

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

Maggio 2006
N. parte: 500-7118, Rev. C
© 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587, U.S.A.

1. Uso previsto

Il rotore reagente T₄/colesterolo VetScan usato con l'analizzatore di sangue intero VetScan impiega reagenti secchi e liquidi per fornire determinazioni quantitative *in vitro* di tiroxina (T₄) e colesterolo in sangue intero eparinizzato, plasma eparinizzato o siero.

2. Sommario e spiegazione dei test

Tiroxina (T₄)

La tiroxina è un ormone sintetizzato e secreto dalla tiroide. La forma secretoria primaria dell'ormone tiroideo è la tetraiodotironina (T₄), sebbene nel sangue venga secreta anche una certa quantità di triiodotironina (T₃). Nel plasma canino, il rapporto tra T₄ e T₃ è 25:1. Una volta nel sangue, T₄ e T₃ vengono legate dalle proteine di trasporto. Nel cane e nell'albumina del gatto, la proteina legante primaria è la globulina legante la tiroxina (TBG). Una volta giunta alla cellula bersaglio, la T₄ viene trasformata in T₃ in corrispondenza della superficie cellulare. La T₃ è la forma biologicamente attiva dell'ormone tiroideo e penetra più facilmente nella cellula bersaglio.

L'ormone tiroideo ha numerosi effetti sull'organismo, tra cui quelli clinico, fisiologico, calorigeno, metabolico (carboidrati, proteine e lipidi), riproduttivo, ematologico e sullo sviluppo. Le determinazioni della T₄ agevolano la diagnosi di ipotiroidismo e ipertiroidismo e il monitoraggio delle terapie a base di levotiroxina sodica e metimazolo.

I segni di livelli anormali di T₄ sono spesso vaghi. I più comuni segni osservabili di ipotiroidismo canino sono mutamenti della pelle e del pelo, come per esempio alopecia o pelo secco e opaco. Tra gli altri segni osservabili nei cani vi sono letargia, intolleranza allo sforzo fisico, debolezza, atrofia muscolare, depositi lipidici corneali e diarrea. I segni clinici di ipotiroidismo felino includono letargia e obesità (specialmente nell'ipotiroidismo iatrogeno), alopecia, perdita di pelo e bradicardia.

I segni clinici di ipertiroidismo felino maggiormente prevalenti sono perdita di pelo e polifagia. Tra gli altri segni comuni vi sono irrequietezza, tachicardia, poliuria-polidipsia, alopecia e diarrea.

Colesterolo

Il colesterolo è il principale precursore di estere di colesterolo, acidi biliari e ormoni steroidei ed è un componente delle membrane plasmatiche. La velocità della biosintesi del colesterolo nel fegato è indirettamente proporzionale all'apporto dietetico. I livelli di colesterolo nell'organismo sono indirettamente controllati dall'ormone tiroideo che stimola la produzione di acidi biliari. Poiché gli acidi biliari sono sintetizzati dal colesterolo, le concentrazioni di colesterolo variano inversamente all'attività dell'ormone tiroideo.

I livelli di colesterolo possono essere usati per agevolare la rilevazione di iperlipidemia o come test di screening di ipotiroidismo e iperadrenocorticismo. I risultati del colesterolo sono particolarmente utili allorché analizzati in associazione con altri test di chimica clinica.

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

Tiroxina (T₄)

Il primo metodo diretto clinicamente eseguibile per misurare la tiroxina è stato il dosaggio competitivo a legame proteico (CPBA) sviluppato da Murphy & Pattee nei primi anni Sessanta.¹ Le tecniche radioimmunologiche (RIA), caratterizzate da maggiori sensibilità e specificità, hanno ampiamente sostituito il CPBA.² Le preoccupazioni per i rifiuti radioattivi e i potenziali pericoli per la salute, hanno promosso lo sviluppo di test non isotopici, come per esempio i dosaggi immunoenzimatici e i dosaggi immunologici mediante fluorescenza. I dosaggi immunoenzimatici (EIA) per la tiroxina hanno dimostrato di avere, a livelli clinici importanti, accuratezza e precisione equivalenti alle procedure RIA automatiche.³ Come metodo di riferimento, è stata proposta una procedura di diluizione isotopica in spettrometria di massa, che è tuttavia estremamente complessa ed elaborata.⁴

