

For Veterinary use only
Customer and Technical Service 1-800-822-2947

May 2006
PN: 500-7118, Rev. C
© 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587

1. Intended Use

The VetScan T₄/Cholesterol reagent rotor used with the VetScan Whole Blood Analyzer utilizes dry and liquid reagents to provide *in vitro* quantitative determinations of thyroxine (T₄) and cholesterol in heparinized whole blood, heparinized plasma, or serum.

2. Summary and Explanation of Tests

Thyroxine (T₄)

Thyroxine is a hormone synthesized in and secreted by the thyroid gland. The primary secretory form of the thyroid hormone is tetraiodothyronine (T₄), although some triiodothyronine (T₃) is also secreted into the blood. The ratio of T₄ to T₃ is 25:1 in canine plasma. Once in the blood, T₄ and T₃ are bound by transport proteins. The primary binding protein is thyroxine-binding globulin (TBG) in the dog and albumin in the cat. Upon delivery to the target cell, T₄ is deionated to T₃ at the cell surface. T₃ is the biologically active form of the thyroid hormone and more readily enters the target cell.

Thyroid hormone has many effects on the body, including clinical, physiological, calorogenic, metabolic (carbohydrate, protein and lipid), developmental, reproductive and hematologic. T₄ determinations aid in the diagnosis of hypothyroidism and hyperthyroidism and in monitoring sodium levothyroxine and methimazole therapies.

Clinical signs of abnormal T₄ levels are often vague. The most common observable signs of canine hypothyroidism are skin and coat changes, such as alopecia or a dry, dull coat. Other signs in dogs include lethargy, exercise intolerance, weakness, muscle atrophy, corneal lipid deposits and diarrhea. Clinical signs of feline hypothyroidism include lethargy and obesity (especially in iatrogenic hypothyroidism), alopecia, epilation of hair and bradycardia.

The most prevalent clinical signs of feline hyperthyroidism are weight loss and polyphagia. Other common signs are restlessness, tachycardia, polyuria-polydipsia, alopecia and diarrhea.

Cholesterol

Cholesterol is a major precursor of cholesterol ester, bile acids and steroid hormones and is a component of plasma membranes. The rate of cholesterol biosynthesis in the liver is indirectly proportional to dietary intake. Levels of cholesterol in the body are indirectly controlled by thyroid hormone, which stimulates bile acid production. Since bile acids are synthesized from cholesterol, cholesterol concentrations vary inversely with thyroid hormone activity.

Cholesterol levels may be used to aid in detection of hyperlipidemia or as a screening test for hypothyroidism and hyperadrenocorticism. Cholesterol results are most useful when analyzed in conjunction with other clinical chemistry tests.

As with any diagnostic test procedure, all other test procedures including the clinical status of the patient should be considered prior to final diagnosis.

3. Principles of Procedure

Thyroxine (T₄)

The first clinically feasible direct method to measure thyroxine was a competitive protein-binding assay (CPBA) developed by Murphy & Pattee in the early 1960s.¹ Radioimmunoassay techniques, with higher sensitivity and specificity, largely replaced CPBA.² Concerns about radioactive waste and potential health hazards helped prompt the development of non-isotopic tests such as enzyme and fluorescence immunoassays. Enzyme immunoassays (EIAs) for thyroxine have been shown to have, at clinically important levels, accuracy and precision equivalent to automated RIA procedures.³ An isotope dilution-mass spectrometric procedure has been proposed as a reference method, but is very complicated and labor intensive.⁴

Abaxis has adapted a commercially available EIA method for use in the VetScan Whole Blood Analyzer. In the reaction, 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) causes the release of endogenous T₄ from the binding proteins. The released endogenous T₄ competes for antibody (Ab) binding sites with T₄ labeled with the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH-T₄ conjugate). G6PDH-T₄ conjugate bound to antibody has lower activity than does unbound conjugate. As the binding of endogenous T₄ increases, the amount of the unbound enzyme conjugate increases. The active enzyme reduces nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to NADH.

