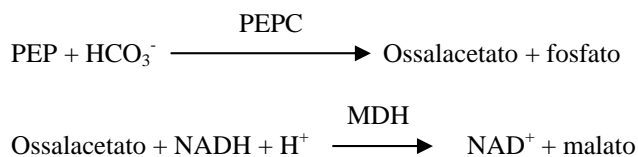
Sono stati sviluppati metodi colorimetrici ed enzimatici che consentono di misurare la concentrazione di sodio con i normali strumenti di chimica clinica.^{54, 55, 56} Nella reazione enzimatica Abaxis, la β -galattosidasi è attivata dal sodio nel campione. L'enzima attivato catalizza la reazione dell'o-nitrofenil--D-galattopiranoside (ONPG) in o-nitrofenolo e galattosio.



Anidride carbonica totale (tCO_2)

L'anidride carbonica totale nel siero o nel plasma è presente sotto forma di anidride carbonica disciolta, derivati carbaminici delle proteine, ioni bicarbonato e carbonato e acido carbonico. L'anidride carbonica totale può essere misurata mediante indicatore di pH, elettrodo a CO_2 e metodi enzimatici spettrofotometrici, tutti con risultati accurati e precisi.^{57, 58} Il metodo enzimatico è ideale per l'uso con un analizzatore chimico per analisi del sangue di routine, in quanto non comporta alcuna complessità.

Nel metodo enzimatico, il campione viene innanzitutto alcalinizzato per convertire tutte le forme di anidride carbonica (CO_2) in bicarbonato (HCO_3^-). Il fosfoenolpiruvato (PEP) e l' HCO_3^- reagiscono quindi formando ossalacetato e fosfato in presenza di fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPC). La malato deidrogenasi (MDH) catalizza la reazione di ossalacetato e nicotinamide adenin dinucleotide ridotta (NADH) in NAD^+ e malato. La velocità di variazione nell'assorbanza dovuta alla conversione dell' NADH in NAD^+ è direttamente proporzionale alla quantità di tCO_2 nel campione.



4. Principio del test

Per i principi e i limiti della procedura, vedere il manuale d'uso dell'analizzatore chimico VetScan e/o il manuale d'uso di VetScan VS2.

5. Descrizione dei reagenti

Ogni rotore reagente Profilo equino VetScan contiene microsfele secche di reagente specifico per il test. Ogni rotore reagente comprende un reagente secco per campione bianco (costituito da tampone, tensioattivi, eccipienti e conservanti) utilizzato per calcolare le concentrazioni di albumina, aspartato aminotransferasi, azoto ureico ematico, calcio, creatina chinasi, creatinina, gamma glutil transferasi, glucosio, bilirubina totale e proteine totali. Il rotore comprende campioni bianchi dedicati per calcolare la concentrazione di creatinina, bilirubina totale e i livelli di proteine totali. Ciascun rotore reagente contiene anche un diluente composto da tensioattivi e conservanti.

Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico veterinario *in vitro*
- Il contenitore del diluente nel rotore reagente si apre automaticamente alla chiusura del cassetto dell'analizzatore. Non è possibile riutilizzare un rotore con contenitore del diluente aperto. Prima di chiudere il cassetto, assicurarsi che il campione o il controllo sia stato inserito nel rotore.
- Le microsferi di reagente possono contenere acidi o sostanze caustiche. Se rispetta le procedure raccomandate, l'operatore non viene a contatto con le microsferi di reagente. In caso di manipolazione delle microsferi (es. pulizia in seguito a caduta e incrinatura di un rotore reagente), evitare ingestione, contatto cutaneo e inalazione.
- Alcune microsferi di reagente contengono sodio azide che può reagire con le tubature di piombo e rame formando azoturi altamente esplosivi. Se si rispettano le procedure raccomandate, i reagenti non vengono a contatto con le tubature in piombo e rame. Tuttavia, qualora i reagenti venissero a contatto con tali tubature, sciacquare con abbondanti quantità d'acqua per evitare l'accumulo di azide.

