

Servizio clienti e assistenza tecnica: 1 800-822-2947

Esenzione da norme CLIA: Usare solo sangue intero in litio eparina

Complessità moderata: Usare sangue intero in litio eparina plasma in litio eparina o siero

Aprile 2008

PN: 400-7144, Rev. J

© 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587

1. Destinazione d'uso

Il disco reagente per pannello lipidico Piccolo®, da utilizzarsi con l'analizzatore chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress™, è progettato per l'accertamento *in vitro* delle quantità di colesterolo totale (CHOL), colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e trigliceridi (TRIG) nel contesto di un laboratorio clinico. In base a tali determinazioni, l'analizzatore calcola il colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL), il colesterolo delle lipoproteine a bassissima densità (VLDL), e il rapporto tra colesterolo totale e colesterolo lipoproteico ad alta densità (TC/H).

Questo test è esentato dai requisiti imposti dalla Legge per il miglioramento dei laboratori clinici (Clinical Laboratory Improvement Act, CLIA) del 1988. Qualora un laboratorio modifichi le istruzioni per l'esecuzione delle analisi cliniche, il test dovrà essere considerato di elevata complessità e quindi soggetto ai requisiti CLIA. I laboratori esentati sono autorizzati ad eseguire test solo su sangue intero con eparina di litio. Per l'impiego in laboratori di media complessità è possibile utilizzare sangue intero o plasma con eparina di litio o siero.

Per eseguire i test in deroga ai requisiti CLIA il laboratorio deve essere in possesso del certificato di esenzione dai requisiti stessi, che deve essere richiesto presso i centri servizi per l'assistenza sanitaria (Centers for Medicare & Medicaid Services, CMS). Si prega di rivolgersi al servizio assistenza tecnica Abaxis al numero (800) 822 - 2947 per assistenza nell'ottenimento del certificato.

2. Sintesi e spiegazione degli esami clinici

Rilevanza clinica

La misurazione dei lipidi e delle lipoproteine contenuti nel siero è utile per caratterizzare il rischio per l'individuo di sviluppare malattie cardiovascolari (CVD) e per il monitoraggio degli interventi terapeutici.¹ Il programma nazionale per l'educazione sul colesterolo (National Cholesterol Education Program^{2,3,4}) ha fornito linee guida basate sul parere della maggior parte degli specialisti per la misurazione e i livelli limite da applicare per l'interpretazione.

I lipidi in circolo sono trasportati da lipoproteine. La frazione LDL, principale responsabile lipoproteico dello sviluppo di aterosclerosi, e la cui terapia è stata definitivamente dimostrata efficace, trasporta la maggior parte del colesterolo in circolo nel sangue. Da molti anni si misura il colesterolo totale presente nel siero per determinare la quantità totale di lipoproteine, quale modalità di pratico utilizzo per l'accertamento del rischio di CVD. Tuttavia, parte del colesterolo è trasportato da particelle di HDL, anti-aterogene o inversamente associate al rischio di sviluppo di CVD. Pertanto, la quantificazione delle principali proteine di trasporto del colesterolo, LDL e HDL, consente una valutazione più accurata del rischio complessivo.

I trigliceridi, principale carburante per l'organismo, vengono trasportati nel flusso sanguigno su lipoproteine di grandi dimensioni chiamate chilomicroni (CM). Anche le particelle VLDL trasportano trigliceridi, prodotti soprattutto dal fegato mediante sintesi di acidi grassi in eccesso. Nella circolazione, i trigliceridi vengono idrolizzati e i relativi acidi grassi vengono trasportati a cellule periferiche lasciando delle particelle residue, che rappresentano dei precursori delle LDL. Dopo un digiuno notturno, i chilomicroni risultano di norma eliminati dalla circolazione. Un livello elevato di trigliceridi rilevato in un campione prelevato a digiuno è indice di un sistema di eliminazione difettoso o di eccessiva produzione, con conseguente possibile aumento del rischio di CVD: pertanto tale rilevazione è utile per caratterizzare i disturbi metabolici e il rischio complessivo.

L'istituto nazionale USA per il cuore, i polmoni e la circolazione (US National Heart, Lung and Blood Institute) ha organizzato il programma nazionale per l'educazione sul colesterolo (National Cholesterol Education Program), istituendo comitati di specialisti per mettere a punto criteri clinici per la classificazione e la terapia dell'ipercolesterolemia. Secondo le più recenti raccomandazioni, contenute nelle linee guida del comitato III per la terapia degli adulti (Adult Treatment Panel III guidelines^{2,3,4}) le decisioni terapeutiche devono basarsi principalmente sui livelli di LDL, rilevati nell'ambito del pannello lipidico dopo la misurazione del colesterolo totale, delle HDL e dei trigliceridi. I valori limite di 100, 130, 160, e 190 mg/dl riferiti alle LDL definiscono le categorie di rischio: ottimale, quasi ottimale, elevato (borderline), elevato e molto elevato. Un valore HDL inferiore a 40 mg/dl è basso ed è considerato dall'ATPIII un fattore di rischio, modificando l'obiettivo terapeutico delle LDL. Un valore HDL superiore a 60 mg/dl viene definito alto, è considerato desiderabile ed è un fattore di rischio negativo, in quanto si sottrae dal numero totale dei fattori di rischio ai fini della scelta del corretto obiettivo terapeutico delle LDL. Per quanto riguarda i trigliceridi, i valori limite di 150, 200, e 500 mg/dl definiscono rispettivamente livelli normali, elevati (borderline), elevati, e molto elevati.