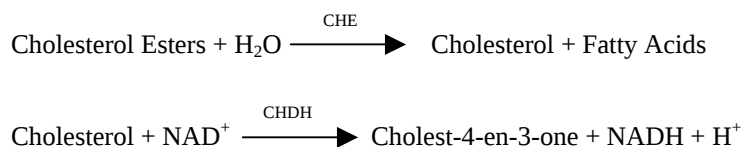


The rate of change of the absorbance at 340 nm is due to the conversion of NAD⁺ to NADH and is directly proportional to the amount of endogenous T₄ in the sample.

Cholesterol

The most common tests employ enzymatic endpoint reactions. These simple procedures typically use cholesterol esterase and cholesterol oxidase with a Trinder finish.^{5,6} Abaxis has developed an enzymatic method that uses cholesterol dehydrogenase in place of cholesterol oxidase. The use of cholesterol dehydrogenase eliminates the Trinder reaction, thus avoiding interference from physiological analytes such as bilirubin and hemoglobin.

Cholesterol esterase hydrolyzes cholesterol esters and H₂O to form cholesterol and fatty acids. The cholesterol is oxidized by cholesterol dehydrogenase to cholestenone and the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is reduced to NADH.



Absorbance is measured bichromatically at 340 nm and 405 nm. A dedicated sample blank is also measured to ensure no extraneous reactions interfere with the calculations of cholesterol levels. The production of NADH in this endpoint reaction is directly proportional to the amount of cholesterol present in the sample.

4. Principle of Operation

See the VetScan Chemistry Analyzer Operator's Manual, for the Principles and Limitations of the Procedure.

5. Description of Reagents

Reagents

Each VetScan T4/Cholesterol reagent rotor contains dry test specific reagent beads. A dry sample blank reagent (comprised of buffer, surfactants, excipients and preservatives) is included in each reagent rotor for use in calculating sample indices. Each reagent rotor also contains a diluent consisting of surfactants, ANS, T₄ antibodies and preservatives.

Warnings and Precautions

- For *In vitro* Diagnostic Use
- The diluent container in the reagent rotor is automatically opened when the analyzer drawer closes. A rotor with an opened diluent container can not be re-used. Ensure that the sample or control has been placed into the rotor before closing the drawer.

- Reagent beads may contain acids or caustic substances. The operator does not come into contact with the reagent beads when following the recommended procedures. In the event that the beads are handled (e.g., cleaning up after dropping and cracking a reagent rotor), avoid ingestion, skin contact, or inhalation of the reagent beads.
- Reagent beads and diluent contain sodium azide, which may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Reagents will not come into contact with lead and copper plumbing when following recommended procedures. However, if the reagents do come into contact with such plumbing, flush with a large volume of water to prevent azide buildup.

Instructions for Reagent Handling

Reagent rotors may be used directly from the refrigerator without warming. Open the sealed foil pouch and remove the rotor being careful not to touch the bar code ring located on the top of the reagent rotor. Use according to the instructions provided in the VetScan System Operator's Manual. A rotor not used within 20 minutes of opening the pouch should be discarded. Rotors in opened pouches can not be placed back in the refrigerator for use at a later time.

Storage

Store reagent rotors in their sealed pouches at 2-8°C (36-46°F). Do not expose opened or unopened rotors to direct sunlight or temperatures above 32°C (90°F). Do not allow the rotors sealed in their foil pouches to remain at room temperature longer than 24 hours prior to use. Open the pouch and remove the rotor just prior to use.

Indications of Reagent Rotor Instability or Deterioration

- All reagents contained in the reagent rotor, when stored as described above, are stable until the expiration date printed on the rotor pouch. Do **not** use a rotor after the expiration date. The expiration date is also encoded in the bar code printed on the bar code ring. An error message will appear on the VetScan Whole Blood Analyzer display if the reagents have expired.
- A torn or otherwise damaged pouch may allow moisture to reach the unused rotor and adversely affect reagent performance. Do not use a rotor from a damaged pouch.