Istruzioni per la manipolazione del reagente

Allorché prelevati dal frigorifero, i rotori reagente possono essere utilizzati direttamente, senza essere riscaldati. Aprire il sacchetto sigillato di foglio d'alluminio ed estrarre il rotore, prestando attenzione a non toccare l'anello con il codice a barre situato sulla parte superiore del rotore stesso. Per l'uso, seguire le istruzioni fornite nel manuale d'uso VetScan. Gettare il rotore se non lo si utilizza entro 20 minuti dall'apertura del sacchetto. I rotori in sacchetti aperti non possono essere riposti in frigorifero per essere utilizzati successivamente.

Conservazione

Conservare i rotori reagente nei sacchetti sigillati a 2–8 °C (36-46 °F). Non esporre i rotori, aperti o ancora sigillati, a luce solare diretta o temperature superiori a 32 °C (90 °F). Non lasciare i rotori sigillati nei sacchetti di foglio d'alluminio a temperatura ambiente per oltre 48 ore prima dell'uso. Aprire il sacchetto ed estrarre il rotore soltanto prima dell'uso.

Indicazioni di instabilità o deterioramento del rotore reagente

- Tutti i reagenti contenuti nell'apposito rotore, se conservati nel modo sopra descritto, sono stabili sino alla data di scadenza stampata sul sacchetto del rotore. **Non** utilizzare un rotore dopo la data di scadenza. La data di scadenza è codificata anche nel codice a barre stampato sull'apposito anello. Se i reagenti sono scaduti, sul display dell'analizzatore chimico VetScan viene visualizzato un messaggio di errore.
- In caso di sacchetto strappato o altrimenti danneggiato, l'umidità può penetrare nel disco non utilizzato e alterare il comportamento del reagente. Non utilizzare rotori prelevati da sacchetti danneggiati.

6. Strumento

Per informazioni complete sull'uso dell'analizzatore, vedere il manuale d'uso VetScan.

7. Raccolta e preparazione dei campioni

La quantità minima di campione è di ~100 µL di sangue intero eparinizzato, plasma eparinizzato, siero o controllo. La camera del campione su rotore reagente può contenere fino a 120 µL di campione.

- Il campione raccolto in una micropipetta eparinizzata deve essere dispensato nel rotore reagente **subito** dopo la raccolta.
- Per campioni di sangue intero o di plasma, utilizzare solo provette per prelievo sottovuoto con litio eparina (tappo verde). Per campioni di siero, utilizzare provette per prelievo sottovuoto senza additivi (tappo rosso) o provette per separazione del siero (tappo rosso o rosso/nero).
- I campioni di sangue intero prelevati mediante venipuntura devono essere omogenei prima di essere trasferiti nel rotore reagente. Capovolgere delicatamente le provette di prelievo alcune volte prima di trasferire il campione. **Non** agitare la provetta di prelievo in quanto ciò potrebbe provocare emolisi.
- Iniziare il test entro 10 minuti dal trasferimento del campione nel rotore reagente.
- Analizzare i campioni di sangue intero prelevati mediante venipuntura entro 60 minuti dalla raccolta; qualora ciò non fosse possibile, separare il campione e trasferirlo in una provetta pulita.⁴¹ Analizzare il campione di siero o plasma separato entro 5 ore dalla centrifugazione. Qualora ciò non fosse possibile, refrigerare il campione in una provetta tappata a 2-8 °C (36-46 °F) per non più di 48 ore. Un campione di plasma o siero può essere conservato a -10 °C (14 °F) per un massimo di 5 settimane in un congelatore privo di ciclo di autoscongelo.
- Le concentrazioni di **glucosio** diminuiscono di circa 5-12 mg/dL in 1 ora in campioni non centrifugati conservati a temperatura ambiente.⁴²
- La refrigerazione di campioni di sangue intero può causare variazioni significative nelle concentrazioni di **glucosio** e **creatinina**.⁴³

- I risultati della **bilirubina totale** possono essere negativamente influenzati dalla fotodegradazione.⁴⁴ Conservare i campioni di sangue intero al buio per non più di 60 minuti. Se il campione non può essere analizzato entro tale periodo, separarlo in plasma o siero e conservarlo in una provetta tappata, al buio, a basse temperature.⁴⁵
- La concentrazione di anidride carbonica totale viene determinata con la massima accuratezza se si effettua l'analisi subito dopo l'apertura della provetta e quanto prima possibile dopo il prelievo e il trattamento del sangue nella provetta non aperta. L'aria ambiente contiene una quantità di anidride carbonica decisamente inferiore rispetto al plasma e il conseguente rilascio di anidride carbonica disciolta in forma gassosa dal campione nell'aria farà diminuire il valore dell'anidride carbonica fino a 6 mmol/L nell'arco di un'ora.⁵⁹

