

Esclusivamente per uso diagnostico
in vitro e professionale
Servizio clienti e assistenza tecnica: 1- 800-822-2947
Clienti al di fuori degli Stati Uniti: +49 6155 780 210

Applicabile esclusivamente ai clienti americani
Rinuncia CLIA: Per campioni di sangue intero utilizzare solo eparina di litio, Media complessità: Utilizzare solo sangue intero con eparina di litio, plasma con litio eparina o siero



Abaxis, Inc.
3240 Whipple Rd.
Union City, CA 94587
USA



ABAXIS Europe GmbH
Bunsenstr. 9-11
64347 Griesheim
Germany

1. Destinazione d'uso

Il Disco Reagente per Chimica generale 13 Piccolo®, da utilizzarsi con l'analizzatore chimico di sangue Piccolo o con l'analizzatore chimico Piccolo Xpress®, è progettato per l'accertamento in vitro delle quantità di alanina aminotransferasi (ALT), albumina, fosfatasi alcalina (ALP), amilasi, aspartato aminotransferasi (AST), calcio, creatinina, gamma glutamiltransferasi (GGT), glucosio, bilirubina totale, proteine totali, azoto ureico ematico (BUN) e acido urico in sangue intero eparinizzato, plasma eparinizzato o siero nel contesto di un laboratorio clinico o in un centro di assistenza sanitaria.

Solo per clienti negli USA

I test di questo pannello sono esenti dalle norme CLIA 88. Se un laboratorio modifica le istruzioni per il sistema di test, i test sono considerati di complessità elevata e soggetti a tutti i requisiti CLIA. In laboratori esenti dalle norme CLIA, è possibile testare solo sangue intero in litio eparina. In caso di impiego in laboratori a complessità moderata, è possibile usare sangue intero litio-eparinato, plasma litio-eparinato o siero.

Per eseguire test in esenzione dalle norme CLIA, è necessario un Certificato di esenzione CLIA. Il Certificato di esenzione può essere ottenuto dai Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS). Per assistenza ai fini dell'ottenimento del certificato, contattare la Commission on Laboratory Accreditation (COLA) al numero verde (negli Stati Uniti) 1-800-981-9883.

2. Sintesi e spiegazione degli esami clinici

Il Disco Reagente per Chimica Generale 13 Piccolo e l'analizzatore chimico di sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo Xpress costituiscono un sistema diagnostico *in vitro* che coadiuva il medico nella diagnosi delle seguenti patologie:

Alanina transaminasi (ALT):	Malattie epatiche, compresa epatite virale e cirrosi
Albumina:	Malattie epatiche e renali
Fosfatasi alcalina (ALP):	Malattie epatiche, ossee, paratiroidi e intestinali
Amilasi:	Pancreatite
Aspartato transaminasi (AST):	Malattie epatiche, compresa epatite e itterizia virale, shock
Calcio:	Malattie paratiroidi, ossee e renali croniche; tetanie
Creatinina:	Malattia renale e controllo della dialisi renale
Gamma glutamiltransferasi (GGT):	Malattie epatiche, compresa cirrosi alcolica e tumori del fegato primari e secondari
Glucosio:	Disturbi del metabolismo dei carboidrati, compresi diabete mellito degli adulti e giovanile; ipoglicemia
Bilirubina totale:	Affezioni epatiche, compresa epatite e ostruzione della cistifellea; itterizia
Proteine totali:	Malattie epatiche, renali e del midollo osseo; disturbi metabolici e alimentari
Azoto ureico ematico (BUN):	Malattie renali e metaboliche
Acido urico:	Disturbi renali e metabolici, compresa insufficienza renale e gotta

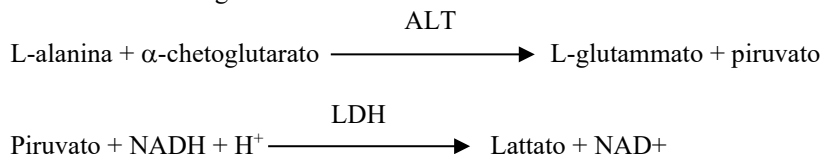
Come per ogni esame clinico diagnostico, prima della diagnosi definitiva si dovranno considerare tutti gli altri esami compreso lo stato clinico del paziente.

3. Principi del test

Alanina transaminasi (ALT)

L'alanina transaminasi (ALT) è stata misurata con tre metodologie. Due di questi metodi - la tecnica di accoppiamento colorimetrica alla dinitrofenilidrazina^{1,2} e l'analisi enzimatica fluorescente - sono usati di rado.³ Un metodo enzimatico basato sul lavoro di Wróblewski e LaDue⁴ è la tecnica più diffusa per determinare le concentrazioni di ALT nel siero. È stata proposta una procedura Wróblewski e LaDue modificata come procedura raccomandata dall'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).⁵

Il metodo messo a punto per l'utilizzo con l'analizzatore Piccolo è una variante della procedura raccomandata dalla IFCC. In questa reazione, la ALT catalizza il trasferimento di un gruppo ammidico da L-alanina a α -chetoglutarato formando L-glutammato e piruvato. La lattato deidrogenasi catalizza la trasformazione del piruvato in lattato. Allo stesso tempo, l'NADH viene ossidato in NAD^+ , come illustrato nel seguente schema di reazione.

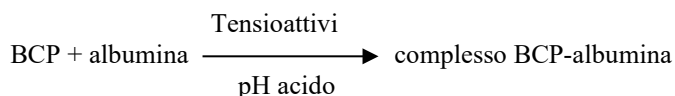


Il tasso di variazione nella differenza di assorbanza tra 340 nm e 405 nm è causato dalla trasformazione di NADH in NAD^+ ed è direttamente proporzionale alla quantità di ALT presente nel campione.

Albumina (ALB)

Tra i primi metodi usati per misurare l'albumina ricordiamo le tecniche di frazionamento^{6,7,8} e il contenuto di triptofano delle globuline.^{9,10} Tali metodi sono poco pratici nell'esecuzione e non presentano un elevato grado di specificità. Due tecniche immunochimiche sono considerate metodi di riferimento, ma sono costose e richiedono molto tempo.¹¹ Le tecniche basate sul legame con coloranti sono le più usate per la misurazione dell'albumina. Il verde di bromocresolo (BCG) è il più diffuso fra i metodi basati su legame con colorante, ma può dare una concentrazione di albumina superiore a quella effettiva, soprattutto in prossimità dei valori normali più bassi.¹² Il violetto di bromocresolo (BCP) è il più specifico dei coloranti in uso.^{13,14}

Il violetto di bromocresolo (BCP), legato con l'albumina, cambia colore da giallo a blu. L'assorbanza massima si modifica con il cambiamento di colore.

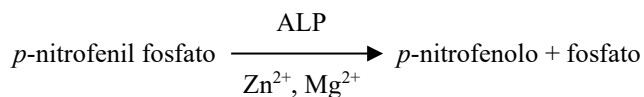


L'albumina legata è proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione. Si tratta di una reazione di punto finale, misurata come differenza di assorbanza tra 600 nm e 550 nm.

Fosfatasi alcalina (ALP)

Le prime tecniche per la misurazione della fosfatasi alcalina sono state messe a punto oltre 60 anni fa. Diversi di questi metodi spettrofotometrici di punto finale o a due punti^{15,16} sono oggi considerati antiquati o troppo complessi. L'uso di *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) aumenta la velocità della reazione.^{17,18} L'affidabilità di questa tecnica è stata molto rafforzata mediante l'uso di una sostanza tampone con ioni metallo per mantenere la concentrazione di ioni magnesio e zinco nella reazione.¹⁹ Il metodo di riferimento dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC)²⁰ è basato sull'uso di *p*-NPP come substrato e una sostanza tampone con ioni metallo.

La procedura Piccolo è una variante dei metodi AACC e IFCC²¹. La fosfatasi alcalina idrolizza *p*-NPP in una sostanza tampone con ioni metallo formando *p*-nitrofenolo e fosfato.

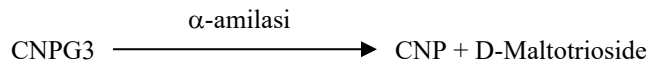


La quantità di ALP nel campione è proporzionale al tasso di aumento nella differenza di assorbanza tra 405 nm e 500 nm.