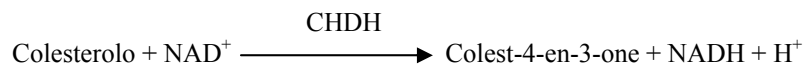
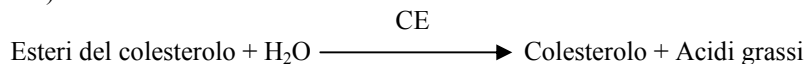
I test Piccolo per il Colesterolo Totale e le HDL soddisfano i requisiti per la certificazione di esattezza e precisione del Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN), coordinato dai centri per il controllo delle patologie (Centers for Disease Control). Il procedimento di certificazione valuta l'accuratezza delle modalità di taratura e la precisione, così da garantire una classificazione attendibile dei pazienti in base ai valori limite NCEP.

Come per ogni esame clinico diagnostico, prima della diagnosi definitiva si dovranno considerare tutti gli altri esami compreso lo stato clinico del paziente.

3. Principi delle procedure

Colesterolo totale (CHOL)

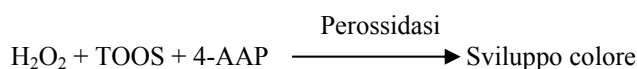
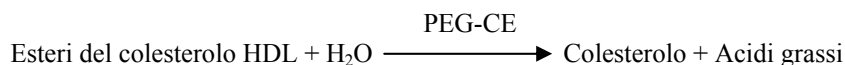
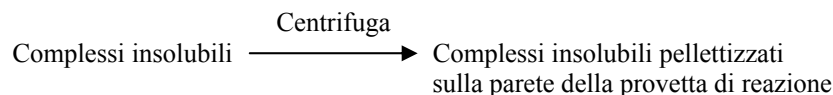
Il test Abaxis CHOL è un'analisi enzimatica di punto finale basata sull'uso della colesterolo esterasi (CE) e la colesterolo deidrogenasi (CHDH).⁵



La CE idrolizza gli esteri del colesterolo formando colesterolo e acidi grassi. La reazione CHDH trasforma il colesterolo in colest-4-en-3-one. La NADH viene misurata bicompativamente a 340 nm e 405 nm. La produzione di NADH è direttamente proporzionale alla quantità di colesterolo presente. Viene inoltre controllato un campione bianco specifico per questa analisi, per accertare che non vi siano interferenze di reazioni estranee nel calcolo dei livelli di CHOL.

Colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL)

Il test Abaxis HDL è un metodo di precipitazione basato sull'uso di colesterolo esterasi modificata con glicole polietilenico (PEG-CE) e di colesterolo ossidasi (PEG-CO) per una maggiore specificità.⁶ Il meccanismo di reazione è il seguente:



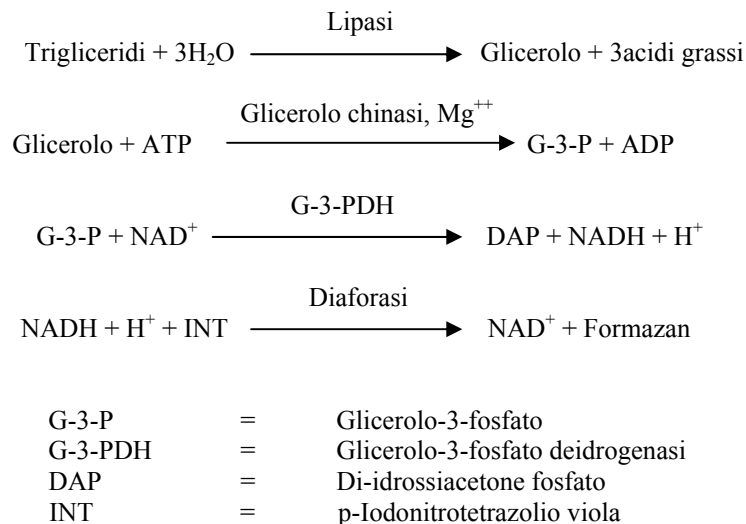
TOOS = N-Etil-N-(2-idrossi-3-sulfopropil)-3-metilnilina, sale sodico, di-idrato

4-AAP = 4-Amminoantipirina

Gli agenti precipitanti solfato di destrano e solfato di magnesio (MgSO₄) formano complessi insolubili specificamente con i chilomicroni (CM), VLDL e LDL nel plasma o siero. I complessi insolubili vengono pellettizzati sulla parete della provetta di reazione all'interno dell'analizzatore. Il restante HDL viene idrolizzato dalla PEG-CE formando colesterolo e acidi grassi. Il colesterolo reagisce con il PEG-CO producendo colest-4-en-3-one e perossido (H₂O₂). La reazione di perossidasi dà luogo a un prodotto di colore purpureo con assorbanza massima a 550 nm e viene riferito a un'assorbanza a 630 nm. La concentrazione di colesterolo HDL è direttamente proporzionale all'assorbanza massima in questa reazione di punto finale. Viene inoltre controllato un campione bianco per accertare che non vi siano interferenze di reazioni estranee nel calcolo dei livelli di HDL.