Sostanze interferenti conosciute

- L'unico anticoagulante raccomandato per l'uso con l'analizzatore chimico VetScan è la litio eparina. Abaxis ha condotto studi che dimostrano come EDTA, fluoruro, ossalato e qualsiasi anticoagulante contenente ioni ammonio interferiscano con almeno una delle sostanze chimiche contenute nel rotore reagente Profilo equino VetScan.
- Gli interferenti fisici (emolisi, ittero e lipemia) possono causare variazioni nelle concentrazioni refertate di alcuni analiti. Gli indici del campione sono stampati nella parte inferiore di ogni scheda dei risultati per informare l'operatore dei livelli di agenti interferenti presenti in ciascun campione. L'analizzatore chimico VetScan elimina gli eventuali risultati falsati da un'interferenza > 10% dovuta a emolisi, lipemia e ittero. In tal caso, sulla scheda dei risultati anziché i risultati verrà rispettivamente stampata la dicitura "HEM" (emolisi), "LIP" (lipemia) o "ICT" (ittero).
- La bilirubina può interferire con la perossidasi usata nella reazione della **creatinina**.⁴⁶ I risultati della creatinina risultano inferiori quando i livelli di bilirubina sono > 10 mg/dL.
- Le concentrazioni di **glucosio** sono influenzate dall'intervallo di tempo trascorso dall'ultimo pasto del paziente e dal tipo di campione prelevato dal paziente. Per interpretare in modo corretto i risultati relativi al glucosio, prelevare i campioni da pazienti a digiuno da almeno 12 ore.⁴⁷
- Quando si analizzano campioni con un indice lipemico 3 +, è possibile osservare interferenze nel test delle proteine totali.⁴⁵ I campioni con una concentrazione di trigliceridi >400 mg/dL possono presentare un livello aumentato di proteine totali. L'analizzatore chimico VetScan elimina gli eventuali risultati falsati da un'interferenza > 10% dovuta a lipemia. In tal caso, sulla scheda dei risultati anziché il risultato viene stampata la dicitura "LIP" (lipemia).
- La creatina chinasi viene inattivata sia da luce solare intensa che dall'aumento del pH del campione a causa di perdita di anidride carbonica; conservare pertanto i campioni al buio in provette accuratamente tappate.⁴⁸
- Il dosaggio del potassio nel sistema VetScan è un test combinato di piruvato chinasi (PK) / lattato deidrogenasi (LDH). In caso di trauma muscolare estremo o livelli molto elevati di creatina chinasi (CK), il sistema VetScan può pertanto recuperare un valore di potassio (K+) falsamente elevato. In tal caso, il recupero di un livello inteso di potassio elevato deve essere confermato utilizzando una metodologia diversa.

8. Procedura

Materiali forniti

- Un rotore reagente Profilo equino VetScan Plus, numero parte: 500 – 1043 (una confezione di 12 rotori, numero parte: 500-0043-12)

Materiali necessari ma non forniti

- Analizzatore chimico VetScan

Parametri del test

Il sistema VetScan funziona a temperature ambiente comprese tra 15 °C e 32 °C (59-90 °F). Il tempo di analisi per ogni rotore reagente Profilo equino VetScan è inferiore a 14 minuti. Durante l'intervallo di misurazione, l'analizzatore mantiene il rotore reagente a una temperatura di 37 °C (98,6 °F).

Procedura del test

Le procedure complete per la raccolta dei campioni e le istruzioni operative dettagliate sono riportate nel manuale d'uso VetScan.

Calibrazione

L'analizzatore chimico VetScan è calibrato dal fabbricante prima della spedizione. Il codice a barre stampato sull'apposito anello fornisce i dati di calibrazione specifici per i rotori. Vedere il manuale d'uso VetScan.

Controllo di qualità

Per verificare l'accuratezza dell'analizzatore chimico VetScan, è possibile analizzare periodicamente i controlli appositi. Abaxis raccomanda di analizzare un controllo a base di siero normalmente in commercio. Analizzare i controlli sul rotore reagente seguendo la stessa procedura adottata per i campioni dei pazienti. Per l'analisi dei controlli, vedere il manuale d'uso VetScan.