Abaxis ha adattato un metodo EIA in commercio da usare nell'analizzatore di sangue intero VetScan. Nella reazione, l'acido 8-anilino-1-naftalene solfonico (ANS) provoca il rilascio di T₄ endogena dalle proteine leganti. La T₄ endogena rilasciata compete per i siti leganti l'anticorpo (Ab) con la T₄ marcata con l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (coniugato G6PDH-T₄). Il coniugato G6PDH-T₄ legato all'anticorpo ha un'attività inferiore all'anticorpo non legato. A mano a mano che aumenta il legame di T₄ endogena, cresce la quantità di coniugato enzimatico non legato. L'enzima attivo riduce il nicotinammide adenin dinucleotide (NAD⁺) in NADH.

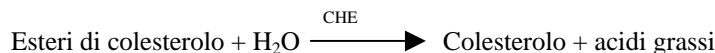


La velocità di variazione dell'assorbanza a 340 nm è dovuta alla conversione di NAD⁺ in NADH ed è direttamente proporzionale alla T₄ endogena presente nel campione.

Colesterolo

I test più comuni impiegano reazioni enzimatiche di endpoint. Queste semplici procedure usano di norma colesterolo esterasi e colesterolo ossidasi con un reagente Trinder.^{5,6} Abaxis ha sviluppato un metodo enzimatico che utilizza colesterolo deidrogenasi anziché colesterolo ossidasi. L'uso di colesterolo deidrogenasi elimina la reazione Trinder, evitando in tal modo l'interferenza causata da analiti fisiologici quali bilirubina ed emoglobina.

La colesterolo esterasi idrolizza gli esteri di colesterolo e H₂O formando colesterolo e acidi grassi. Il colesterolo viene ossidato dalla colesterolo deidrogenasi in colesstenone e il nicotinammide adenin dinucleotide (NAD⁺) viene ridotto in NADH.



L'assorbanza viene misurata bicromaticamente a 340 nm e 405 nm. Viene misurato anche un campione bianco dedicato per garantire che nessuna reazione estranea interferisca con i calcoli dei livelli di colesterolo. La produzione di NADH è la reazione di endpoint direttamente proporzionale alla quantità di colesterolo presente nel campione.

4. Principio del test

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

5. Descrizione dei reagenti

Reagenti

Ogni rotore reagente T₄/colesterolo VetScan contiene microsfere secche di reagente specifico per il test. In ogni rotore di reagenti è compreso un reagente secco per campione bianco (costituito da tampone, tensioattivi, eccipienti e conservanti) utilizzato per calcolare gli indici del campione. Ciascun rotore reagente contiene anche un diluente composto da tensioattivi, ANS, anticorpi anti T₄ e conservanti.

Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *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 microsfere di reagente possono contenere acidi o sostanze caustiche. Se rispetta le procedure raccomandate, l'operatore non viene a contatto con le microsfere di reagente. In caso di manipolazione delle microsfere (es. pulizia in seguito a caduta e incrinatura di un rotore reagente), evitare ingestione, contatto cutaneo e inalazione.
- Le microsfere di reagente e il diluente 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 di 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 del sistema 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 di 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 24 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 di sangue intero VetScan viene visualizzato un messaggio di errore.
- In caso di sacchetto strappato o altrimenti danneggiato, l'umidità può penetrare nel rotore 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 del sistema 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 di siero. 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 dal prelievo; qualora ciò non fosse possibile, separare il campione e trasferirlo in una provetta pulita.⁷ 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 autoscongelamento.