Trigliceridi (TRIG)

Il test Abaxis TRIG è un'analisi enzimatica di punto finale basata sull'uso di quattro enzimi.^{7,8} Il meccanismo di reazione è il seguente:



Nel primo passaggio i trigliceridi vengono idrolizzati in glicerolo e acidi grassi in una reazione catalizzata dalla lipasi. Il glicerolo viene quindi fosforilato in una reazione che richiede ATP catalizzata dalla glicerolo chinasi (GK). Il glicerolo fosfato viene poi ossidato in di-idrossiacetone fosfato con la contestuale riduzione della NAD⁺ in NADH in una reazione catalizzata dalla glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (G-3-PDH). La NADH viene quindi ossidata con la contestuale riduzione di INT in una reazione catalizzata dalla diaforasi. L'intensità del formazan, di colorazione viva, viene misurata bicromaticamente a 500 nm e 850 nm, ed è direttamente proporzionale alla concentrazione di trigliceridi presente nel campione. Viene inoltre controllato un campione bianco specifico per questa analisi, per accertare che non vi siano interferenze di reazioni estranee nel calcolo dei livelli di TRIG. I risultati consentono di rilevare i trigliceridi totali senza bianco al glicerolo.

LDL (valore calcolato)

L'analizzatore Piccolo o l'analizzatore Piccolo xpress calcola automaticamente la concentrazione di LDL in ogni campione utilizzando i valori relativi a colesterolo totale, HDL e trigliceridi rilevati direttamente, e l'equazione standard Friedewald.⁹ Tale equazione non è valida per concentrazioni di trigliceridi superiori a 400 mg/dl, pazienti non a digiuno, e pazienti con iperlipoproteinemia di tipo III (disbetalipoproteinemia).^{9,10} Non viene riferito alcun valore LDL nel caso di campioni con trigliceridi superiori a 400 mg/dl o nel caso in cui non sia disponibile uno dei valori di analisi misurati direttamente. Sulla scheda dei risultati il valore LDL è seguito dalla lettera "c" a indicare che si tratta di un valore calcolato.

VLDL (valore calcolato)

L'analizzatore Piccolo o l'analizzatore Piccolo xpress calcola automaticamente la concentrazione di VLDL in ogni campione utilizzando l'equazione standard per i trigliceridi/5 (se le unità sono in mg/dl).⁹ Tale equazione non è valida per concentrazioni di trigliceridi superiori a 400 mg/dl, pazienti non a digiuno, e pazienti con iperlipoproteinemia di tipo III (disbetalipoproteinemia).^{9,10} Naturalmente non viene calcolato alcun valore VLDL nel caso in cui non sia disponibile alcun valore dei trigliceridi. Sulla scheda dei risultati il valore VLDL è seguito dalla lettera "c" a indicare che si tratta di un valore calcolato.

Rapporto Colesterolo totale/HDL (valore calcolato)

L'analizzatore Piccolo o l'analizzatore Piccolo xpress calcola automaticamente il rapporto colesterolo totale/HDL (abbreviato TC/H) per ogni campione. Se manca il valore del colesterolo totale o HDL rilevato direttamente, il rapporto non viene calcolato. Sulla scheda dei risultati il valore TC/H è seguito dalla lettera "c" a indicare che si tratta di un valore calcolato.

4. Principio operativo

Si consulti il manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress per quanto riguarda i principi e i limiti della procedura. Per una descrizione dettagliata dell'analizzatore Piccolo e del disco reagente, si veda Schembri et al.¹¹

5. Descrizione dei reagenti

Reagenti

Ogni disco reagente per pannello lipidico Piccolo contiene granuli secchi di reagente specifico per i test (come da descrizione che segue). In ogni disco è compreso un reagente secco per campione bianco (costituito da sostanza tampone, tensioattivi, eccipienti e conservanti) utilizzato per calcolare le concentrazioni di HDL. Nel disco sono inoltre compresi granuli di reagente bianco dedicato per calcolare le concentrazioni di CHOL e TRIG. Ogni disco contiene inoltre un diluente composto da tensioattivi e conservanti.

Tabella 1: Reagenti

Componente	Quantità/Disco
4-Ammioantipirina	6,7 µg
Adenosina 5'-trifosfato, sale disodico	9,2 µg
Ascorbato ossidasi	0,042 U
Colesterolo deidrogenasi	0,080 U
Colesterolo esterasi (Genzima-N)	0,27 U
Colesterolo esterasi (Genzima-P)	0,0080 U
Solfato di destrano	8,4 µg
Diaforasi	0,25 U
N-Etil-N-(2-idrossi-3-sulfopropil)-3-metilanilina, sale sodico, di-idrato (TOOS)	79 µg
Glicerolo chinasi	0,084 U
Glicerolo-3-fosfato deidrogenasi	0,21 U
Iodonitrotetrazolio cloruro (INT)	8,4 µg
Lipasi	16,8 U
Cloruro di magnesio, esaidrato	8,6 µg
Solfato di magnesio, eptaidrato	197 µg
Nicotinammide adenin dinucleotide, sale monosodico (NAD)	455 µg
PEG-colesterolo esterasi	0,013 U
PEG-colesterolo ossidasi	0,089 U
Perossidasi	0,27 U
Sostanze tampone, tensioattivi, eccipienti e conservanti	

Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro*
- Il contenitore del diluente nel disco reagente viene aperto automaticamente al momento della chiusura del cassetto dell'analizzatore. Non si può riutilizzare un disco con contenitore del diluente aperto. Accertarsi che il campione o controllo sia stato inserito nel disco prima di chiudere il cassetto.
- I dischi reagente usati contengono fluidi corporei umani. Si dovranno adottare le corrette prassi di laboratorio nel maneggiare e smaltire i dischi usati.¹² Si consulti il manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress per le istruzioni sulle modalità di eliminazione di eventuali fuoriuscite di materiale a rischio biologico.
- I dischi reagente sono in plastica e possono spaccarsi o scheggiarsi in caso di caduta. Non utilizzare in alcun caso un disco che abbia subito cadute in quanto può rilasciare materiale a rischio biologico all'interno dell'analizzatore.