9. Risultati

L'analizzatore chimico VetScan calcola e stampa automaticamente le concentrazioni di analiti nel campione. I dettagli dei calcoli delle reazioni di endpoint e velocità sono riportati nel manuale d'uso VetScan.

10. Limiti della procedura

I limiti generici della procedura sono descritti nel manuale d'uso dei sistemi VetScan.

- **I campioni che per un particolare test fornissero risultati superiori al range del dosaggio, devono essere analizzati con un altro metodo di test approvato oppure inviati a un laboratorio di riferimento.**
- I campioni con ematocriti superiori al 60% del volume dei globuli rossi concentrati possono dare luogo a risultati imprecisi. I campioni con ematocriti elevati possono essere refertati come emolizzati. Questi campioni possono essere centrifugati e il plasma quindi rianalizzato in un nuovo rotore reagente.

Avvertenza: Test su larga scala dell'analizzatore chimico VetScan hanno dimostrato che in rarissimi casi il campione dispensato nel rotore reagente non riesce a fluire omogeneamente nell'apposita camera. A causa del flusso irregolare, è possibile che venga analizzata una quantità di campione inadeguata e che vari risultati non rientrino nei range di riferimento definiti. Il campione può essere rianalizzato usando un rotore reagente nuovo.

11. Valori attesi

I seguenti intervalli normali sono forniti a titolo puramente indicativo. Gli intervalli di riferimento più attendibili sono quelli stabiliti per la propria popolazione di pazienti. I risultati dei test devono essere interpretati in associazione al quadro clinico del paziente. Per personalizzare range normali specifici sul proprio analizzatore chimico VetScan per la serie "Other" (Altro), consultare il manuale d'uso VetScan alla voce "Menu Key functions" (funzioni dei tasti di menu).

Tabella 1: Intervalli di riferimento

	Equini	Cani	Gatti
ALB	2,2 – 3,7 g/dL (22 – 37 g/L)	2,5 – 4,4 g/dL (25 – 44 g/L)	2,2 – 4,4 g/dL (22 – 44 g/L)
AST	175 – 340 U/L	14 – 45 U/L	12 – 43 U/L
BUN	7 – 25 mg/dL (2,5 – 8,9 mmol/L)	7 – 25 mg/dL (2,5 – 8,9 mmol/L)	10 – 30 mg/dL (3,6 – 10,7 mmol/L)
CA⁺⁺	11,5 – 14,2 mg/dL (2,9 – 3,6 mmol/L)	8,6 – 11,8 mg/dL (2,2 – 3,0 mmol/L)	8,0 – 11,8 mg/dL (2,0 – 3,0 mmol/L)
CK	120 – 470 U/L	20 – 200 U/L	50 – 450 U/L
CRE	0,6 – 2,2 mg/dL (0,53 – 194 µmol/L)	0,3 – 1,4 mg/dL (27 – 124 µmol/L)	0,3 – 2,1 mg/dL (27 – 186 µmol/L)
GGT	5 – 24 U/L	0 – 7 U/L	0 – 2 U/L
GLU	65 – 110 mg/dL (3,6 – 6,1 mmol/L)	60 – 110 mg/dL (3,3 – 6,1 mmol/L)	70 – 150 mg/dL (3,9 – 8,3 mmol/L)
TBIL	0,5 – 2,3 mg/dL (9 – 39 µmol/L)	0,1 – 0,6 mg/dL (2 – 10 µmol/L)	0,1 – 0,6 mg/dL (2 – 10 µmol/L)
TP	5,7 – 8,0 g/dL (57 – 80 g/L)	5,4 – 8,2 g/dL (54 – 82 g/L)	5,4 – 8,2 g/dL (54 – 82 g/L)
Potassio (K⁺)	3,7 – 5,8 mmol/L	3,7 – 5,8 mmol/L	2,5 – 5,2 mmol/L
Sodio (Na⁺)	138 – 160 mmol/L	142 – 164 mmol/L	126 – 146 mmol/L
Anidride carbonica totale (tCO₂)	12 – 27 mmol/L	15 – 24 mmol/L	20 – 33 mmol/L