Sostanze interferenti conosciute

- L'unico anticoagulante raccomandato per l'uso con l'analizzatore di sangue intero VetScan è la litio eparina.
- 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 di sangue intero VetScan elimina gli eventuali risultati falsati da un'interferenza > 10% dovuta a emolisi, lipemia o ittero. In tal caso, sulla scheda dei risultati anziché i risultati verrà rispettivamente stampata la dicitura "HEM" (emolisi), "LIP" (lipemia) o "ICT" (ittero).

8. Procedura

Materiali forniti

- Un rotore reagente T4/colesterolo VetScan

Materiali necessari ma non forniti

- Analizzatore chimico di sangue intero 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 T4/colesterolo 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 del sistema VetScan.

Calibrazione

L'analizzatore di sangue intero 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 del sistema VetScan.

Controllo di qualità

Per verificare l'accuratezza dell'analizzatore di sangue intero 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 del sistema VetScan.

9. Risultati

L'analizzatore di sangue intero 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 del sistema VetScan.

Interpretazione dei risultati

T₄ aumentata

- Le concentrazioni di T₄ tendono ad essere più elevate nei cani di età inferiore a un anno e a diminuire a mano a mano che l'età del cane avanza.
- Un livello aumentato di T₄ nei gatti è un indice affidabile di ipertiroidismo. L'ipertiroidismo è la causa più comune di T₄ elevata e rappresenta una delle malattie più frequentemente diagnosticate nei piccoli animali. La causa tipica di ipertiroidismo spontaneo nei gatti è l'adenoma tiroideo funzionante. L'ipertiroidismo si riscontra raramente nei cani, ma allorché osservato, è generalmente indicativo di neoplasia o somministrazione di una quantità eccessiva di levotiroxina sodica a un cane ipotiroideo. Circa il 66% dei neoplasmi nei cani è costituito da adenocarcinomi.
- I test tiroidei nei gatti sono generalmente condotti allo scopo di diagnosticare ipertiroidismo, monitorare gli effetti del trattamento antitiroideo o del trattamento di sostituzione tiroidea in seguito a distruzione di tiroide neoplastica. Quando si valuta la T₄ totale nei gatti, è necessario tenere conto di età e malattie concomitanti. I valori T₄ sono più elevati nei gatti più giovani e tendono generalmente a diminuire con l'età. Nei gatti più anziani con sospetto ipertiroidismo, le malattie concomitanti – come per esempio l'insufficienza renale – causano una condizione nota come sindrome del malato eutiroideo che può deprimere i valori di T₄ totale. In questi casi, per confermare la diagnosi di ipertiroidismo si usa la determinazione della T₄ libera mediante dialisi di equilibrio (fT₄ED).

- Tre comuni condizioni richiedono la conferma mediante test fT4ED. Valori normalmente elevati di T₄ (3-5 mg/dL) in un gatto giovane, non associati a una marcata perdita di peso, sono normali. Valori elevati (>5 mg/dL) in un gatto anziano che manifesta segni di perdita di peso, sono generalmente indice diagnostico di ipertiroidismo. Valori normalmente elevati (3-5 mg/dL) in un gatto anziano, possono indicare ipertiroidismo. Poiché questi valori possono essere soppressi da una malattia concomitante, per diagnosticare questo ipertiroidismo occulto è necessario un test per l'ormone attivo (fT4ED).