Amilasi (AMY)

Sono stati messi a punto circa 200 diversi test per misurare l'amilasi. La maggior parte delle procedure si basa su una soluzione tamponata di polisaccaridi, ma le tecniche di rilevazione utilizzate sono diverse. I metodi viscosimetrici difettano in precisione ed esattezza²², mentre i metodi turbidimetrici e iodometrici sono difficili da standardizzare.^{23,24} Piuttosto diffusi sono i metodi saccarogenici e cromolitici. La tecnica "classica" di rilevamento dell'amilasi consiste in un metodo saccarogenico²⁵, che però è complesso e lungo da eseguire.²⁶ Sono stati recentemente messi a punto metodi basati sulle *p*-nitrofenilglicosidi utilizzate come substrati.²⁷ Tali analisi hanno una maggiore specificità per l'amilasi pancreatica che per l'amilasi salivare, e possono essere monitorate facilmente.²⁷

Nel metodo Piccolo il substrato, 2-cloro-*p*-nitrofenil- α -D-maltotrioside (CNP3), reagisce con l' α -amilasi nel campione prelevato dal paziente, rilasciando 2-cloro-*p*-nitrofenolo (CNP). Il rilascio di CNP dà luogo a un cambiamento di colore.

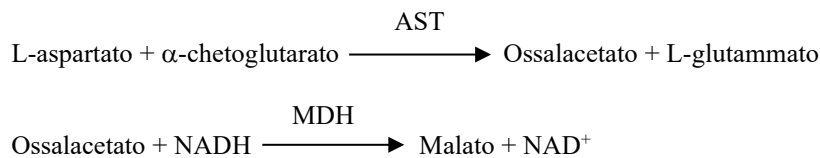


La reazione viene misurata bicromaticamente a 405 nm e 500 nm. La variazione di assorbanza causata dalla formazione di CNP è direttamente proporzionale all'attività dell' α -amilasi nel campione.

Aspartato transaminasi (AST)

Il test per l'aspartato transaminasi (AST) si basa sul metodo di Karmen²⁸ con le modifiche introdotte da Bergmeyer.²⁹ L'attuale metodo di riferimento dell'International Federation of Clinical Chemistry (Federazione Internazionale di Chimica Clinica - IFCC) si basa sulla tecnica Karmen/Bergmeyer di associazione della malato deidrogenasi (MDH) e della nicotinammide dinucleotide ridotta (NADH) per il rilevamento di AST nel siero.^{29,30} Alla reazione si aggiunge lattato deidrogenasi (LDH) per ridurre l'interferenza causata dal piruvato endogeno.

L'AST catalizza la reazione dell'L-aspartato e dell' α -chetoglutarato in ossalacetato e L-glutammato. L'ossalacetato viene trasformato in malato e l'NADH viene ossidato in NAD⁺ dal catalizzatore MDH.

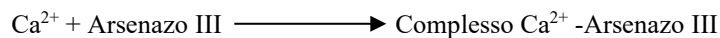


Il tasso di cambiamento nell'assorbanza a 340 nm/405 nm causata dalla trasformazione dell'NADH in NAD⁺ è direttamente proporzionale alla quantità di AST presente nel campione.

Calcio (CA)

I primi metodi utilizzati per analizzare il calcio si basavano sulla precipitazione del calcio con un eccesso di anioni.^{31,32,33} I metodi di precipitazione sono complessi e spesso imprecisi. Il metodo di riferimento per il calcio è la spettroscopia ad assorbimento atomico; tale metodo, tuttavia, non è adatto ad analisi di routine.³⁴ I metodi più diffusi sono quelli spettrometrici che utilizzano indicatori metallocromici a base di *o*-cresolfaleina complexone o arsenazo III.^{35,36,37} L'arsenazo III presenta un'elevata affinità per il calcio e non è dipendente dalla temperatura come il CPC.

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

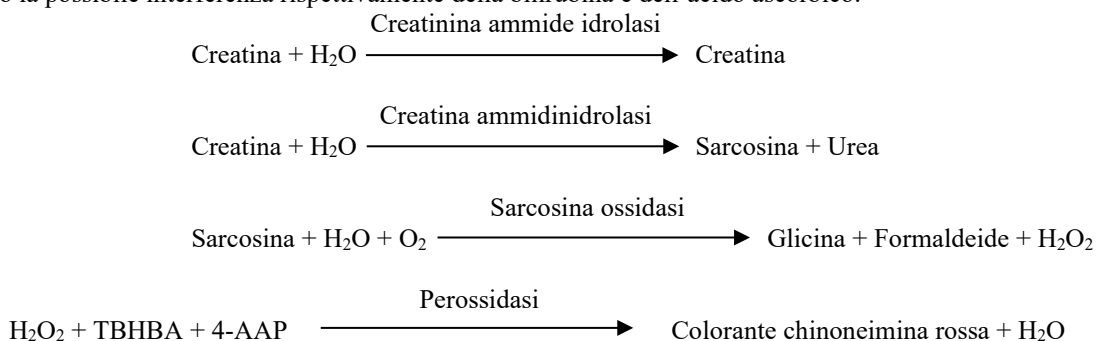


La reazione di punto finale viene controllata a 405 nm, 467 nm e 600 nm. La quantità di calcio nel campione è proporzionale all'assorbanza.

Creatinina (CRE)

Il metodo Jaffe, introdotto per la prima volta nel 1886, è tuttora comunemente usato per determinare i livelli di creatinina nel sangue. L'attuale metodo di riferimento abbina l'uso di Terra di Fuller (floridina) e la tecnica Jaffe per incrementare la specificità della reazione.^{38,39} Sono stati messi a punto metodi enzimatici che risultano più specifici per la creatinina di quanto non lo siano le diverse varianti della tecnica Jaffe.^{40,41,42} Nei metodi basati sull'enzima creatinina amidolasi si elimina il problema dell'interferenza dello ione ammonio che si riscontra invece nelle tecniche che utilizzano creatinina immino idrolasi.⁴³

Nelle reazioni ad enzimi accoppiati, la creatinina amide idrolasi idrolizza la creatinina in creatina. Un secondo enzima, la creatina amidin idrolasi, catalizza la formazione di sarcosina dalla creatina. La sarcosina ossidasi dà luogo all'ossidazione della sarcosina in glicina, formaldeide e perossido di idrogeno (H₂O₂). In un completamento Trinder, la perossidasi catalizza la reazione tra perossido di idrogeno, acido 2,4,6-tribromo-3-idrossibenzoico (TBHBA) e 4-amminoantipirina (4-AAAP) in un colorante rosso chinoneimina. Alla miscela di reazione vengono aggiunti ferrocianuro di potassio e ascorbato ossidasi per ridurre al minimo la possibile interferenza rispettivamente della bilirubina e dell'acido ascorbico.



Vengono utilizzate due provette per determinare la concentrazione di creatinina presente nel campione. La creatina endogena viene misurata nella provetta bianco, che viene sottratta dall'insieme di creatina endogena e creatina formata dalle reazioni enzimatiche nella provetta test. Una volta eliminata la creatina endogena dai calcoli, la concentrazione di creatinina è proporzionale all'intensità del colore rosso prodotto. Per misurare la reazione al punto finale si prende la differenza di assorbanza tra 550 nm e 630 nm.

eGFR (calcolato)

La creatinina sierica viene misurata di routine come indicatore delle funzioni renali. Poiché la creatinina varia in funzione dell'età, del sesso e dell'etnicità, è possibile che la sola creatinina sierica non permetta di rilevare l'insufficienza renale cronica (IRC). Pertanto, il National Kidney Disease Education Program consiglia caldamente ai laboratori di valutare il tasso di filtrazione glomerulare stimato (eGFR) quando misurano la creatinina sierica in pazienti maggiorenni. La refertazione di routine del eGFR stimato con tutte le determinazioni di creatinina sierica permette ai laboratori di aiutare a identificare i soggetti con ridotte funzioni renali, agevolando la diagnosi di IRC. Generalmente, valori calcolati di eGFR <60 ml/min sono associati a un aumentato rischio di insufficienza renale cronica con esiti avversi.