- Le gocce di reagente possono contenere acidi o sostanze caustiche. L'operatore non viene a contatto con i granuli di reagente se vengono seguite le procedure raccomandate. Qualora si debbano maneggiare i granuli (p. es, per pulire dopo aver fatto cadere e infranto un disco reagente), evitare l'ingestione, il contatto cutaneo e l'inalazione.

Istruzioni per la manipolazione del reagente

I dischi reagente possono essere utilizzati direttamente dal frigorifero senza riscaldarli. Se un disco non viene utilizzato entro 20 minuti dopo l'apertura dell'astuccio, dovrà essere gettato via. Non lasciare i dischi sigillati negli astucci di foglio d'alluminio a temperatura ambiente per oltre 48 ore prima dell'uso. Aprire l'astuccio di foglio d'alluminio sigillato, estrarre il disco e utilizzarlo seguendo le istruzioni contenute nel manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress.

Conservazione

Conservare i dischi reagente negli astucci sigillati a 2-8°C (36-46°F). Non esporre i dischi, aperti o meno, alla luce solare diretta o a temperature superiori a 32°C (90°F). I dischi reagente si possono utilizzare fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. La data di scadenza è inoltre indicata in forma codificata nel codice a barre stampato sul relativo anello. Se i reagenti sono scaduti, sul visualizzatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress apparirà un messaggio di errore.

Segni di instabilità o deterioramento del disco reagente

Se l'astuccio è strappato o comunque danneggiato, l'umidità può penetrare nel disco non utilizzato e alterare il comportamento del reagente. Non utilizzare dischi prelevati da astucci danneggiati.

6. Strumento

Consultare il manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress per avere informazioni dettagliate sull'uso dell'analizzatore.

7. Prelievo e preparazione dei campioni

Le tecniche di prelievo dei campioni sono descritte nella sezione "Prelievo dei campioni" del manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress.

- Secondo l'ATP III,^{2,3,4} si devono utilizzare campioni prelevati da soggetti a digiuno (da 8 a 12 ore) per il rilevamento di CHOL, HDL, TRIG e LDL. Pertanto si consiglia vivamente di utilizzare campioni da soggetti a digiuno con il disco per pannello lipidico. Se il paziente non è a digiuno, i valori TRIG e i valori LDL calcolati non sono validi.
- Utilizzare solo provette da prelievo evacuate all'eparina di litio (tappo verde), con o senza separatori gel, per i campioni di sangue intero o di plasma. Utilizzare provette da prelievo evacuate senza additivo (tappo rosso) o tubi separatori del siero (tappo rosso o rosso/nero) per i campioni di siero.
- La quantità minima del campione è di ~100 µL di sangue intero eparinizzato, plasma eparinizzato, siero o materiale di controllo. Il ricettacolo del campione sul disco reagente può contenere fino a 120 µL.
- I campioni di sangue intero prelevati da una vena devono essere omogenei prima che il campione venga trasferito nel disco reagente. Invertire delicatamente la provetta di prelievo varie volte subito prima di trasferire il campione. Non scuotere il tubo di prelievo; ciò potrebbe causare emolisi.
- I campioni di sangue intero prelevati per puntura di una vena si devono sottoporre a test entro 60 minuti dal prelievo.^{13,14} Il campione può essere diviso in plasma o siero e conservato in provette con tappo a 2-8°C (36-46°F) qualora non fosse possibile sottoporlo a test entro 60 minuti.
- Iniziare il test non oltre 10 minuti dopo aver trasferito il campione nel disco reagente.

8. Procedura

Materiale in dotazione

- Un disco reagente per pannello lipidico Piccolo PN: 400-1025 (una scatola di dischi PN: 400-0025)

Materiale occorrente ma non in dotazione

- Analizzatore chimico del sangue Piccolo o analizzatore chimico Piccolo xpress
- Una pipetta di trasferimento del campione (circa 100 µL di volume predefinito) con relativi puntali è acclusa in ogni analizzatore chimico del sangue Piccolo o analizzatore chimico Piccolo xpress. È possibile riordinare tali materiali presso Abaxis.
- Controlli raccomandati da Abaxis disponibili in commercio (rivolgersi al servizio di assistenza Tecnica Abaxis per conoscere i materiali di controllo approvati e i valori attesi”).
- Cronometro

Parametri del test

L'analizzatore chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress funziona a temperatura ambiente compresa tra 15°C e 32°C (59-90°F). Il tempo di analisi per ogni disco reagente per pannello lipidico Piccolo è meno di 15 minuti.

L'analizzatore mantiene il disco reagente a una temperatura di 37°C (98,6°F) durante l'intervallo di misurazione.

Procedura del test

Le procedure dettagliate per il prelievo e il modo di operare sono descritte nel manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress.