12. Caratteristiche prestazionali (linearità)

La determinazione chimica per ciascun analita è lineare per il range dinamico sottoelencato se il sistema VetScan è utilizzato seguendo la procedura raccomandata (cfr. il manuale d'uso VetScan). La tabella dei range dinamici di seguito fornita, rappresenta lo spettro rilevabile dal sistema VetScan. **Gli intervalli seguenti non rappresentano i range normali.**

Analita	Range dinamici Unità comuni	Unità SI
ALB	1 – 6,5 g/dL	10 – 65 g/L
AST	5 – 2000 U/L	5 – 2000 U/L
BUN	2 – 180mg/dL	0,7 – 64,3 mmol urea/L
CA++	4 – 16 mg/dL	1,0 – 4,0 mmol/L
CRE	0,2 – 20 mg/dL	18 – 1768µmol/L
CK	5 – 14.000 U/L	5 – 14.000 U/L
GGT	5 – 3000 U/L	5 – 3000 U/L
GLU	10 – 700 mg/dL	0,6 – 39mg/dL
TBIL	0,1 – 30 mg/dL	1,7 – 513 µmol/L
TP	2 – 14 g/dL	20 – 140 g/L
K+	1,5 – 8,5 mmol/L	1,5 – 8,5 mmol/L
Na+	110 – 170 mmol/L	110 – 170 mmol/L
TCO2	5 – 40 mmol/L	5 – 40 mmol/L

Precisione

Studi di precisione sono stati effettuati seguendo le linee guida NCCLS EP5-A⁴⁹ con modifiche basate su NCCLS EP18-P⁵⁰ per i dispositivi a utilizzo unitario. I risultati di precisione intra-sessione e totale sono stati determinati testando controlli bi-livello.

Tabella 3: Precisione

Analita	Dimensioni del campione	Intra-sessione	Totale
Albumina-BCG (g/dL)	n=80		
<u>Controllo 1</u>			
Media		3,9	3,9
SD		0,13	0,14
%CV		3,3	3,6
<u>Controllo 2</u>			
Media		2,3	2,3
SD		0,09	0,10
%CV		3,9	4,3
Aspartato aminotransferasi (U/L)	n=80		
<u>Controllo 1</u>			
Media		47	47
SD		0,98	0,92
%CV		2,1	2,0
<u>Controllo 2</u>			
Media		145	145
SD		1,83	1,70
%CV		1,3	1,2

Tabella 3: Precisione (segue)

Analita	Dimensioni del campione	Intra-sessione	Totale
Azoto ureico ematico (mg/dL) n = 120			
<u>Controllo 1</u>			
Media		19	19
SD		0,35	0,40
%CV		1,8	2,1
<u>Controllo 2</u>			
Media		65	65
SD		1,06	1,18
%CV		1,6	1,8
Calcio (mg/dL) n = 80			
<u>Controllo 1</u>			
Media		8,6	8,6
SD		0,21	0,25
%CV		2,4	2,9
<u>Controllo 2</u>			
Media		11,8	11,8
SD		0,39	0,40
%CV		3,3	3,4
Creatinina (mg/dL) n = 80			
<u>Controllo 1</u>			
Media		1,1	1,1
SD		0,14	0,14
%CV		12,7	12,7
<u>Controllo 2</u>			
Media		5,2	5,2
SD		0,23	0,27
%CV		4,4	5,2
Creatina chinasi (U/L) n = 120			
<u>Controllo 1</u>			
Media		105	105
SD		2,89	3,74
%CV		2,8	3,6
<u>Controllo 2</u>			
Media		469	469
SD		12,23	28,32
%CV		2,6	6,0
Glucosio (mg/dL) n = 80			
<u>Controllo 1</u>			
Media		66	66
SD		0,76	1,03
%CV		1,2	1,6
<u>Controllo 2</u>			
Media		278	278
SD		2,47	3,84
%CV		0,9	1,4
Bilirubina totale (mg/dL) n = 80			
<u>Controllo 1</u>			
Media		0,8	0,8
SD		0,06	0,07
%CV		7,5	8,8

Tabella 3: Precisione (segue)