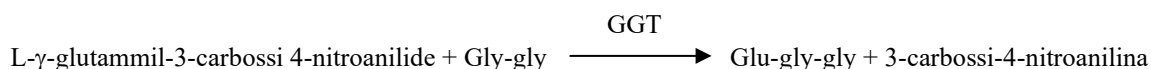
Il calcolo del eGFR stimato viene effettuato dal dispositivo Piccolo in base all'età, al sesso e all'etnicità del paziente. Il metodo Piccolo della creatinina è basato sul metodo di riferimento IDMS della creatinina, in modo che possa essere usata la seguente formula dell'equazione MDRD per il calcolo del eGFR stimato.

$$\text{GFR (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 175 \times (\text{S}_{\text{cr}})^{-1.154} \times (\text{età})^{-0.203} \times (0,742 \text{ per le donne}) \times (1,212 \text{ per i neri d'America})$$

Gamma glutammiltransferasi (GGT)

I primi metodi quantitativi sviluppati per misurare la gamma glutammiltransferasi (GGT) comportavano una seconda reazione per formare un colorante azoico che si combinava con un cromoforo.^{44,45} Passando alla L-γ-glutammil-p-nitroanilide come substrato della reazione, si è eliminata la fase della formazione di colorante.⁴⁶ Data la scarsa solubilità e stabilità della L-γ-glutammil-p-nitroanilide, la procedura è stata modificata con l'uso del substrato L-γ-glutammil-3-carbossi-4-nitroanilide.⁴⁷ Il metodo per la GGT raccomandato dall'IFCC si basa su quest'ultimo substrato, mentre l'altro substrato indicato è la glicilglicina.⁴⁸

Abaxis ha modificato il metodo IFCC in modo che la reazione avvenga a 37°C. L'aggiunta di campione contenente gamma glutammiltransferasi ai substrati L-γ-glutammil-3-carbossi-4-nitroanilide e glicilglicina (gly-gly) dà luogo alla formazione di L-γ-glutammil-glicilglicina (glu-gly-gly) e 3-carbossi-4-nitroanilina.



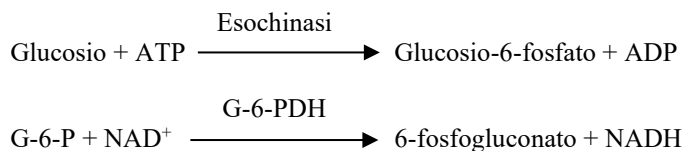
L'assorbanza di questa reazione nel tempo è misurata a 405 nm. La produzione di 3-carbossi-4-nitroanilina è direttamente proporzionale all'attività della GGT presente nel campione.

Glucosio (GLU)

Le prime misurazioni della concentrazione di glucosio furono effettuate con metodi basati sulla riduzione in rame (ad esempio Folin-Wu⁴⁹ e Somogyi-Nelson^{50,51}). A causa della mancanza di specificità delle tecniche di riduzione in rame, sono state messe a punto procedure quantitative utilizzando gli enzimi esochinasi e glucosio ossidasi. Il test del glucosio inserito nel disco reagente

per chimica generale 13 Piccolo è una variante del metodo dell'esochinasi, che è stato proposto come base del metodo di riferimento per il glucosio.⁵²

La reazione del glucosio con l'adenosina trifosfato (ATP), catalizzata dalla 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 della nicotinammide adenin dinucleotide (NAD⁺) in NADH.

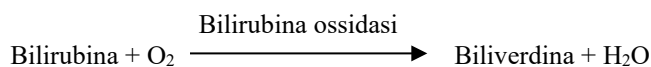


L'assorbanza viene misurata bicompativamente a 340 nm e 850 nm. La produzione di NADH è direttamente proporzionale alla quantità di glucosio presente nel campione.

Bilirubina totale (TBIL)

I livelli di bilirubina totale vengono di solito rilevati con test a base di acido solfanilico diazotato.^{53,54} È stato messo a punto un metodo nuovo e più specifico basato sull'enzima bilirubina ossidasi.^{55,56,57} Oltre a utilizzare il metodo di rilevazione della bilirubina totale più specifico, l'Analizzatore Piccolo(r) consente di ridurre al minimo il deterioramento da luce dell'analita in quanto il campione si può analizzare subito dopo il prelievo.

Nella procedura enzimatica, la bilirubina viene ossidata in biliverdina dalla bilirubina ossidasi.

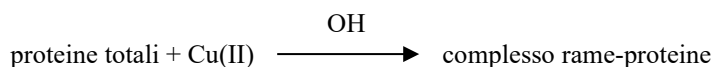


La bilirubina viene misurata come differenza di assorbanza tra 467 nm e 550 nm. L'assorbanza iniziale di questa reazione di punto finale viene ricavata in base alla provetta di campione bianco per la bilirubina e l'assorbanza finale si ottiene dalla provetta di campione test per la bilirubina. La quantità di bilirubina presente nel campione è proporzionale alla differenza tra le misure dell'assorbanza iniziale e finale.

Proteine totali (TP)

Il metodo per le proteine totali è una variante della reazione con biureto, di cui è nota la precisione, accuratezza e specificità.⁵⁸ La procedura fu inizialmente messa a punto da Riegler⁵⁹ e successivamente modificata da Weichselbaum⁶⁰, Doumas, et al.⁶¹ hanno proposto la reazione con biureto come possibile metodo di riferimento per le proteine totali.

Nella reazione con biureto la soluzione proteinica viene trattata con ioni rame [Cu(II)] in un mezzo fortemente alcalino. Vengono aggiunti tartrato di sodio potassio e ioduro di potassio per prevenire rispettivamente la precipitazione dell'idrossido di rame e l'autoriduzione del rame.⁶⁰ Gli ioni Cu(II) reagiscono con i legami peptidici tra l'ossigeno carbonile e gli atomi di azoto ammidici formando un complesso rame-proteine colorato.

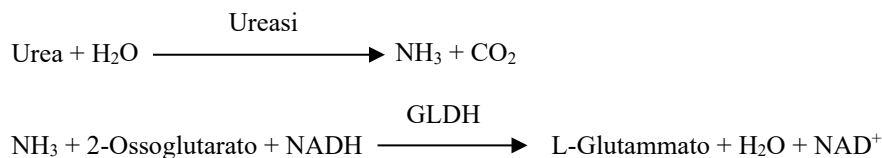


La quantità di proteine totali presente nel campione è direttamente proporzionale all'assorbanza del complesso Cu-proteine. Il test per le proteine totali è una reazione di punto finale e l'assorbanza si misura come differenza dell'assorbanza tra 550 nm e 850 nm.

Azoto ureico ematico (BUN)

È possibile misurare l'urea sia direttamente che indirettamente. La reazione al diacetil monossime, unico metodo diretto per misurare l'urea, è ampiamente usata ma si basa su reagenti pericolosi.⁶² I metodi indiretti misurano l'ammoniaca formatasi dall'urea; l'uso dell'enzima ureasi ha aumentato la specificità di questi test.⁶³ L'ammoniaca si può quantificare con svariati metodi, tra i quali la nesslerizzazione (titolazione acida), la tecnica Berthelot^{64,65} e le reazioni enzimatiche accoppiate.^{66,67} Le procedure Berthelot catalizzate però risultano poco affidabili nel misurare l'ammoniaca.⁶⁸ Le reazioni enzimatiche accoppiate sono rapide, altamente specifiche per l'ammoniaca e ampiamente usate. Una di tali reazioni è stata proposta come possibile metodo di riferimento.⁶⁹

Nella reazione enzimatica accoppiata, l'ureasi idrolizza l'urea in ammoniaca e anidride carbonica. Combinando l'ammoniaca con 2-ossoglutarato e nicotinammide adenin dinucleotide (NADH) ridotta, l'enzima glutammato deidrogenasi (GLDH) ossida l'NADH in NAD⁺.

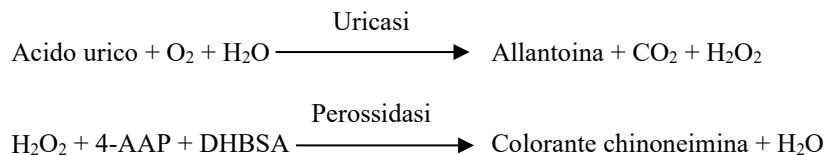


La velocità di variazione della differenza di assorbanza tra 340 nm e 405 nm è causata dalla trasformazione di NADH in NAD⁺ ed è direttamente proporzionale alla quantità di urea presente nel campione.

Acido urico (UA)

I primi metodi per la rilevazione quantitativa delle concentrazioni di acido urico nel sangue si basavano sulla riduzione dell'acido fosfotungstico in blu di tungsteno nelle soluzioni alcaline di acido urico.^{70,71} È stato in seguito messo a punto un test per l'acido urico avente maggiore specificità, basato sull'enzima specifico uricasi. Tale metodo è diventato la tecnica chimica clinica standard per l'acido urico.⁷²

Il metodo all'uricasi è accoppiato con completamento Trinder alla perossidasi.⁷³ In tale metodo, l'uricasi catalizza l'ossidazione dell'acido urico in allantoina e perossido di idrogeno. La perossidasi catalizza la reazione tra perossido di idrogeno (H₂O₂), 4-amminoantipirina (4-AAP) e acido 3,5-dicloro-2-idrossibenzenesolfonico (DHBSA) in colorante chinoneimina rosso. Alla miscela di reazione vengono aggiunti ferrocianuro di sodio e ascorbato ossidasi per ridurre al minimo la possibilità di interferenza della bilirubina e dell'acido ascorbico.