Taratura

L'analizzatore chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress è tarato dal produttore prima della spedizione. Il codice a barre stampato sul relativo anello fornisce i dati di taratura specifici dei dischi. Consultare il manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress.

Controllo qualitativo

Consultare la sezione 2.4 del manuale dell'operatore dell'analizzatore Piccolo o la sezione 6 (Taratura e controllo qualitativo) del manuale dell'operatore dell'analizzatore Piccolo xpress. Le prestazioni dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress si possono verificare effettuando test su controlli. Per un elenco di materiali di controllo qualitativo approvati con i relativi range di accettazione, rivolgersi all'assistenza tecnica Abaxis. Altri controlli a base di siero o plasma umano potrebbero non essere compatibili. I materiali di controllo qualitativo devono essere conservati secondo le istruzioni del foglio illustrativo incluso nella confezione dei controlli.

Se i risultati sono fuori range, ripetere una volta. Se i risultati sono nuovamente fuori range, rivolgersi all'assistenza tecnica. Non refertare i risultati se i controlli sono al di fuori dei limiti riportati sulla relativa etichetta. Consultare il manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico Piccolo o Piccolo xpress per una trattazione dettagliata sulle modalità di esecuzione, registrazione, interpretazione e rappresentazione grafica dei risultati dei controlli.

Laboratori esenti: Abaxis raccomanda di testare i controlli nel modo seguente:

- almeno ogni 30 giorni
- ogni volta che intervengono mutamenti significativi nelle condizioni del laboratorio (ad esempio, se l'analizzatore Piccolo viene spostato in una nuova collocazione oppure in presenza di variazioni nel controllo della temperatura)
- quando è indicato un corso di formazione o aggiornamento del personale
- ogni volta che viene utilizzato un nuovo lotto (test esenti dalle norme CLIA in laboratori esenti)

Laboratori non esenti: Abaxis raccomanda di testare i controlli seguendo le linee guida federali, statali e locali.

9. Risultati

L'analizzatore chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress analizza, calcola e stampa automaticamente le concentrazioni degli analiti nel campione. Per quanto riguarda i risultati che vengono calcolati anziché rilevati direttamente, i risultati relativi a LDL, VLDL e TC/H sono seguiti da una “c” indicante che tali valori sono calcolati. I dettagli relativi al calcolo della reazione al punto finale e nel tempo sono indicati nel manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress.

L'interpretazione dei risultati è descritta in dettaglio nel manuale dell'operatore. I risultati vengono stampati su apposite schede fornite da Abaxis. Le schede risultati sono adesive sul retro per poterle facilmente applicare sulle cartelle dei pazienti.

10. Limiti d'uso della procedura

I limiti generici della procedura sono descritti nel manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress.

- L'unico anticoagulante **raccomandato per l'uso** con il sistema chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress è l'**eparina di litio**. Non utilizzare eparina di sodio.
- I campioni con ematocriti superiori al 62% del volume dei globuli rossi concentrati possono dare luogo a risultati imprecisi. I campioni con ematocriti elevati possono risultare emolizzati. Questi campioni si possono centrifugare per ottenere plasma e poi rianalizzare con un disco reagente nuovo.
- **Eventuali risultati di un dato test che superino i valori minimi e massimi di riferimento per l'analisi in questione si dovranno analizzare con un altro metodo di esame approvato o inviati a un laboratorio di fiducia. Non diluire il campione e rianalizzarlo con l'analizzatore chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress.**

Avvertenza: Le numerose prove condotte sul sistema chimico del sangue Piccolo o il sistema chimico Piccolo xpress hanno evidenziato che, in casi molto rari, il flusso di campione erogato all'interno del disco reagente può non essere regolare all'interno del ricettacolo del campione. A causa del flusso irregolare, è possibile che venga analizzata una quantità inadeguata di campione, e diversi risultati potrebbero superare i valori di riferimento minimi e massimi. Il campione può essere rianalizzato usando un nuovo disco reagente.

Interferenza

Le sostanze sono state testate come interferenti con gli analiti. Sono stati preparati gruppi di siero umano. Ciascun possibile interferente è stato testato a una concentrazione basata sui livelli di analisi riportati in NCCLS EP7-A.¹⁵

Effetti delle sostanze endogene

- Gli interferenti fisiologici (emolisi, ittero e lipemia) causano alterazioni nelle risultanze delle concentrazioni di alcuni analiti. Gli indici del campione sono stampati sulla parte inferiore di ogni scheda dei risultati per informare l'operatore sui livelli di interferenti presenti in ogni campione.
- Il sistema chimico del sangue Piccolo o il sistema chimico Piccolo xpress elimina ogni eventuale risultato falsato da un'interferenza superiore al 10% dovuta a emolisi, lipemia e ittero. Le diciture "HEM", "LIP", o "ICT" rispettivamente, sono stampate sulla scheda dei risultati al posto del risultato.
- Per i livelli massimi di sostanze endogene si prega di rivolgersi al servizio assistenza tecnica Abaxis.

Effetti delle sostanze terapeutiche

Sono state selezionate sedici sostanze terapeutiche in quanto potenziali interferenti per le analisi su colesterolo totale, HDL e trigliceridi, secondo le raccomandazioni di Young.¹⁶ Si definisce interferenza significativa uno spostamento maggiore del 10% nel risultato relativo a un campione che rientra nei valori normali. Ai gruppi di siero umano sono state aggiunte concentrazioni note di farmaci o sostanze chimiche; si è poi proceduto alla relativa analisi.