6. Instrument

See the VetScan System Operator's Manual for complete information on using the analyzer.

7. Sample Collection and Preparation

The minimum required sample size is ~100 µL of heparinized whole blood, heparinized plasma, serum or serum control. The reagent rotor sample chamber can contain up to 120 µL of sample.

- Specimen collected in a heparinized micropipette should be dispensed into the reagent rotor **immediately** following sample collection.
- Use only lithium heparin (green stopper) evacuated specimen collection tubes for whole blood or plasma samples. Use no-additive (red stopper) evacuated specimen collection tubes or serum separator tubes (red or red/black stopper) for serum samples.
- Whole blood samples obtained by venipuncture must be homogenous before transferring a sample to the reagent rotor. Gently invert the collection tubes several times just prior to sample transfer. Do **not** shake the collection tube. Shaking can cause hemolysis.
- The test must be started within 10 minutes of transferring the sample into the reagent rotor.
- Whole blood venipuncture samples should be run within 60 minutes of collection; if this is not possible, separate the sample and transfer it into a clean test tube.⁷ Run the separated plasma or serum sample within 5 hours of centrifugation. If this is not possible, refrigerate the sample in a stoppered test tube at 2-8°C (36-46°F) for no longer than 48 hours. A plasma or serum sample can be stored at -10°C (14°F) for up to 5 weeks in a freezer that does not have a self-defrost cycle.

Known Interfering Substances

- The only anticoagulant recommended for use with the VetScan Whole Blood Analyzer is lithium heparin.
- Physical interferents (hemolysis, icterus, and lipemia) may cause changes in the reported concentrations of some analytes. The sample indices are printed on the bottom of each result card to inform the operator about the levels of interferents present in each sample. The VetScan Whole Blood Analyzer suppresses any results that are affected by >10% interference from hemolysis, lipemia, or icterus. "HEM", "LIP", "ICT" is printed on the result card in place of the result.

8. Procedure

Materials Provided

- One VetScan T4/Cholesterol Reagent Rotor

Materials Required but not Provided

- VetScan Whole Blood Chemistry Analyzer

Test Parameters

The VetScan System operates at ambient temperatures between 15°C and 32°C (59-90°F). The analysis time for each VetScan T4/Cholesterol Reagent Rotor is less than 14 minutes. The analyzer maintains the reagent rotor at a temperature of 37°C (98.6°F) over the measurement interval.

Test Procedure

The complete sample collection and step-by-step operating procedures are detailed in the VetScan System Operator's Manual.

Calibration

The VetScan Whole Blood Analyzer is calibrated by the manufacturer before shipment. The barcode printed on the barcode ring provides the analyzer with rotor-specific calibration data. Please see the VetScan System Operator's Manual.

Quality Control

Controls may be run periodically on the VetScan Whole Blood Analyzer to verify the accuracy of the analyzer. Abaxis recommends that a serum-based commercially available control be run. Run controls on the reagent rotor in the same manner as for patient samples. See the VetScan System Operator's Manual to run controls.

9. Results

The VetScan Whole Blood Analyzer automatically calculates and prints the analyte concentrations in the sample. Details of the endpoint and rate reaction calculations are found in the VetScan System Operator's Manual.