La quantità di acido urico nel campione è direttamente proporzionale all'assorbanza del colorante chinoneimina. L'assorbanza finale di questa reazione di punto finale viene misurata bicromaticamente a 500 nm e 600 nm.

4. Principi della procedura

Per i principi e i limiti della procedura, vedere il Manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress.

5. Descrizione dei reagenti

Reagenti

Ogni Disco Reagente per Chimica Generale 13 Piccolo contiene microsfere secche di reagente specifico per il test (come descritto di seguito). In ogni disco è compreso un campione bianco-reagente secco (costituito da sostanza tampone, tensioattivi, eccipienti e conservanti) utilizzato per calcolare le concentrazioni di alanina transaminasi (ALT), albumina (ALB), fosfatasi alcalina (ALP), amilasi (AMY), aspartato aminotransferasi (AST), calcio (CA), gamma glutamiltransferasi (GGT), glucosio (GLU), azoto ureico (BUN) e acido urico (UA). Sono inoltre compresi nel disco campioni bianco-reagenti dedicati per creatinina (CRE), bilirubina totale (TBIL) e proteine totali (TP). Ogni disco contiene anche un diluente composto da tensioattivi, eccipienti e conservanti.

Tabella 1: Reagenti

Componente	Quantità/Disco
Adenosina-5-difosfato	4 µg
Adenosina-5-trifosfato	11 µg
L-alanina	874 µg
4-amminoantipirina-HCl (4-AAP)	20 µg
Arsenazo III, sale sodico	3 µg
Ascorbato ossidasi (<i>Cucurbita spp.</i>)	0,5 U
Acido L-aspartico	426 µg
Bilirubina ossidasi	0,1 U
Violetto di bromocresolo	2 µg
2-Cloro- <i>p</i> -nitrofenil- α -D-maltotriossido (NPG3)	40 µg
Creatina amidinoidrolasi (<i>Actinobacillus spp.</i>)	2 U
Creatinina ammididrolasi (<i>Pseudomonas spp.</i>)	1 U
Solfato di rame	134 µg
Acido 3,5-dicloro-2-idrossibenzenesolfonico (DHBSA)	37 µg
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (lievito)	0,05 U
Acido L-glutammico deidrogenasi (fegato di bue)	0,01 U
Acido L-glutammico γ -(3-carbossi-4-nitroanilide), sale d'ammonio	30 µg
Glicilglicina	317 µg
Esochinasi (lievito)	0,1 U
α -chetoglutarato, sale disodico	28 µg
Acido α -chetoglutarico	72 µg
Lattato deidrogenasi (cuore di pollo)	0,002 U
Lattato deidrogenasi (LDH) (microbica)	0,03 U
Lattato deidrogenasi (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	0,1 U
Acetato di magnesio	7 µg
Cloruro di magnesio	3 µg
Malicodeidrogenasi (MDH) (cuore di maiale)	0,01 U
Nicotinammide adenin dinucleotide (NAD ⁺)	20 µg
Nicotinammide adenin dinucleotide, ridotta (NADH)	18 µg
Perossidasi (barbaforte)	0,8 U
<i>p</i> -Nitrofenil fosfato (<i>p</i> -NPP)	56 µg
Ferrocianuro di potassio	0,4 µg
Ioduro di potassio	56 µg
Sarcosina ossidasi (microorganismo)	0,6 U
Ferrocianuro di sodio	1 µg
Tartrato di sodio potassio	686 µg
Acido 2,4,6-Tribromo-3-idrossibenzoico	188 µg
Ureasi (jack bean)	0,05 U
Uricasi (microbica)	0,04 U
Solfato di zinco	3 µg
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 organici umani. Manipolare e smaltire i dischi usati in conformità a prassi di laboratorio riconosciute.⁷⁴ Consultare il Manuale dell'operatore dell'Analizzatore chimico di sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress per istruzioni sulla pulizia e rimozione di sostanze a rischio biologico inavvertitamente versate.

- 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.
- I granuli 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

Allorché prelevati dal frigorifero, i dischi reagente possono essere utilizzati direttamente, senza essere riscaldati. Non lasciare i dischi a temperatura ambiente per oltre 48 ore prima dell'uso. Aprire la confezione in carta alluminio sigillata, estrarre il disco facendo attenzione a non toccare il codice a barre situato sulla parte superiore del disco. Seguire le istruzioni contenute nel Manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress. Smaltire un disco nel caso in cui non venga utilizzato entro 20 minuti dall'apertura della confezione.

Conservazione

Conservare i dischi reagente nelle confezioni sigillate a 2–8 °C (36–46 °F). Non esporre i dischi, aperti o ancora sigillati, a luce solare diretta o temperature superiori a 32 °C (90 °F). I dischi reagente possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. La data di scadenza è codificata anche nel codice a barre stampato sull'apposito anello. In caso di reagenti scaduti, sul display dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress viene visualizzato un messaggio di errore.

Segni di instabilità o deterioramento del disco reagente

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

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

7. Prelievo e preparazione dei campioni

Le tecniche di raccolta dei campioni sono descritte nella sezione "Raccolta dei campioni" del Manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress.

- 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 la provetta di prelievo; tale manovra potrebbe causare emolisi.
- I campioni di sangue intero prelevati per puntura di una vena si devono sottoporre a test entro 60 minuti dal prelievo.⁷⁵ Le concentrazioni di **glucosio** sono soggette a variazioni in funzione del tempo trascorso da quando il paziente ha ingerito cibo e del tipo di campione prelevato dal paziente. Per interpretare in modo corretto i risultati relativi al glucosio, i campioni si devono prelevare da pazienti a digiuno da almeno 12 ore. Le concentrazioni di glucosio diminuiscono di circa 5-12 mg/dl in 1 ora se lasciate in campioni non centrifugati a temperatura ambiente.⁷⁶
- Nei campioni di sangue intero refrigerati le concentrazioni di **aspartato transaminasi, creatinina e glucosio** possono subire variazioni significative.⁷⁷ 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.
- I risultati relativi alla **bilirubina totale** possono subire deterioramento da luce.⁷⁸ I campioni di sangue intero non analizzati immediatamente si devono conservare al buio per non oltre 60 minuti. Qualora il campione non possa essere analizzato entro tale arco di tempo, si dovrà suddividere in plasma o siero e conservare al buio a bassa temperatura in una provetta con tappo.⁷⁹
- Utilizzare solo provette da prelievo evacuate all'eparina di litio (tappo verde) per i campioni di sangue intero o di plasma. Utilizzare provette da prelievo evacuate senza additivo (tappo rosso) o provette per separazione del siero (tappo rosso o rosso/nero) per i campioni di siero.

- Iniziare il test non oltre 10 minuti dopo aver trasferito il campione nel disco reagente.

8. Procedura

Materiale in dotazione

- Un disco reagente Piccolo per chimica generale 13 PN: 400-1029 (una scatola di dischi PN: 400-0029)

Materiale necessario ma non in dotazione

- Analizzatore chimico di sangue Piccolo o analizzatore chimico Piccolo Xpress
- Ogni analizzatore chimico di sangue Piccolo o analizzatore chimico Piccolo Xpress è corredato di pipette di trasferimento del campione (volume fisso di circa 100 µL) e puntali, riordinabili direttamente ad Abaxis.
- Reagenti di controllo reperibili in commercio raccomandati da Abaxis (per i valori attesi e i materiali di controllo approvati, rivolgersi all'assistenza tecnica Abaxis).
- Cronometro

Parametri del test

L'analizzatore chimico di sangue Piccolo e l'analizzatore chimico Piccolo Xpress funzionano a temperature ambiente comprese tra 15°C e 32°C (59-90°F). Il tempo di analisi per ogni Disco Reagente per Chimica Generale 13 Piccolo è inferiore a 14 minuti. Durante l'intervallo di misurazione, l'analizzatore mantiene il disco 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 dell'operatore dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo e dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress.

Taratura

L'analizzatore chimico di sangue Piccolo e l'analizzatore chimico Piccolo Xpress vengono calibrati dal produttore prima della spedizione. Il codice a barre stampato sull'apposito anello fornisce i dati di calibrazione specifici per i dischi. Vedere il Manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo e 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 di sangue Piccolo e l'analizzatore chimico Piccolo Xpress calcolano e stampano automaticamente le concentrazioni di analiti nel campione. I dettagli dei calcoli delle reazioni di endpoint e velocità sono riportati nel Manuale dell'operatore dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo e 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 di sangue Piccolo e dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress.