Tabella 2: Valutazione delle sostanze terapeutiche

	Valori fisiologici o terapeutici^{15,16} (mg/dl)	Concentrazione massima testata (mg/dl)
Acetamminofene	2–10	100
Acetoacetato, litio	0,05–3,6	102
Acido acetilsalicilico	1–2	50
Acido ascorbico		3
Digossina	0,8–1,5	5
Glutazione		30
Eparina, litio		4,4 (800 U/dl)
β-Idrossibutirato	0,21–2,81	1.000
Ibuprofene	0,5–4,2	50
Isoniazide	0,1–0,7	4
Lattato, litio	6–12	84
Lidocaina	0,5–0,6	1
Meticillina, sodio		100
Fenitoina	1–2	3
Acido salicilico		50
Teofillina	1–2	20

Nessuna delle analisi ha evidenziato un'interferenza significativa alle concentrazioni di sostanze esogene testate.

Tabella 3: Concentrazione di analiti nei gruppi di siero (2 livelli) usati per le sostanze esogene
Ricerche sull'interferenza

Analita	Concentrazione
Colesterolo (CHOL)	163 e 197 mg/dl
HDL	39 e 52 mg/dl
Trigliceridi (TRIG)	125 e 183 mg/dl

11. Valori limite

I valori limite per gli analiti relativi a lipidi/lipoproteine, stabiliti dal programma nazionale di educazione sul colesterolo in base al parere della maggioranza degli specialisti, sono i seguenti.^{2,3,4}

Tabella 4: Valori stabiliti dagli specialisti^{2,3,4}

	Interpretazione	Valori limite (mg/dl)	Valori limite mmol/L
Colesterolo totale (CHOL)	Desiderabile	< 200	< 5,17
	Elevato (borderline)	200–239	5,17–6,18
	Elevato	≥ 240	6,20
HDL	valore HDL basso - Fattore di rischio	< 40	< 1,03
	valore HDL elevato - Fattore di rischio negativo (desiderabile)	≥ 60	≥ 1,55
Trigliceridi (TRIG)	Normale	< 150	<1,70
	Elevato (borderline)	150–199	1,70–2,25
	Elevato	200–499	2,26–5,64
	Molto elevato	≥ 500	≥ 5,65
LDL*	Ottimale	< 100	< 2,58
	Quasi ottimale	100–129	2,58–3,33
	Elevato (borderline)	130–159	3,36–4,11
	Elevato	160–189	4,13–4,88
	Molto elevato	≥ 190	≥ 4,91
VLDL (CALC)**	Normale	< 30	
	Elevato	≥ 30	
Rapporto Colesterolo totale/HDL	Rischio basso	≤ 5	≤ 4,5
	Rischio elevato	> 5	> 4,5

* L'analizzatore Piccolo o Piccolo xpress calcola la concentrazione di LDL con l'equazione Friedewald.⁹

** Per ulteriori informazioni si veda: NCEP, Rapporto 2002 dell'ATP III, Sezione II, Motivi di intervento, 3 Altri fattori di rischio da lipidi, Pagine II-8.²

Rapporti Colesterolo totale/HDL (TC/H)

Il rapporto tra colesterolo totale e HDL (TC/H) viene calcolato per comodità dell'utilizzatore. Un rapporto TC/H di ≤ 5 si considera di norma desiderabile per gli individui di sesso maschile. Dato che le donne hanno di solito valori HDL superiori agli uomini, alcuni raccomandano un valore limite di 4,5 per le donne.¹⁷ Tale rapporto è stato propugnato da alcuni studiosi come mezzo semplice e pratico per esprimere il rischio di CVD con un unico numero, che comprenda il colesterolo totale come marcatore per le lipoproteine aterogene nel numeratore, e il colesterolo HDL anti-aterogeno nel denominatore.¹ Si segnala che, sebbene il rapporto TC/H rappresenti un importante indice di previsione del rischio di CVD, come dimostrato da numerosi studi epidemiologici,¹ il NCEP non ne raccomanda l'uso per la gestione dei pazienti. Secondo i criteri clinici indicati dal NCEP, le decisioni terapeutiche devono basarsi sulle singole lipoproteine (tabella 5), mentre l'uso del rapporto è considerato una possibile diversione dall'obiettivo prioritario, cioè il rilevamento delle singole lipoproteine.^{2,3,4}

12. Caratteristiche prestazionali

Linearità

La chimica per ciascun analita è lineare sull'arco dei valori dinamici elencati di seguito se l'analizzatore chimico del sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo xpress viene utilizzato seguendo la procedura raccomandata (si veda il manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo xpress). Questa valutazione si è basata su NCCLS EP6-P2.¹⁸

Tabella 5: Valori dinamici Piccolo

Analita	Unità comuni	Unità SI
CHOL	20–520 mg/dl	0,52–13,5 mmol/l
HDL	15–100 mg/dl	0,39–2,59 mmol/l
TRIG	20–500 mg/dl	0,23–5,65 mmol/l

Se la concentrazione dell'analita è superiore ai valori di rilevamento (dinamici) ma inferiore ai valori previsti dal sistema, sulla scheda dei risultati sarà indicato un segno ">" vicino al limite immediatamente superiore ed un asterisco vicino al numero, ad esempio: CHOL >520* mg/dl. Se la concentrazione è inferiore ai valori dinamici, sulla scheda sarà riportato il segno "<" con un asterisco, ad esempio: CHOL <20* mg/dl. Per i valori che si discostano notevolmente da quelli previsti dal sistema, al posto del risultato verrà stampato il segno "~~~~". Nel caso di schede in cui appare il segno "~~~~", prelevare un nuovo campione ed eseguire nuovamente il test. Se anche i risultati del secondo campione sono soppressi rivolgersi al servizio di assistenza tecnica Abaxis.