Interpretation of Results

Increased T₄

- T₄ concentrations tend to be higher in dogs less than one year old and decrease as the dog ages.
- An increased T₄ level in a feline is a reliable indicator of hyperthyroidism. Hyperthyroidism is the most common cause of elevated T₄ and is one of the most frequently diagnosed diseases in small animals. The typical cause of spontaneous hyperthyroidism in cats is functional thyroid adenoma. Hyperthyroidism is rarely observed in dogs but, when seen, is usually indicative of neoplasia or the administration of too much sodium levothyroxine to a hypothyroid dog. Approximately 66% of the canine neoplasms are adenocarcinomas.
- Feline thyroid testing is usually conducted to diagnose hyperthyroidism, to monitor the effects of antithyroid treatment, or to monitor thyroid replacement treatment following destruction of neoplastic thyroid glands. When evaluating total T₄ in cats, considerations must be allowed for age and concurrent diseases. T₄ values are higher in younger cats and normally decrease with age. In older cats with suspected hyperthyroidism, concurrent diseases such as renal failure cause a condition known as euthyroid sick syndrome that may depress total T₄ values. In these cases a free T₄ by equilibrium dialysis test (fT4ED) is used to confirm a diagnosis of hyperthyroidism.
- Three common conditions require confirmation with the fT4ED test. High normal T₄ values (3-5 mg/dL) in a young cat without marked weight loss is normal. High values (>5 mg/dL) in an old cat showing signs of weight loss is usually diagnostic for hyperthyroidism. High normal values (3-5 mg/dL) in an old cat may indicate hyperthyroidism. Since these values can be suppressed by concurrent disease, a test for active hormone (fT4ED) is necessary to diagnose this occult hyperthyroidism.

Decreased T₄

- In dogs, the total T₄ can be used to rule out a diagnosis of hypothyroidism. If total T₄ is within the normal range it is highly unlikely that the dog is hypothyroid. A low or low-normal T₄ value may be suggestive of but does not confirm hypothyroidism because non-thyroidal factors such as drugs and illness affect T₄. A diagnosis of hypothyroidism in dogs can be confirmed with a free T₄ by equilibrium dialysis (fT₄ED).
- Other causes of decreased T₄ levels may be associated with drug therapy and euthyroid sick syndrome. The glucocorticoids are the most clinically relevant of the drugs affecting T₄ levels. In euthyroid sick syndrome, decreased T₄ levels are seen with such nonthyroidal illnesses as acute and chronic renal failure, diabetes mellitus, hepatic insufficiency and obesity.
- After eliminating drug therapy and euthyroid sick syndrome, the most common cause of decreased T₄ levels is primary hypothyroidism. Hypothyroidism in dogs is most often a result of lymphocytic thyroiditis or idiopathic atrophy. Thyroid tumors that have destroyed >75% of the thyroid gland may cause clinical signs of hypothyroidism. Congenital defects of the pituitary gland, pituitary destruction and pituitary suppression can cause secondary hypothyroidism in dogs.
- Spontaneous hypothyroidism is rarely reported in cats. The common causes of feline hypothyroidism are bilateral thyroidectomy and overdoses of radioactive iodine or anti-thyroid drugs in hyper thyroid cats
- Hypothyroid patients may also have elevated cholesterol concentrations.
- To obtain an accurate basal T₄ concentration, medications should be withheld from the patient for several days.

Hypercholesterolemia

- A high fat diet or a blood sample collected shortly after the patient has eaten may cause hypercholesterolemia. Hypercholesterolemia is not apparent upon visual examination of the sample since it does not cause lipemia.
- A reduction in thyroid activity causes a decrease in the catabolism of cholesterol, resulting in elevated cholesterol levels. Observing a high cholesterol level on a screening profile may be the first indicator of hypothyroidism. Cholesterol, when used in conjunction with free T₄ levels, is a good indicator of canine hypothyroidism.
- A preliminary diagnosis of hyperlipidemia may be made using cholesterol levels and the lipemic index printed on the VetScan result card. Cholesterol concentrations > 300 mg/dL in conjunction with a 2+ or 3+ lipemic index can indicate hyperlipidemia in fasted dogs. Feline hyperlipidemia may be diagnosed when a cholesterol concentrations >200 mg/dL and an index of 1+ or greater is observed in fasted cats.
- Low levels of cholesterol are not usually a problem. Hypocholesterolemia has been observed with protein-losing enteropathy, some liver diseases, certain malignancies, and severe malnutrition. alanine aminotransferase (ALT), albumin, alkaline phosphatase (ALP), globulin, total bilirubin and total protein test results should be examined if liver disease is suspected. Low levels of protein, albumin and globulin can be observed in cases of protein-losing enteropathies and malnutrition.

10. Limitations of Procedure

General procedural limitations are discussed in the VetScan Systems Operator's Manual.