Analita	Dimensioni del campione	Intra-sessione	Totale
<u>Controllo 2</u>			
Media		5,2	5,2
SD		0,09	0,15
%CV		1,7	2,9
Proteine totali (g/dL)	n = 80		
<u>Controllo 1</u>			
Media		6,8	6,8
SD		0,05	0,08
%CV		0,7	1,2
<u>Controllo 2</u>			
Media		4,7	4,7
SD		0,09	0,09
%CV		1,9	1,9
Potassio (mmol/L)	n = 80		
<u>Controllo 1</u>			
Media		6,7	6,7
SD		0,26	0,26
%CV		3,9	3,9
<u>Controllo 2</u>			
Media		4,3	4,3
SD		0,22	0,22
%CV		5,1	5,1
Sodio (mmol/L)	n = 80		
<u>Controllo 1</u>			
Media		148	148
SD		5,1	5,1
%CV		3,4	3,4
<u>Controllo 2</u>			
Media		118	118
SD		3,2	3,2
%CV		2,7	2,7
Anidride carbonica totale (mmol/L)	n=80		
<u>Controllo 1</u>			
Media		19	19
SD		1,39	1,39
%CV		7,3	7,3
<u>Controllo 2</u>			
Media		9	9
SD		0,60	0,60
%CV		6,8	6,8

Correlazione

Studi sul campo sono stati condotti presso una clinica veterinaria universitaria. I campioni di siero sono analizzati con l'analizzatore chimico VetScan e un metodo comparativo. La Tabella 4 riporta i dati di correlazione rappresentativi.

Tabella 4: Correlazione tra l'analizzatore chimico VetScan e metodiche comparative

	Tipo di campione	Coefficiente di correlazione	Pendenza	Intercetta	N	Range campione
Albumina (g/dL)	Equini	0,89	0,99	-0,6	7 – 101	1,2 – 3,2
	Cani	0,96	0,99	0,1	22 – 180	1,3 – 4,6
	Gatti	0,75	1,02	0	21 – 55	2,1 – 4,8
Aspartato aminotransferasi (U/L)	Equini	1,00	0,94	16	7 – 101	107 – 1787
	Cani	1,00	1,02	1	22 – 180	18 – 176
	Gatti	1,00	1,03	1	21 – 55	18 – 125
Azoto ureico ematico (mg/dL)	Equini	1,00	0,95	-1	7 – 101	3 – 64
	Cani	1,00	0,98	-2	22 – 180	4 – 117
	Gatti	1,00	1,07	-5	21 – 55	14 – 165
Calcio (mg/dL)	Equini	0,94	1,18	-0,8	7 – 101	7,2 – 15,1
	Cani	0,84	1,24	-1,9	22 – 180	7,3 – 13,0
	Gatti	0,77	1,24	-2,1	21 – 55	6,3 – 12,4
Creatina chinasi (mg/dL)	Equini	1,00	0,97	-2	7 – 101	69 – 14000
	Cani	*	*	*	*	*
	Gatti	*	*	*	*	*
Creatinina (mg/dL)	Equini	0,95	1,00	-0,4	7 – 101	0,3 – 6,2
	Cani	0,99	1,00	0,0	22 – 180	0,6 – 10,6
	Gatti	1,00	1,01	-0,1	21 – 55	0,3 – 13,6
Gamma glutamil transferasi (U/L)	Equini	0,99	1,11	0	7 – 101	5 – 317
	Cani	1,00	0,96	2	22 – 180	5 – 65
	Gatti	*	*	*	*	*
Glucosio (mg/dL)	Equini	0,97	0,94	16	7 – 101	36 – 353
	Cani	0,96	1,01	-6	22 – 180	28 – 348
	Gatti	1,00	0,97	3	21 – 55	52 – 607
Bilirubina totale (mg/dL)	Equini	1,00	0,90	0,1	7 – 10	0,6 – 26,1
	Cani	0,87	0,84	0,1	122 – 180	0,1 – 3,2
	Gatti	1,00	0,92	-0,3	21 – 55	0,4 – 15,0
Proteine totali (g/dL)	Equini	0,99	0,97	0,3	7 – 101	3,0 – 9,5
	Cani	0,98	1,03	0,1	22 – 180	2,6 – 10,7
	Gatti	0,97	0,96	0,4	21 – 55	4,8 – 8,5
Potassio (mmol/L)	Equini	0,84	0,97	0,1	7 – 101	1,8 – 4,6
	Cani	0,96	0,92	0,4	22 – 180	3,2 – 6,9
	Gatti	0,91	0,92	0,5	21 – 55	2,7 – 5,3
Sodio (mmol/L)	Equini	0,86	1,00	-0,01	7 – 101	110 – 166 1
	Cani	0,89	0,97	4,8	22 – 180	18 – 183
	Gatti	0,86	1,08	-12,2	21 – 55	122 – 166
Anidride carbonica totale (mmol/L)	Equini	0,97	0,93	2,1	7 – 101	9 – 39
	Cani	0,81	0,86	3,5	22 – 180	6 – 23
	Gatti	0,93	0,90	2,4	21 – 55	7 – 31