- L'unico anticoagulante **raccomandato per l'uso** con l'analizzatore chimico di sangue Piccolo e l'analizzatore chimico Piccolo Xpress è la **litio eparina**. Non utilizzare sodio eparina.
- Abaxis ha condotto studi che dimostrano come l'EDTA, il fluoruro, l'ossalato e qualsiasi anticoagulante contenente ioni ammonio interferisce con almeno uno dei complessi chimici contenuti nel Disco Reagente per Chimica Generale 13 Piccolo.
- I campioni con ematocriti superiori al 62-65% del volume di globuli rossi concentrati (una frazione di volume di 0,62-0,65) possono dare luogo a risultati imprecisi. I campioni con ematocriti elevati possono essere refertati come emolizzati. Tali campioni si possono centrifugare per ottenere plasma e poi rianalizzare in un nuovo disco reagente.
- **I campioni che per un particolare test fornissero risultati superiori al range di analisi, 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 chimico di sangue Piccolo o l'analizzatore chimico Piccolo Xpress.**

Avvertenza: Test su larga scala dell'analizzatore chimico di sangue Piccolo o dell'analizzatore chimico Piccolo Xpress hanno dimostrato che in rarissimi casi il campione dispensato nel disco 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. Il campione può essere rianalizzato usando un nuovo disco reagente.

Interferenza

Diverse sostanze sono state testate come interferenti con gli analiti. Sono stati preparati gruppi di siero umano. Ogni potenziale interferente è stato analizzato alla concentrazione indicata in NCCLS EP7-P.⁸⁰

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.
- L'analizzatore chimico di sangue Piccolo e l'analizzatore chimico Piccolo Xpress eliminano 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).
- Per i livelli massimi di sostanze endogene, rivolgersi all'assistenza tecnica Abaxis.

Effetti delle sostanze esogene e terapeutiche

- Sono state selezionate trentacinque sostanze esogene e terapeutiche in quanto potenziali interferenti con i metodi di analisi Abaxis, secondo le raccomandazioni di Young.⁸¹ 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 esogene e terapeutiche

	Valori fisiologici o Intervallo di valori terapeutici ⁸⁰⁻⁸⁵ (mg/dl)	Massima concentrazione analizzata (mg/dl)
Acetamminofene	1-2	100
Acetoacetato	0,05-3,60	102
Acido acetilsalicilico	2-10	50
Ampicillina	0,5	30
Acido ascorbico	0,8-1,2	20
Caffeina	0,3-1,5	10
Cloruro di calcio	—	20
Cefalotina (Keflin)	10	400
Cloramfenicolo	1-2,5	100
Cimetidina	0,1-1	16
L-dopa	—	5
Dopamina	—	19
Epinefrina	—	1
Eritromicina	0,2-2,0	10
Glutazione	—	30
Ibuprofene	0,5-4,2	50
Isoniazide	0,1-0,7	4
α -chetoglutarato	—	5
Chetoprofene	—	50
Meticillina	—	100
Metotrexate	0,1	0,5
Metildopa	0,1-0,5	0,5
Metronidazolo	0,1	5
Nafcillina	—	1
Nitrofurantoina	0,2	20
Oxacillina	—	1
Ossalacetato	—	132
Fenitoina	1-2	3
Prolina	—	4
Piruvato	0,3-0,9	44
Rifampina	0,4-3	1,5
Acido salicilico	15-30	25
Sulfalazina	2-4	10
Sulfanilamide	10-15	50
Teofillina	1-2	20

- Le sostanze elencate di seguito sono risultate avere interferenza superiore al 10 %. Un'interferenza significativa è definita come spostamento >10 % nel risultato di un campione con 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 3: Sostanze con interferenza significativa >10 %

	fisiologica/ conterapeutica intervallo ⁸⁰⁻⁸⁵ (mg/dl)	% Concentrazione Interferenza > 10 % (mg/dl)	Interferenza
Alanina transaminasi (ALT)			
Acido ascorbico	0,8-1,2	20	aum 11%*
Ossalacetato	—	132	aum 843%
Albumina (ALB)			
Acetoacetato	0,05-3,60	102	dim 18%*
Ampicillina	0,5	30	dim 12%
Caffeina	0,3-1,5	10	dim 14%
Cloruro di calcio	—	20	dim 17%
Cefalotina (Keflin)	10	400	aum 13%
Ibuprofene	0,5-4,2	50	aum 28%
α-chetoglutarato	—	5	dim 11%
Nitrofurantoina	0,2	20	dim 13%
Prolina	—	4	aum 12%
Sulfalazina	2-4	10	dim 14%
Sulfanilamide	10-15	50	dim 12%
Teofillina	1-2	20	dim 11%
Fosfatasi alcalina (ALP)			
Teofillina	1-2	20	dim 42%
Creatinina (CRE)			
Acido ascorbico	0,8-1,2	20	dim 11%
Dopamina	—	19	dim 80%
L-dopa	—	5	dim 71%
Epinefrina	—	1	dim 45%
Glutazione	—	30	dim 13%
Glucosio (GLU)			
Ossalacetato	—	132	dim 11%
Piruvato	0,3-0,9	44	dim 13%
Bilirubina totale (TBIL)			
Dopamina	—	19	dim 55%
L-dopa	—	5	dim 17%
Acido urico			
Acido ascorbico	0,8-1,2	20	dim 13%
Epinefrina	—	1	dim 14%
L-dopa	—	5	dim 78%
Metildopa	0,1-0,5	0,5	dim 12%
Rifampina	0,4-3	1,5	dim 14%
Acido salicilico	15-30	25	dim 20%

* aum = aumentato; dim = diminuito.

Per ulteriori informazioni sui possibili interferenti chimici, si consulti la Bibliografia.

11. Valori previsti

Per determinare i valori di riferimento relativi ad ALT, albumina, ALP, amilasi, creatinina, glucosio, bilirubina totale, proteine totali e BUN sono stati utilizzati campioni prelevati da un totale di 193 adulti maschi e femmine, analizzati con l'analizzatore chimico di sangue Piccolo. Per determinare i valori di riferimento relativi all'ASTe acido urico, sono stati utilizzati campioni prelevati da un totale di 186 adulti maschi e femmine. Per determinare i valori di riferimento relativi alla GGT, sono stati utilizzati campioni prelevati da un totale di 131 adulti maschi e femmine. Questi valori devono intendersi esclusivamente come orientativi. Si consiglia allo studio o alla struttura di definire valori minimi e massimi normali per la propria popolazione di pazienti.

Tabella 4: Intervalli di riferimento

Analita	Unità comuni	Unità SI
Alanina transaminasi (ALT)	10 – 47 U/l	10 – 47 U/l
Albumina (ALB)	3,3 – 5,5 g/dl	33 – 55 g/l
Fosfatasi alcalina (ALP)		
Femmina	42 – 141 U/l	42 – 141 U/l
Maschio	53 – 128 U/l	53 – 128 U/l
Amilasi (AMY)	14 – 97 U/l	14 – 97 U/l
Aspartato transaminasi (AST)	11-38 U/l	11-38 U/l
Calcio (CA)	8,0 – 10,3 mg/dl	2,0 – 2,58 mmol/l
Creatinina (CRE)	0,6 – 1,2 mg/dl	53 – 106 µmol/l
Gamma glutammiltransferasi (GGT)	5 – 65 U/l	5 – 65 U/l
Glucosio (GLU)	73 – 118 mg/dl	4,05 – 6,55 mmol/l
Bilirubina totale (TBIL)	0,2 – 1,6 mg/dl	3,4 – 27,4 µmol/l
Proteine totali (TP)	6,4 – 8,1 g/dl	64 – 81 g/l
Azoto ureico ematico (BUN)	7 – 22 mg/dl	2,5 – 7,9 mmol/urea/l
Acido urico (UA)		
Femmina	2,2 – 6,6 mg/dl	0,13 – 0,39 mmol/l
Maschio	3,6 – 8,0 mg/dl	0,21 – 0,47 mmol/l

12. Caratteristiche prestazionali

Linearità

La determinazione chimica per ciascun analita è lineare per il range dinamico sottoelencato se l'Analizzatore chimico per sangue Piccolo o Piccolo Xpress è utilizzato seguendo la procedura raccomandata (cfr. il Manuale dell'operatore dell'Analizzatore chimico per sangue Piccolo o Piccolo Xpress).