Sensibilità

Il limite inferiore dei valori rilevabili (dinamici) per ogni analita è: colesterolo 20 mg/dl (0,52 mmol/l); HDL 15 mg/dl (0,39 mmol/l), trigliceridi 20 mg/dl (0,23 mmol/l).

Precisione

Gli studi sulla precisione sono stati effettuati seguendo le linee guida NCCLS EP5-A¹⁹ con modifiche in base a NCCLS EP18-P²⁰ per quanto riguarda i dispositivi a utilizzo unitario. I risultati relativi alla precisione, sia durante l'esecuzione che totale, sono stati determinati utilizzando due campioni di siero. Per gli studi sono stati usati dati provenienti da quattro analizzatori, due lotti di dischi, e due diversi siti su un arco di 10 giorni per entrambi i campioni. I risultati sono riportati in sintesi qui di seguito.

Tabella 6: Precisione

Analita	Entità del campione	Durante lo svolgimento	Totale
Colesterolo totale (CHOL)			
<u>Siero 1</u>	N=160		
Media (mg/dl)		223,7	223,7
DV		3,0	5,7
%CV		1,3	2,6
<u>Siero 2</u>	N=160		
Media (mg/dl)		202,2	202,2
DV		3,1	4,4
%CV		1,5	2,2
HDL			
<u>Siero 1</u>	N=160		
Media (mg/dl)		55,3	55,3
DV		1,4	1,9
%CV		2,6	3,5
<u>Siero 2</u>	N=160		
Media (mg/dl)		38,0	38,0
DV		1,3	1,6
%CV		3,5	4,3
Trigliceridi (TRIG)			
<u>Siero 1</u>	N=160		
Media (mg/dl)		206,8	206,8
DV		4,7	5,5
%CV		2,3	2,6
<u>Siero 2</u>	N=160		
Media (mg/dl)		163,7	163,7
DV		1,8	2,4
%CV		1,1	1,5

Questi dati indicano che tutte e tre le analisi soddisfano i criteri di precisione fissati dal NCEP.^{2,3,4}

Correlazione

I campioni di siero sono stati prelevati e poi analizzati con l'analizzatore chimico del sangue Piccolo e con metodi comparativi. Tutti i risultati dei test sono stati prodotti sul posto presso un sito. I campioni stati scelti prendendo a riferimento la distribuzione dei valori indicata nelle linee guida NCCLS EP9-A2 per ciascun analita.²¹ La Tabella 8 riporta le statistiche di correlazione rappresentative.

Tabella 7: Correlazione dell'analizzatore chimico del sangue Piccolo con i metodi di comparazione

Analisi	Coefficiente di correlazione (r)	Pendenza	Intercetta	SEE	N	Valori di riferimento del campione (mg/dl)	Metodo comparativo
Colesterolo (CHOL)	0,997	1,079	-17,1	4,5	174	115-342	Test Bayer per il colesterolo su Hitachi 917
HDL	0,965	0,851	8,3	3,9	166	23-97	Roche HDL-C plus su Hitachi 917
Trigliceridi (TRIG)	0,999	0,983	8,2	4,4	172	38-487	Test Bayer per i trigliceridi su Hitachi 917

Tabella 8: Recupero calcolato delle analisi Abaxis per pannello lipidico

Analisi	Dispositivo predicato Concentrazione (mg/dl)	Recupero calcolato dell'analizzatore Piccolo rispetto ai dati di regressione lineare sopra indicati (mg/dl)	Distorsione (mg/dl)	Distorsione %
Colesterolo (CHOL)	200	199	-1	-0,5
	240	242	2	0,8
HDL	40	42	2	5,0
	60	59	-1	-1,7
Trigliceridi (TRIG)	150	156	6	4,0
	200	205	5	2,5

Accuratezza – Certificazione rilasciata da Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)

L'accuratezza delle analisi Piccolo sul colesterolo totale e il colesterolo HDL è stata stabilita portando a termine il processo di certificazione del CRMLN per questi analiti nel siero. Una parte fondamentale di tale certificazione è l'analisi di regressione lineare dei test Piccolo rispetto ai metodi di riferimento. L'accuratezza del test sul colesterolo totale rispetto al metodo di riferimento Abell-Kendall è indicata dal coefficiente di correlazione (R^2) di 0,996, con pendenza 0,972 e intercetta 7,2 mg/dl. Un CV "among-run" (n=10) per il test Piccolo sul Colesterolo totale è risultato di 0,8%.

Per il test Piccolo sull'HDL rispetto al metodo di riferimento per l'HDL (precipitazione seguita da test Abell-Kendall per il colesterolo) il coefficiente di correlazione (R^2) è risultato di 0,986, con pendenza 0,968 e intercetta 2,1 mg/dl. Un CV "among-run" (n=20) per il test Piccolo sull'HDL è risultato di 1,9%.