T₄ diminuita

- Nei cani, la T₄ totale può essere usata per escludere una diagnosi di ipotiroidismo. Se la T₄ totale rientra nel range normale, l'ipotiroidismo nel cane è estremamente improbabile. Un valore T₄ basso o nel range basso della normalità, può essere indice - ma non conferma - di ipotiroidismo perché la T₄ è influenzata da fattori non tiroidei quali farmaci e malattie. Una diagnosi di ipotiroidismo nei cani può essere confermata con la determinazione della T₄ libera mediante dialisi di equilibrio (fT4ED).
- Altre cause di livelli diminuiti di T₄ possono essere associate a terapia farmacologica e sindrome del malato eutiroideo. Tra i vari farmaci, i glicocorticoidi sono quelli che più frequentemente hanno influenza clinica sui livelli T₄. Nella sindrome del malato eutiroideo, si riscontrano livelli diminuiti di T₄ con malattie non tiroidee quali insufficienza renale cronica e acuta, diabete mellito, insufficienza epatica e obesità.
- Eliminate la terapia farmacologica e la sindrome del malato eutiroideo, la causa più comune di livelli diminuiti di T₄ è l'ipotiroidismo primario. L'ipotiroidismo nei cani è il più delle volte causato da tiroidite linfocitica o atrofia idiopatica. Segni clinici di ipotiroidismo possono essere provocati da tumori tiroidei che hanno distrutto >75% della tiroide. Difetti congeniti dell'ipofisi, distruzione dell'ipofisi e soppressione dell'ipofisi possono causare ipotiroidismo secondario nei cani.
- L'ipotiroidismo spontaneo è raramente riscontrato nei gatti. Tra le cause comuni di ipotiroidismo nei gatti vi sono tiroidectomia bilaterale e sovradosaggi di iodio radioattivo o farmaci antitiroidei in gatti ipertiroidi.
- I pazienti ipotiroidei possono inoltre presentare concentrazioni elevate di colesterolo.
- Per ottenere una concentrazione basale accurata di T₄, al paziente non devono essere somministrati farmaci per alcuni giorni.

Ipercolesterolemia

- Una dieta ad alto contenuto di grassi o un campione di sangue raccolto poco dopo un pasto del paziente, possono causare ipercolesterolemia. L'ipercolesterolemia non è riscontrabile all'esame visivo del campione poiché non causa lipemia.
- Una riduzione nell'attività tiroidea causa una diminuzione nel catabolismo del colesterolo con conseguente aumento dei livelli di colesterolo. L'osservazione di un livello elevato di colesterolo in un profilo di screening può essere il primo indicatore di ipotiroidismo. Il colesterolo, allorché usato in combinazione con i livelli di T₄ libera, è un buon indicatore di ipotiroidismo canino.
- Una diagnosi preliminare di iperlipidemia può essere effettuata usando i livelli di colesterolo e l'indice lipemico stampato sulla scheda dei risultati VetScan. Concentrazioni di colesterolo > 300 mg/dL in combinazione con un indice lipemico 2+ o 3+, possono indicare iperlipidemia in cani a digiuno. L'iperlipidemia felina può essere diagnosticata quando in gatti a digiuno si osservano concentrazioni di colesterolo >200 mg/dL e un indice lipemico pari o superiore a 1+.
- I bassi livelli di colesterolo non sono di norma un problema. L'ipocolesterolemia è stata osservata in associazione a enteropatia proteino-disperdente, alcune epatopatie, determinate neoplasie maligne e malnutrizione grave. In caso di sospetta epatopatia, è necessario esaminare i risultati dei test di alanina aminotransferasi (ALT), albumina, fosfatasi alcalina (ALP), globuline, bilirubina totale e proteine totali. In casi di enteropatia proteino-disperdente e malnutrizione, è possibile osservare bassi livelli di proteine, albumina e globulina.

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. Non diluire il campione e rianalizzarlo con l'analizzatore di sangue intero VetScan.**
- 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.
- Il metodo T₄ Abaxis è sensibile a interferenze dall'autoanticorpo T₄. Raramente, quando in un campione è presente autoanticorpo T₄, i risultati T₄ sono bassi.

Avvertenza: Test su larga scala di 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 i risultati non rientrino nei range di riferimento definiti. Il campione può essere rianalizzato usando un rotore reagente nuovo.

11. Valori attesi

I range normali 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.

Prima del prelievo del campione, gli animali devono osservare un digiuno di 12 ore affinché le concentrazioni di colesterolo non siano influenzate da un pasto consumato di recente.