Tabella 5: Valori dinamici Piccolo

Analita	Unità comuni	Unità SI
Alanina transaminasi (ALT)	5-2000 U/l	5-2000 U/l
Albumina (ALB)	1-6,5 g/dl	10-65 g/l
Fosfatasi alcalina (ALP)	5-2400 U/l	5-2400 U/l
Amilasi (AMY)	5-4000 U/l	5-4000 U/l
Aspartato transaminasi (AST)	5-2000 U/l	5-2000 U/l
Calcio	4,0-16,0 mg/dl	1,0-4,0 mmol/l
Creatinina	0,2-20 mg/dl	18-1,768 µmol/l
Gamma glutammiltransferasi (GGT)	5-3000 U/l	5-3000 U/l
Glucosio	10-700 mg/dl	0,56-38,9 mmol/l
Bilirubina totale (TBIL)	0,1-30 mg/dl	1,7-513 µmol/l
Proteine totali (TP)	2-14 g/dl	20-140 g/l
Azoto ureico ematico (BUN)	2-180 mg/dl	0,7-64,3 mmol/urea/l
Acido urico	1-15 mg/dl	0,1-0,9 mmol/l

Se la concentrazione dell'analita è superiore ai valori di rilevamento (range dinamico) ma inferiore ai valori previsti dal sistema, sulla scheda dei risultati sarà indicato un segno ">" vicino al limite immediatamente superiore e un asterisco dopo il numero, ad esempio: ALT >2000* U/l. Se invece la concentrazione risulta inferiore al range dinamico, un segno "<" verrà stampato con un asterisco, ad esempio ALT <5* U/l. Per valori macroscopicamente superiori al range di misurazione (range del sistema), al posto del risultato viene stampato il segno "~~~~". Raccogliere un nuovo campione e rieseguire il test ogni volta che su una scheda viene stampato il segno "~~~~". Se i risultati relativi al secondo campione vengono nuovamente soppressi, rivolgersi all'assistenza tecnica Abaxis.

Sensibilità (limiti di rilevazione)

I limiti inferiori del range refertabile (dinamico) per ciascun analita sono i seguenti: alanina aminotransferasi 5 U/l; albumina 1 g/dl (10 g/l); fosfatasi alcalina 5 U/l; amilasi 5 U/l; aspartato aminotransferasi 5 U/l; calcio 4,0 mg/dl (1,0 mmol/l); creatinina 0,2 mg/dl (18 µmol/l); gamma glutamiltransferasi 5 U/l; glucosio 10 mg/dl (0,56 mmol/l); bilirubina totale 0,1 mg/dl (1,7 µmol/l); proteine totali 2 g/dl (20 g/l); azoto ureico 2,0 mg/dl (0,7 mmol urea/l); acido urico 1 mg/dl (0,1 mmol/l).

Precisione

Sono stati effettuati studi di precisione seguendo le linee guida NCCLS EP5-T2.⁸⁶ I risultati relativi alla precisione in esecuzione e totale sono stati ottenuti mediante test su due livelli di materiale di controllo. I controlli sono stati analizzati in duplicato due volte al giorno per 20 giorni durante un periodo di quattro settimane. I risultati degli studi sulla precisione sono evidenziati nella tabella 6.

Tabella 6: Precisione (N=80)

Analita	In esecuzione	Totale
Alanina transaminasi (U/l)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	21	21
DV	2,76	2,79
%CV	13,4	13,5
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	52	52
DV	2,70	3,25
%CV	5,2	6,2
Albumina (g/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	5,6	5,6
DV	0,09	0,11
%CV	1,7	2,1
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	3,7	3,7
DV	0,07	0,11
%CV	2,0	2,9
Fosfatasi alcalina (U/l)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	39	39
DV	1,81	2,29
%CV	4,6	5,8
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	281	281
DV	4,08	8,75
%CV	1,5	3,1

Tabella 6: Precisione (N=80)

Analita	In esecuzione	Totale
Amilasi (U/l)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	46	46
DV	2,40	2,63
%CV	5,2	5,7
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	300	300
DV	11,15	11,50
%CV	3,7	3,8
Aspartato transaminasi (U/l)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	47	49
DV	0,98	0,92
%CV	2,1	1,9
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	145	147
DV	1,83	1,70
%CV	1,3	1,2
Calcio (mg/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	8,6	8,6
DV	0,21	0,25
%CV	2,4	2,9
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	11,8	11,8
DV	0,39	0,40
%CV	3,3	3,4
Creatinina (mg/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	1,1	1,1
DV	0,14	0,14
%CV	12,5	13,1
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	5,2	5,2
DV	0,23	0,27
%CV	4,4	5,2
Gamma glutammiltransferasi (U/l)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	25	25
DV	0,59	0,74
%CV	2,34	2,94
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	106	106
DV	1,52	2,29
%CV	1,43	2,15

Tabella 6: Precisione (N=80) (segue)

Analita	In esecuzione	Totale
Glucosio (mg/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	66	66
DV	0,76	1,03
%CV	1,1	1,6
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	278	278
DV	2,47	3,84
%CV	0,9	1,4
Bilirubina totale (mg/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	0,8	0,8
DV	0,06	0,07
%CV	8,0	9,3
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	5,2	5,2
DV	0,09	0,15
%CV	1,7	2,8
Proteine totali (g/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	6,8	6,8
DV	0,05	0,08
%CV	0,8	1,2
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	4,7	4,7
DV	0,09	0,09
%CV	2,0	2,0
Azoto ureico ematico (mg/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	19	19
DV	0,35	0,40
%CV	1,9	2,1
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	65	65
DV	1,06	1,18
%CV	1,6	1,8
Acido urico (mg/dl)		
<u>Livello di controllo 1</u>		
Media	3,8	3,8
DV	0,15	0,18
%CV	4,0	4,8
<u>Livello di controllo 2</u>		
Media	7,5	7,5
DV	0,24	0,29
%CV	3,2	3,9

Correlazione

I campioni di sangue intero e siero eparinizzati sono stati prelevati da pazienti presso due strutture. I campioni di sangue intero sono stati analizzati con l'analizzatore chimico del sangue Piccolo sul posto; i campioni di siero sono stati analizzati con metodi comparativi. In due casi sono stati utilizzati i risultati di analisi su campioni di siero eseguiti con l'analizzatore Piccolo (opportunamente indicati nella tabella). In alcuni casi sono stati usati campioni integrativi con valori elevati e bassi per coprire la gamma dei valori dinamici. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi "in singolo" nello stesso giorno. La tabella 7 riporta le statistiche di correlazione rappresentative.

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

	Coefficiente di correlazione		Pendenza	Intercetta	SEE	N	Valori di riferimento del campione	Metodo comparativo
Alanina transaminasi (U/l)	0,981	0,905	1,3	3,21	86	10-174	Paramax®	
	0,985	0,946	-2,5	2,84	67	10-174	Technicon	
Albumina (g/dl)	0,854	1,001	-0,3	0,22	261	1,1-5,3	Paramax	
	0,896	0,877	-0,1	0,21	100	1,5-5,0	Beckman	
Fosfatasi alcalina (U/l)	0,988	0,970	-5,9	3,97	99	27-368	Paramax	
	0,929	1,136	-17,6	4,79	80	26-150	Technicon	
Amilasi (U/l)	0,979	0,692	-4,7	3,11	99	11-92	Paramax	
	0,963	1,065	-4,1	3,47	80	19-118	Technicon	
Aspartato transaminasi (U/l)	0,93	0,87	5,3	2,76	159	13-111	Paramax	
	1,0	0,97	3,0	1,9	46	13-252	DAX™	
Calcio (mg/dl)	0,991*	0,990	-0,4	0,17	25	5,2-11,9	Paramax	
	0,673	0,742	1,8	0,22	81	8,1-9,9	Beckman	
Creatinina (mg/dl)	0,993	0,926	0,0	0,15	260	0,4-14,7	Paramax	
	0,987	0,866	0,1	0,16	107	0,4-7,5	Beckman	
Gamma glutammil-transferasi (U/l)	1,0	0,98	-0,4	3,29	135	5-312	Paramax	
	1,0**	1,60	3,1	18,57	49	27-1848	Beckman	
Glucosio (mg/dl)	0,987	1,009	-2,8	3,89	251	72-422	Paramax	
	0,997	0,943	1,2	4,69	91	56-646	Beckman	
Bilirubina totale (mg/dl)	0,974	0,901	0,0	0,07	250	0,2-3,7	Paramax	
	0,980	1,113	-0,4	0,09	91	0,1-6,4	Beckman	
Proteine totali (g/dl)	0,849	0,932	0,6	0,19	251	5,7-9,2	Paramax	
	0,873	0,935	0,3	0,16	92	6,5-9,2	Beckman	
Azoto ureico ematico (mg/dl)	0,964	0,923	0,5	1,08	251	6-52	Paramax	
	0,983	0,946	0,0	0,66	92	6-38	Beckman	
Acido urico (mg/dl)	0,979	0,958	-0,3	0,20	159	1,4-7,6	Paramax	
	0,975	0,908	-0,6	0,31	44	2,1-12,1	DAX	

* I campioni di siero da pazienti ricoverati hanno fornito una gamma di valori più ampia, e forse più utile, rispetto ai campioni di sangue intero venoso da pazienti ambulatoriali. Le statistiche di correlazione per il test del calcio effettuato con Piccolo sono basate su questi campioni di siero.