Le prestazioni osservate soddisfano i requisiti per la certificazione CRMLN per il colesterolo totale e l'HDL per il siero. La certificazione CRMLN per le analisi sui trigliceridi non è ancora disponibile negli Stati Uniti. In ogni caso, lo studio di correlazione descritto in precedenza per i trigliceridi è stato condotto presso un laboratorio standardizzato per i trigliceridi in base al programma di standardizzazione dei lipidi CDC-NHLBI.

Risultati dello studio con operatori non istruiti nell'uso dell'analizzatore

È stato eseguito uno studio con operatori non istruiti nell'uso dell'analizzatore: ai partecipanti sono state impartite solo le istruzioni per l'esecuzione del test, ed è stato chiesto loro di analizzare 3 pannelli lipidici con campioni randomizzati in cieco. I campioni erano costituiti da gruppi di siero preparati a tre livelli per ciascuno dei tre analiti: colesterolo totale, colesterolo HDL e trigliceridi. I partecipanti non hanno ricevuto alcuna formazione sull'uso del test. Sono stati chiamati a partecipare allo studio 63 operatori provenienti da 3 centri e che ben rappresentavano una popolazione statisticamente diversificata (per formazione professionale, età, sesso ecc.).

Nelle tabelle di seguito sono riportati in sintesi i risultati di ogni analita.

Colesterolo totale

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	63	63	63
Media	144,2 mg/dl	198,4 mg/dl	245,1 mg/dl
%CV	2,9%	2,3%	1,3%
Intervallo di valori rilevato	122 - 154	186 - 222	237 - 255
Percentuale di risultati compresi nell'intervallo $\pm 11,1\%^*$	98,4% (62/63) 95%CI: 91,5% - 100%	100% (63/63) 95% CI: 94,3% - 100%	100% (63/63) 95% CI: 94,3% - 100%

*La percentuale si basa sul presupposto che non è possibile distinguere correttamente tra valori normali e anomali quando gli errori superano di più di un quarto l'intervallo normale. È stato considerato l'intervallo (140 mg/dl -220 mg/dl).

Colesterolo HDL

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	63	63	63
Media	29,4 mg/dl	44,4 mg/dl	58,9 mg/dl
%CV	3,3%	3,2%	2,0%
Intervallo di valori rilevato	28 - 32	42 - 48	57 - 62
Percentuale di risultati compresi nell'intervallo $\pm 15,0\%$	100% (63/63) 95%CI: 94,3% - 100%	100% (63/63) 95% CI: 94,3% - 100%	100% (63/63) 95% CI: 94,3% - 100%

Trigliceridi

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	63	63	63
Media	83,4 mg/dl	152,7 mg/dl	205,6 mg/dl
%CV	3,0%	1,5%	0,9%
Intervallo di valori rilevato	77 - 96	148 - 164	201 - 210
Percentuale di risultati compresi nell'intervallo $\pm 15,0\%$	100% (63/63) 95%CI: 94,3% - 100%	100% (63/63) 95% CI: 94,3% - 100%	100% (63/63) 95% CI: 94,3% - 100%

13. Bibliografia

1. Castelli, WP, et al. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Epidemiol* 1992; 2:23-28.
2. National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, 2001.
3. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
4. Warnick, GR, et al. Impact of the third cholesterol report from the Adult Treatment Panel of the National Cholesterol Education Program on the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2002; 48:11-17.
5. Kayamori, Y, et al. Endpoint colorimetric method for assaying total cholesterol in serum with cholesterol dehydrogenase. *Clin Chem* 1999; 45:2158-2163.
6. Warnick G, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem* 2001; 47:1579-96.
7. Klotzsch SG, McNamara JR. Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. *Clin Chem* 1990; 36:1605-1613.
8. Cole TG, Klotzsch SG, McNamara JR. Measurement of Triglyceride Concentration. In *Handbook of Lipoprotein Testing* 2nd ed, Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, comps. Washington, DC: AACC Press. 2000: 207-219.
9. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
10. Bachorik PS. Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol. In *Handbook of Lipoprotein Testing*, 2nd ed, Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, comps. Washington, DC: AACC Press. 2000: 245-263.
11. Schembri CT, et al. Centrifugation and capillarity integrated into a multiple analyte whole blood analyser. *J Automatic Chem* 1995; 17:99-104. (journal's name changed in 2000 to *J Automated Methods & Management in Chemistry*)
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). *Clinical laboratory waste management; approved guideline – second edition*. NCCLS Document GP5-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). *Procedure for the collection of diagnostic specimens by venipuncture; approved guideline – fourth edition*. NCCLS Document H3-A4. Wayne, PA: NCCLS, 1998.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). *Procedures for the handling and processing of blood specimens; approved guideline – second edition*. NCCLS Document H18-A2. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
15. 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.
16. Young, DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 3rd ed. Washington, DC: AACC Press. 1990 and 1991 Supplement.
17. Kroll MH, et al. Standardization of Lipoprotein Reporting. *Am J Clin Pathol* 2000; 114:696-702.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). *Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical methods; proposed guideline – second edition*. NCCLS Document EP6-P2. Wayne, PA: NCCLS, 2001.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, 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.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). *Quality management for unit-use testing; proposed guideline*. NCCLS Document EP18-P. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly, National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS). *Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline – second edition*. NCCLS Document EP9-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002.