* Non disponibile

13. Bibliografia

1. Webster D, Bignell AHC, Atwood EC. An assessment on the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta* 1974; 53: 101-108.
2. Bergmeyer HU, et al. Provisional recommendations on IFCC methods of catalytic concentrations of enzymes, Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chem* 1977; 23: 887-99.
3. Bergmeyer HU, et al. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chem* 1978; 24: 720-1.
4. Sampson EJ, et al. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem* 1980; 26: 816-826.
5. Cali JP, et al. A reference method for the determination of total calcium in serum. *In: Cooper GR, ed., Selected Methods of Clinical Chemistry*, Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry; 1977; Vol 8: 3-8.
6. Kessler G, Wolfman M. An Automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus. *Clin Chem* 1964; 10: 686-703.
7. Michaylova V, Ilkova P. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Anal Chim Acta* 1971; 53: 194-8.
8. Scarpa A, et al. Metallochromic indicators of ionized calcium. *Ann NY Acad Sci* 1978; 307: 86-112
9. Kuby SA, Noda L, Lardy HA, Adenosinetriphosphate-Creatine Transphosphorylase. *J. Biol Chem* 1954; 209: 191 - 201.
10. Tanzer MI, Gilvarg C, Creatine and creatine kinase measurement. *J Biol Chem* 1959; 01 - 3204.
11. Nuttall FQ, Wedin DS, Simple rapid colorimetric method for determination of creatine kinase activity. *J Lab Clin Med* 1966; 24 - 332.
12. Oliver IT, A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem* 1955; J 61: 116 - 122.
13. Rosalki SB, An improved procedure or serum creatine phosphokinase determination, *J Lab Clin Med* 1967; 69: 696 - 705.
14. Szasz G, Gruber W, Bernt E, Creatine kinase in serum: I. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976; 22: 650 - 656.
15. Expert panel on enzymes, committee of standards (IFCC). Approval recommendations of IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes, Part 1. General considerations. *Clin Chim Acta, IFCC sections* 1979; 98: 163 - 174.
16. Committee on enzymes of the Scandinavian society for clinical chemistry and clinical physiology. Recommended method for the determination of creatine kinase in blood. *Scand J. Clin Lab Invest* 1976; 36: 711-723.
17. Knoll VE, et al. Spezifische kreatininbestimmung im serum. *Z Klin Chemi Clin Biochem.* 1970; 8:582-587.
18. Haeckel R, et al. Simplified determinations of the "true" creatinine concentration in serum and urine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 385-394.
19. Moss GA, Bondar RJL, Buzzelli DM, Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine. *Clin Chem* 1975; 21:1422-1426.
20. Jaynes PK, Feld RD, Johnson GF. An enzymatic, reaction-rate assay for serum creatinine with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1982; 28: 114-117.
21. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Enzymatic creatinine assay: A new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 1983; 29: 1494-1496.
22. Whelton A, et al. Nitrogen Metabolites and Renal Function. *In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1999;1513-1575.
23. Ball EG, Revel JP, Cooper O. The quantitative measurement of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J Biol Chem* 1956; 221: 895-908.
24. Goldbarg JA, et al. The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys* . 1960; 91: 61-70.
25. Orłowski M and Meister A. 1. γ -glutamyl-*p*-nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of k-and d- γ -glutamyltranspeptidase activities. *Biochem Biophys Acta* 1963; 73: 679-681.
26. Persijn JP, can der Slik W. A new method for the determination of γ -glutamyl- transferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1976; 14: 421-427.
27. Shaw LM et al. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4 IFCC method for γ -glutamyl-transferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 633-646.
28. Somogyi M. A reagent for the copper-idiometric determination of very small amounts of sugar. *J Biol Chem* 1937; 117: 771-776.
29. Nelson N. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol* 1944; 153: 375-380.
30. Kaplan LA. Glucose. *In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation*, 2nd ed St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1989; 850-856.
31. Overfield CV, Savory J, Heintges MG. Glycosis: A re-evaluation of the effect on blood glucose. *Clin Chim Acta.* 1972; 39: 35-40
32. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937;119: 481-90.
33. Meites S. Bilirubin, directing reacting and total, modified Mally-Evelyn method. *In: Faulkner WR, Meites S, eds. Selected Methods of Clinical Chemistry*, Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry; 1982; 9:119-24.