- **If a result for a particular test exceeds the assay range, the sample should be analyzed by another approved test method or sent to a referral laboratory. Do not dilute the sample and run it again on the VetScan Whole Blood Analyzer.**
- Samples with hematocrits in excess of 60% packed red cell volume may give inaccurate results. Samples with high hematocrits may be reported as hemolyzed. These samples may be spun down and the plasma then re-run in a new reagent rotor.
- The Abaxis T₄ method is susceptible to interference by T₄ autoantibody. In rare cases where T₄ autoantibody is present in a sample T₄ results will be low.

Warning: Extensive testing of the VetScan has shown that in very rare instances, sample dispensed into the reagent rotor may not flow smoothly into the sample chamber. Due to the uneven flow, an inadequate quantity of sample may be analyzed and results may fall outside your established reference ranges. The sample may be re-run using a new reagent rotor.

11. Expected Values

The most definitive normal ranges are those established for your patient population. Test results should be interpreted in conjunction with the patient's clinical signs

Animals should be fasted for 12 hours before sample is drawn so that cholesterol concentrations are not influenced by a recently consumed meal.

Table 1: Canine and Feline Reference Intervals

Analyte	Canine	Feline
Thyroxine (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)
Cholesterol	125-270 mg/dL (3.24-6.99 mmol/L)	90-205 mg/dL (2.33-5.31 mmol/L)

12. Performance Characteristics

Linearity

The chemistry for each analyte is linear over the dynamic range listed below when the VetScan System is operated according to the recommended procedure (see the VetScan System Operator's Manual). The Dynamic Range table referenced below represents the spectrum that the VetScan System can detect.

Table 2: VetScan Dynamic Ranges

Analyte	Dynamic Range Common Units	SI Units
Thyroxine (T₄)	0.5-8.0 ug/dL	6.5-103.2 nmol/L
Cholesterol	20-520 mg/dL	0.5-8.4 mmol/L

Precision

Precision studies were conducted using the NCCLS EP5-A⁸ Guidelines with modifications based on NCCLS EP18-P⁹ for unit-use devices. Results for within-run and total precision were determined by testing bi-level controls. Controls were run in duplicate twice each day over a one-week period.

Table 3: Precision

Analyte	Sample Size	Within-Run	Total
Thyroxine (T₄) (ug/dL)	n=40		
<u>Control 1</u>			
Mean		1.5	1.5
SD		0.15	0.19
%CV		9.6	12.5
<u>Control 2</u>			
Mean		6.0	6.0
SD		0.32	0.33
%CV		5.3	5.4
Cholesterol (mg/dL)	n=40		
<u>Control 1</u>			
Mean		155.5	155.5
SD		3.96	4.0
%CV		2.5	2.6
<u>Control 2</u>			
Mean		313.4	313.4
SD		9.7	9.7
%CV		3.10	3.10

Correlation

Field studies were conducted at a veterinary medicine teaching hospital. The VetScan Whole Blood Analyzer and a comparative method analyzed serum samples for the thyroxine assay. Representative correlation statistics are displayed in Table 4.

Table 4: Correlation of the VetScan System with Comparative Method(s)

Thyroxine (ug/dL)	Canine	Feline
Correlation Coefficient (r)	0.96	0.96
Slope	0.82	0.94
Intercept	0.16	0.10
Sample Range	0.5-7.1	1.2-8.3
n	40	42
Cholesterol (mg/dL)	Canine	Feline
Correlation Coefficient (r)	0.99	0.99
Slope	0.99	1.06
Intercept	6	-3
Sample Range	103-450	63-257
n	159	34

13. Bibliography

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.

Nur für den veterinärmedizinischen Einsatz
Kundenservice und technischer Support: 1-800-822-2947

Mai 2006

Art.-Nr.: 500-7118, Rev. C

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

1. Verwendungszweck

Die VetScan-T4/Cholesterin-Reagenzdisk für das VetScan-Vollblut-Analysesystem verwendet Trocken- und Flüssigreagenzien für die *in-vitro*-diagnostische Bestimmung von Thyroxin (T₄) und Cholesterin in heparinisiertem Vollblut, heparinisiertem Plasma oder Serum.