Tabella 1: Intervalli di riferimento nei cani e nei gatti

Analita	Cani	Gatti
Tiroxina (T₄)	1,1-4,0 ug/dL (14,2-52,0 nmol/L)	1,5-4,8 ug/dL (19,4-61,9 nmol/L)
Colesterolo	125-270 mg/dL (3,24-6,99 mmol/L)	90-205 mg/dL (2,33-5,31 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 del sistema VetScan). La tabella dei range dinamici di seguito fornita, rappresenta lo spettro rilevabile dal sistema VetScan.

Tabella 2: Range dinamici VetScan

Analita	Range dinamico	
	Unità comuni	Unità SI
Tiroxina (T₄)	0,5-8,0 ug/dL	6,5-103,2 nmol/L
Colesterolo	20-520 mg/dL	0,5-8,4 mmol/L

Precisione

Studi di precisione sono stati effettuati seguendo le linee guida NCCLS EP5-A⁸ con modifiche basate su NCCLS EP18-P⁹ per i dispositivi a utilizzo unitario. I risultati di precisione intra-sessione e totale sono stati determinati testando controlli bi-livello. I controlli sono stati analizzati in duplicato due volte al giorno per un periodo di una settimana.

Tabella 3: Precisione

Analita	Dimensioni del campione	Intra-sessione	Totale
Tiroxina (T₄) (ug/dL)	n=40		
<u>Controllo 1</u>			
Media		1,5	1,5
SD		0,15	0,19
%CV		9,6	12,5
<u>Controllo 2</u>			
Media		6,0	6,0
SD		0,32	0,33
%CV		5,3	5,4
Colesterolo (mg/dL)	n=40		
<u>Controllo 1</u>			
Media		155,5	155,5
SD		3,96	4,0
%CV		2,5	2,6
<u>Controllo 2</u>			
Media		313,4	313,4
SD		9,7	9,7
%CV		3,10	3,10

Correlazione

Studi sul campo sono stati condotti presso una clinica veterinaria universitaria. Per il dosaggio della tiroxina, sono stati analizzati campioni di siero utilizzando l'analizzatore di sangue intero VetScan e un metodo comparativo. La Tabella 4 riporta i dati di correlazione rappresentativi.

Tabella 4: Correlazione tra il sistema VetScan e metodi comparativi

Tiroxina (ug/dL)	Cani	Gatti
Coefficiente di correlazione (r)	0,96	0,96
Pendenza	0,82	0,94
Intercetta	0,16	0,10
Range campione	0,5-7,1	1,2-8,3
n	40	42
Colesterolo (mg/dL)	Cani	Gatti
Coefficiente di correlazione (r)	0,99	0,99
Pendenza	0,99	1,06
Intercetta	6	-3
Range campione	103-450	63-257
n	159	34

13. Bibliografia

1. Murphy BE, et al. Determinations of thyroxine utilizing the property of protein-binding. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964;24:187-196.
2. Chen I-W, et al. Thyroxine: In: LA Kaplan and AJ Pesce, eds., *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*, 2nd ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1989:956-959.
3. Kaplan LA, et al. Evaluation and comparison of radio-flourescence and enzyme-linked immunoassays for serum thyroxine. *Clin Biochem.* 1981;14:182-186.
4. Moller, et al. Isotope dilution-mass spectrometry of thyroxin proposed as a reference method. *Clin Chem.* 1983;29:2106-2110.
5. Norma, et al. Polarographic method for rapid micodetermination of cholesterol with cholesterol esterase and cholesterol oxidase. 1976; 22:336-340.
6. Allain, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. 1974; 20:472-475.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens; tentative standard.* NCCLS document H18-T. Villanova, PA: NCCLS, 1984.
8. 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.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Quality management for unit-use testing; proposed guideline.* NCCLS Document EP18-P. Wayne, PA: NCCLS, 1999.