**Uno dei centri ha effettuato test solo sul siero nell'analizzatore Piccolo per la correlazione del test della gamma glutammiltransferasi.

Risultati di uno studio condotto con operatori inesperti

È stato condotto uno studio con “operatori inesperti” ai cui partecipanti sono state fornite unicamente le istruzioni per i test, chiedendo loro di eseguire test di 3 dischi con campioni randomizzati in cieco. I campioni erano costituiti da pool di siero preparati a tre livelli per ciascuno dei tredici analiti: ALT, albumina, ALP, AMY, AST, calcio, creatinina, GGT, glucosio, bilirubina totale, proteine totali, BUN e UA. I partecipanti non erano stati in alcun modo addestrati all'esecuzione del test. Sono stati complessivamente arruolati circa 60 partecipanti da 3 centri, in rappresentanza di una popolazione demografica diversificata (livello di istruzione, età, sesso, ecc.).

Le tabelle seguenti presentano la sintesi delle prestazioni per ciascun analita.

Alanina aminotransferasi (ALT)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	45,4 U/l	98,9 U/l	184,3 U/l
%CV	3,7%	1,7%	1,5%
Range osservato	42 – 53	96 – 103	175 – 191
Percentuale di risultati nel range ± 15,0%*	98,4% 61/62 IC 95%: da 91,3% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

* Questa percentuale si basa sull'ipotesi dell'impossibilità di effettuare una distinzione appropriata tra valori normali e anormali nel caso in cui gli errori siano maggiori di un quarto del range normale. È stato considerato il range di (10 U/l - 47 U/l).

Albumina

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	3,0 g/dL	3,5 g/dL	4,2 g/dL
%CV	2,7%	2,5%	1,8%
Range osservato	2,9 – 3,2	3,3 – 3,7	4,0 – 4,4
Percentuale di risultati nel range ± 12,5%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Fosfatasi alcalina (ALP)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	94,5 U/l	171,5 U/l	337,5 U/l
%CV	5,2%	3,2%	2,4%
Range osservato	85 – 106	160-184	287 – 388
Percentuale di risultati nel range ± 15,0%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Amilasi (AMY)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	72,1 U/l	126,9 U/l	260,0 U/l
%CV	2,4%	2,1%	1,9%
Range osservato	67 – 75	120 – 133	248 – 273
Percentuale di risultati nel range ± 15,0%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Aspartato aminotransferasi (AST)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	56,0	120,4	276,3
%CV	2,4%	1,1%	1,0%
Range osservato	54 – 60	117 – 124	266 – 285
Percentuale di risultati nel range $\pm 15.0\%$	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Calcio

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	8,0	10,5	13,1
%CV	1,7	1,5	1,4
Range osservato	7,7 – 8,4	10,1 – 11,0	12,6 – 13,4
Percentuale di risultati nel range $\pm 6.3\%$	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Creatinina

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	0,89	2,07	6,89
%CV	11,0	5,0	1,6
Range osservato	0,7 – 1,2	1,8 – 2,3	6,5 – 7,2
Percentuale di risultati nel range $\pm 15.0\%$	93,6 58/62 IC 95%: da 84,3% a 98,2%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Gamma glutamiltransferasi (GGT)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	35,0 U/l	86,2 U/l	131,3 U/l
%CV	2,8%	1,5%	1,5%
Range osservato	33 – 38	83 – 90	123 – 135
Percentuale di risultati nel range $\pm 15.0\%$	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Glucosio

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	95,2	130,3	365,8
%CV	1,1%	1,0%	0,8%
Range osservato	93 – 98	125 – 133	351 – 373
Percentuale di risultati nel range $\pm 10.4\%^{**}$	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

** È stato considerato l'intervallo di (65 mg/dl - 99 mg/dl).

Bilirubina totale (TBIL)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	0,86 mg/dL	2,5 mg/dL	5,7 mg/dL
%CV	6,1%	2,6%	1,8%
Range osservato	0,8 – 1,0	2,3 – 2,6	5,4 – 5,9
Percentuale di risultati nel range ± 15.0%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Proteine totali (TP)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	4,8 g/dL	5,7 g/dL	7,1 g/dL
%CV	2,0%	1,5%	1,5%
Range osservato	4,6 – 5,3	5,3 – 5,9	6,7 – 7,5
Percentuale di risultati nel range ± 5.9%	98.4% 61/62 IC 95%: da 91,3% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Azoto ureico ematico (BUN)

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	15,1	41,0	72,2
%CV	2,3	2,5	1,8
Range osservato	14 – 16	37 – 43	68 – 75
Percentuale di risultati nel range ± 15.0%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

Acido urico

	Livello 1	Livello 2	Livello 3
N	62	62	62
Media	2,96	4,92	11,10
%CV	4,7	3,1	2,8
Range osservato	2,7 – 3,4	4,6 – 5,7	10,4 – 12,1
Percentuale di risultati nel range ± 15.0%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%	100% 62/62 IC 95%: da 94,2% a 100%

13. Simboli



Usare entro



Numero catalogo



Codice lotto



Dispositivo Medico
Diagnostico in vitro



Consultare le istruzioni
per l'uso



Produttore



Non riutilizzare



Numero di dispositivi
di test nel kit



Sequenza di
produzione



Numero di serie



Attenzione



Limitazione di
temperatura

PN:
Numero parte



Rappresentante
Autorizzato nella
Comunità Europea



Indica la conformità alle
Direttive Europee specificate



Struttura del codice a
barre nel format
standard dell'Health
Industry Bar Code
(HIBC)



Identificativo Unico del
dispositivo (UDI) in
formato leggibile ad
occhio umano e dalla
macchina usato per
identificare correttamente
I dispositivi medici
attraverso la loro
distribuzione e uso



Raccolta dei rifiuti separata
per questo articolo elettronico
indicato; Apparecchiatura
fabbricata/immessa sul
mercato dopo il 13 agosto
2005; Indica la conformità
con l'articolo 14(4) della
Direttiva 2012/19 UE (RAEE)
per l'Unione Europea (UE).