2. Zusammenfassung und Erläuterung der Tests

Thyroxin (T₄)

Thyroxin ist ein Hormon, das in der Schilddrüse synthetisiert und von der Schilddrüse ausgeschüttet wird. Die primäre Ausschüttungsform des Schilddrüsenhormons ist Tetrajodthyronin (T₄), es werden jedoch auch gewisse Mengen an Trijodthyronin (T₃) in den Blutstrom ausgeschüttet. Im Plasma von Hunden beträgt das Verhältnis von T₄ zu T₃ 25:1. Im Blutstrom werden T₄ und T₃ an Transportproteine gebunden. Bei Hunden ist das primäre Bindungsprotein thyroxinbindendes Globulin (TBG), bei Katzen ist es Albumin. Nach der Abgabe an die Zielzelle wird T₄ an der Zelloberfläche zu T₃ dejodiert. T₃ ist die biologisch aktive Form des Schilddrüsenhormons und dringt leichter in die Zielzelle ein.

Das Schilddrüsenhormon hat zahlreiche Auswirkungen auf den Körper, darunter klinische, physiologische, kalorigene, metabolische (Kohlenhydrate, Proteine und Lipide), entwicklungsbezogene, fortpflanzungsbezogene und hämatologische Auswirkungen. T₄-Bestimmungen unterstützen die Diagnose von Hypothyroidismus und Hyperthyroidismus sowie die Überwachung von Behandlungen mit Natriumlevothyroxin und Methimazol.

Die klinischen Anzeichen abnormaler T₄-Spiegel sind häufig vager Natur. Die häufigsten sichtbaren Anzeichen für Hypothyroidismus bei Hunden sind Haut- und Fellveränderungen, wie bspw. Alopezie oder trockenes, stumpfes Fell. Zu den weiteren Anzeichen bei Hunden zählen Lethargie, geringe Bewegungsbelastbarkeit, Schwäche, Muskelatrophie, Lipidablagerungen auf der Hornhaut und Diarrhöe. Zu den klinischen Anzeichen eines Hypothyroidismus bei Katzen zählen Lethargie und Fettleibigkeit (besonders bei iatrogenem Hypothyroidismus), Alopezie, Depilation und Bradykardie.

Die häufigsten klinischen Anzeichen für Hyperthyroidismus bei Katzen sind Gewichtsverlust und Polyphagie. Zu den weiteren häufigen Anzeichen zählen Rastlosigkeit, Tachykardie, Polyurie-Polydipsie, Alopezie und Diarrhöe.

Cholesterin

Cholesterin ist eine wichtige Vorstufe von Cholesterinester, Gallensäuren und Steroidhormonen. Außerdem ist Cholesterin ein Bestandteil der Plasmamembranen. Die Cholesterin-Biosyntheserate in der Leber ist indirekt proportional zur Nahrungsaufnahme. Der Cholesterinspiegel des Körpers wird indirekt vom Schilddrüsenhormon gesteuert, das die Gallensäurenproduktion stimuliert. Da Gallensäuren aus Cholesterin synthetisiert werden, schwankt der Cholesterinspiegel im umgekehrten Verhältnis zur Schilddrüsenhormonaktivität.

Der Cholesterinspiegel kann zum Nachweis von Hyperlipidämie oder für Screening-Tests auf Hypothyroidismus und Hyperkortizismus herangezogen werden. Cholesterin-Testergebnisse sind dann am nützlichsten, wenn sie in Verbindung mit anderen klinisch-chemischen Tests ausgewertet werden.

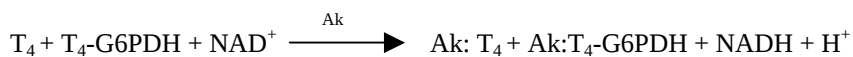
Wie bei allen diagnostischen Testverfahren sind vor der abschließenden Diagnose alle anderen Prüfverfahren, einschließlich des klinischen Status des Patienten, in Betracht zu ziehen.