34. Murao S and Tanaka N. A new enzyme "bilirubin oxidase" produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1. *Agric Biol Chem* 1981; 45: 2383-4.
35. Osaki S and Anderson S. Enzymatic determination of bilirubin. *Clin Chem* 1982; 30: 971. (Abstract)
36. Perry B, et al. Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase. *Clin Chem* 1986; 32: 329-32.
37. Koller A, Kaplan LA. Total serum protein. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds., *Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation*, 2nd ed. St Louis: The C.V. Mosby Company; 1989:1057-60.
38. Reigler E. Eine kolorimetrische bestimmungsmethods des eiweisses. *Z Anal Chem* 1914; 53: 242-5.
39. Weichselbaum TE. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood, serum, and plasma. *Am J Clin Path* 1946;16: 40-9.
40. Doumas BT, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clin Chem* 1981; 27:1642-50.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Procedures for handling and processing of blood specimens; tentative standard. NCCLS document H18-A2. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
42. Overfield CV, Savory J, Heintges MG. Glycosis: A re-evaluation of the effect on blood glucose. *Clin Chim Acta* 1972; 39:35-40.
43. Rehak NN, Chiang BT. Storage of whole blood: Effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. *Clin Chem* 1988;34: 2111-14.
44. Sherwin JE, Obernolte R. Bilirubin. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*, 2nd ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1989; 1009-1015.
45. Henry RJ, Canon DC and Winkelman. *Clinical chemistry principles and technics*, 2nd ed. New York: Harper and Row; 1974; 417-21; 127-8.
46. Witte DL, Brown LF, Williams RL. Effects of bilirubin on detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase. *Clin Chem* 1978; 24:1778-82.
47. Melnik J, Potter JL. Variance in capillary and venous glucose levels during glucose tolerance test. *Am J Med Tech* 1982; 48: 543-5.
48. Moss DW, Henderson AR. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders Company. 1994; 804.
49. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; approved guideline NCCLS Document EP5-A. Wayne, PA: NCCLS, 1999
50. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality management for unit-use testing; proposed guideline. NCCLS Document EP18-P. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
51. Van Pelt J. Enzymatic determination of sodium, potassium and chloride in serum compared with determination by flame photometry, coulometry and ion selective electrodes. *Clin Chem* 1994; 40: 846-847.
52. Hubl W, et al. Enzymatic determination of sodium, potassium and chloride in abnormal (hemolyzed, icteric, lipemic, paraproteinemic, or uremic) serum samples compared with indirect determination with ion selective electrodes. *Clin Chem* 1994; 40: 1528-1531.
53. Helgerson RC, et al. Host-guest Complexation. 50. Potassium and sodium ion-selective chromogenic ionophores. *J Amer Chem Soc* 1989; 111: 6339-6350.
54. Kumar A, et al. Chromogenic ionophere-based methods for spectrophotometric assay of sodium and potassium in serum and plasma. *Clin Chem* 1988; 34: 1709-1712.
55. Berry MN, et al. Enzymatic determination of sodium in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 2295-2298.
56. Malloy HT and Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937; 119: 481-490.
57. Korzun WJ, Miller WG. Carbon Dioxide. In: *Clinical chemistry theory, analysis and correlation*, 2nd ed. Kaplan LA, Pesce AJ, eds. St. Louis: The CV Mosby Company. 1989: 869-872.
58. Koller A, Kaplan LA. Total serum protein. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*, 2nd ed. Kaplan LA, Pesce AJ, eds. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1989: 1057-1060.
59. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline. NCCLS Document EP7-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.