14. Bibliografia

1. Tonhazy NE, NG White, WW Umbreit. A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sickness. *Arch Biochem* 1950; 28: 36-42.
2. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 56-63.
3. Murray, RL. Alanine aminotransferase. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*, 2nd ed. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1989: 895-898.
4. Wróblewski F, LaDue JS. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91: 569-571.
5. Bergmeyer HU, Horder M. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3, IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18:521-534.
6. Howe PE. The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *J Biol Chem* 1921;49:93-107.
7. Howe PE. The determination of proteins in blood — a micro method. *J Biol Chem* 1921;49:109-113.
8. Wolfson WQ, et al. A rapid procedure for the estimation of total protein, true albumina, total globulin, alpha globulin, beta globulin and gamma globulin in 10 ml of serum. *Am J Clin Pathol* 1948;18:723-730.
9. Saifer A, Gerstenfeld S and Vacsler F. Photometric microdetermination of total serum globulins by Medias of a tryptophan reaction. *Clin Chem* 1961;7:626-636.
10. Saifer A, Marven T. The photometric microdetermination of serum total globulins with a tryptophan reaction: a modified procedure. *Clin Chem* 1966;12:414-417.
11. Gendler SM, Albumin. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*, 2nd ed. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1989: 1029-1033.
12. Webster D, Bignell AHC, EC Attwood. An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta* 1974; 53: 101-108.
13. Louderback A, Mealey EH, NA Taylor. A new dye-binding technic using bromocresol purple for determination of albumin in serum. *Clin Chem* 1968; 14: 793-794, (Abstract)
14. Pinnell AE, Northam BE. New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromocresol purple. *Clin Chem* 1978;24:80-86.
15. King, EJ and AR Armstrong. A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Can Med Assoc J* 1934; 31: 376-381.
16. Kind PRN, King EJ. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *J Clin Pathol* 1954; 7: 322-326.
17. Ohmori, Y. Uber die Phosphomonoesterase. *Enzymologia* 1937; 4: 217-231.
18. Fujita, H. Uber die Mikrobestimmung der Blutphosphatase. *J Biochem, Japan* 1939; 30: 69-87.
19. Petitclerc C, et al. Mechanism of action of Mg²⁺ and Zn²⁺ on rat placental alkaline phosphatase. I. Studies on the soluble Zn²⁺ and Mg²⁺ alkaline phosphatase. *Can J Biochem* 1975; 53: 1089-1100.
20. Tietz NW, et al. A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1983;29:751-761.
21. Bowers GN, Jr, et al. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part I. General considerations concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *Clin Chim Acta* 1979; 98: 163F-174F.
22. McNeely MDD. Amylase. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*, 2nd ed. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1989: 906-909.
23. Zinterhofer L, et al. Nephelometric determination of pancreatic enzymes. I. Amylase. *Clin Chim Acta* 1973; 43: 5-12.
24. Centers for Disease Control (CDC). Alpha-amylasi methodology survey I. Atlanta: US Public Health Service; Nov, 1975.
25. Somogyi M. Modifications of two methods for the assay of amilasi. *Clin Chem* 1960; 6: 23-35.
26. Gillard BK, Markman HC, Feig SA. Direct spectro-photometric determination of α -amylase activity in saliva, with p-nitrophenyl α -maltoside as substrate. *Clin Chem* 1977; 23: 2279-2282.
27. Wallenfels K, et al. The enzymic synthesis, by transglucosylation of a homologous series of glycosidically substituted malto-oligosaccharides, and their use as amilasi substrates. *Carbohydrate Res* 1978; 61: 359-368.
28. Karmen, A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 131-133.
29. Bergmeyer, HU, et al. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartato transaminasi. *Clin Chem* 1977; 23: 887-899.
30. Bergmeyer HU, Horder M, Moss DW. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. Revised IFCC method for aspartato transaminasi. *Clin Chem* 1978;24:720-721
31. Kramer B, Tisdall FF. A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum. *J Biol Chem* 1921;47:475-481.

14. Bibliografia (segue)

32. Clark EP, Collips JB. A study of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with suggested modification. *J Biol Chem* 1925;63:461-464.
33. Katzman E, Jacobi M. The determination of serum calcium by titration with ceric sulfate. *J Biol Chem* 1937; 118: 539-544.
34. Cali JP, et al. A reference method for the determination of total calcium in serum. In: GR Cooper, ed., *Selected Methods of Clinical Chemistry*, vol 8. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry; 1997: 3-8.
35. Kessler G, M Wolfman. An automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus. *Clin Chem* 1964;10:686-703.
36. Michaylova V, Ilkova P. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Anal Chim Acta* 1971;53:194-198.
37. Scarpa A, et al. Metallochromic indicators of ionized calcium. *Ann NY Acad Sci* 1978;307:86-112.
38. Knoll VE, Stamm D. Spezifische kreatininbestimmung im serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1970; 8: 582-587.
39. Haecckel R. Simplified determinations of the "true" creatinine concentration in serum and urine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18:385-394.
40. Moss GA, Bondar RJJ, Buzzelli DM. Kinetic Enzymatic Method For Determining Serum creatinine. *Clin Chem* 1975; 21: 1422-1426.
41. Jaynes PK, Feld RD, Johnson GF. An enzymic, reaction-rate assay for serum creatinine with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1982;28:114-117.
42. Fossati P, Prencipe L, and Berti G. Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 1983; 29: 1494-1496.
43. Whelton A, Watson AJ, Rock RC. Nitrogen metabolites and renal function. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Burtis CA, Ashwood ER, eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1994;1513-1575.
44. Ball, EG, Revel JP, Cooper O. The quantitative measurement of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J Biol Chem* 1956; 221: 895-908.
45. Goldbarg JA, et al. The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys* 1960; 91: 61-70.
46. Orłowski M, Meister A. γ -Glutamyl-*p*-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltranspeptidase activities. *Biochim Biophys Acta* 1963; 73: 679-681.
47. Persijn JP, van der Slik W. A new method for the determination of γ -glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1976; 14: 421-427.
48. Shaw LM, et al. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for γ -glutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 633-646.
49. Folin O, Wu H. A system of blood analysis. *J Biol Chem* 1919; 38: 81-110.
50. Somogyi M. A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. *J Biol Chem* 1937; 117: 771-776.
51. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 1944;153:375-380.
52. Kaplan LA. Glucosio In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*, 2nd ed. Kaplan LA, Pesce AJ, eds., St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1989: 850-856.
53. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937; 119: 481-490.
54. Meites S. Bilirubin, direct reacting and total, modified Malloy-Evelyn method. In: *Selected Methods of Clinical Chemistry*, Vol 8. 9. Faulkner WR, Meites S, eds. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry; 1982: 119-124.58.
55. Murao S Tanaka N. A new enzyme "bilirubin oxidase" produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1. *Agric Biol Chem* 1981; 45: 2383-2384.
56. Osaki S, Anderson S. Enzymatic determination of bilirubin. *Clin Chem* 1984; 30: 971, (Abstract)
57. Perry B, et al. Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase. *Clin Chem* 1986; 32: 329-332,
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. Reigler, E. Eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des Eiweisses. *Z Anal Chem* 1914; 53: 242-245.
60. Weichselbaum TE. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Path* 1946; 16: 40-49.
61. Dumas BT, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clin Chem* 1981; 27: 1642-1650.
62. Fales FW. Urea in serum, direct diacetyl monoxime method. In: *Selected Methods of Clinical Chemistry*, vol 9. Faulkner WR, Meites S, eds. Washington, D.C.: American Association for Clinical Chemistry. 1982: 365-373.
63. Van Slyke DD, Cullen GE. A permanent preparation of urease, and its use in the determination of urea. *J Biol Chem* 1914; 19: 211-228.
64. Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol* 1960; 13: 156-159.
65. Chaney AL, Marbach EP. Urea and ammonia determinations. *Clin Chem* 1962; 8: 130-132.

14. Bibliografia (segue)

66. Talke H, Schubert GE. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wochenschr* 1965; 43: 174-175.
67. Hallett CJ, Cook JGH. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. *Clin Chim Acta* 1971; 35: 33-37.
68. Patton CJ, Crouch SR. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal Chem* 1977; 49: 464-469.
69. 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.
70. Folin O, Denis W. A new (colorimetric) method for the determination of uric acid in blood. *J Biol Chem* 1912-1913; 13: 469-475.
71. Brown, H. The determination of uric acid in human blood. *J Biol Chem* 1945; 158: 601-608.
72. Feichtmeier TV, Wrenn HT. Direct determination of uric acid using uricase. *Am J Clin Pathol* 1955; 25: 833-839.
73. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxy-benzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 1980; 26: 227-231.
74. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Physician's office laboratory guidelines; tentative guideline – second edition. NCCLS Document POL1-T2 Wayne, PA: NCCLS, 1992.
75. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Procedures for the handling and processing of blood specimens; approved guideline – second edition. NCCLS document H18-A2. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
76. Overfield CV, Savory J, Heintges MG. Glycolysis: a re-evaluation of the effect on blood glucose. *Clin Chim Acta* 1972; 39: 35-40.
77. Rehak NN, Chiang BT. Storage of whole blood: effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 2111-2114.
78. Sherwin JE, Obernolte R. Bilirubin. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*, 2nd ed. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1989: 1009-1015.
79. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. *Clinical Chemistry: Principles and Technics*, 2^o ed. New York: Harper and Row. 1974: 417-421; 1058-1059.
80. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline. NCCLS Publication EP7-P. Wayne, PA: NCCLS, 1986.
81. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 3 ed. Washington, DC: AACC Press. 1990.
82. Benet LZ, Williams RL. Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetic data. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. Gilman AG, et al, eds. New York: McGraw-Hill, Inc. 1990: 1650-1735.
83. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. 1991 supplement to the third edition. Washington, DC: AACC Press. 1991.
84. Moss DW, Henderson AR. Enzymes. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Burtis CA, Ashwood ER, eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1994: 735-896.
85. Painter PC, Cope JY, Smith JL. Appendix. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Burtis CA, Ashwood ER, eds. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1994: 2161-2217.
86. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; tentative guideline – second edition. NCCLS Document EP5-T2. Wayne, PA: NCCLS, 1992.