3. Verfahrensprinzip

Thyroxin (T₄)

Die erste klinisch durchführbare Direktbestimmungsmethode für Thyroxin war ein von Murphy & Pattee in den frühen 60er Jahren entwickelter kompetitiver Proteinbindungssassay (CPBA).¹ Radioimmunoassay-Techniken, mit höherer Sensitivität und Spezifität, ersetzten die CPBAs weitgehend.² Bedenken bezüglich radioaktiver Abfälle und potenzieller Gesundheitsgefährdungen trugen zur Entwicklung von isotopfreien Tests, wie z. B. Enzym- und Fluoreszenz-Immunoassays, bei. Enzymimmunoassays (EIAs) auf Thyroxin zeigten bei klinisch bedeutsamen Spiegeln eine Genauigkeit und Präzision, die der von automatisierten RIA-Verfahren vergleichbar ist.³ Ein Massenspektrometrie-Verfahren mit Isotopverdünnung wurde als Referenzmethode vorgeschlagen, ist jedoch äußerst kompliziert und arbeitsintensiv.⁴

Abaxis hat eine handelsübliche EIA-Methode an das VetScan-Vollblut-Analysesystem angepasst. Bei der Reaktion bewirkt 8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure (ANS) die Freisetzung von endogenem T₄ aus den Bindungsproteinen. Das freigesetzte endogene T₄ konkurriert mit dem T₄, das mit dem Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase markiert ist (G6PDH-T₄-Konjugat), um Antikörper-Bindungsstellen (Ak-Bindungsstellen). An Antikörper gebundenes G6PDH-T₄-Konjugat weist eine geringere Aktivität auf, als ungebundenes Konjugat. Mit zunehmender Bindung des endogenen T₄ steigt die Menge des ungebundenen Enzymkonjugats. Das aktive Enzym reduziert Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) zu NADH.

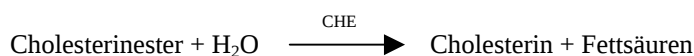


Die Extinktionsveränderungsgeschwindigkeit bei 340 nm hängt mit der Umwandlung von NAD⁺ in NADH zusammen und ist direkt proportional zur Menge des in der Probe vorhandenen endogenen T₄.

Cholesterin

Bei den gebräuchlichsten Tests kommen enzymatische Endpunkt-Reaktionen zum Einsatz. Diese unkomplizierten Verfahren verwenden normalerweise Cholesterin-Esterase und Cholesterin-Oxidase mit einer Trinder-Nachbehandlung.^{5,6} Abaxis hat eine enzymatische Methode entwickelt, bei der anstelle von Cholesterin-Oxidase Cholesterin-Dehydrogenase zum Einsatz kommt. Der Einsatz von Cholesterin-Dehydrogenase eliminiert die Trinder-Reaktion, wodurch Störungen durch physiologische Analyten, wie Bilirubin und Hämoglobin vermieden werden.

Cholesterin-Esterase hydrolysiert Cholesterinester und H₂O zu Cholesterin und Fettsäuren. Das Cholesterin wird durch Cholesterin-Dehydrogenase zu Cholestenon oxidiert, und das Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) wird zu NADH reduziert.



Die Extinktion wird bichromatisch bei 340 nm und 405 nm ermittelt. Außerdem wird eine testspezifische Blindprobe bestimmt, um sicherzustellen, dass keine anderweitigen Reaktionen die Berechnung der Cholesterinspiegel stören. Die Bildung von NADH ist bei dieser Endpunkt-Reaktion direkt proportional zu der in der Probe vorhandenen Cholesterinmenge.

4. Funktionsprinzip

Grundsätze und Grenzen des Verfahrens sind im Bedienungshandbuch für das VetScan-Analysesystem aufgeführt.

5. Beschreibung der Reagenzien

Reagenzien

Jede VetScan-T4/Cholesterin-Reagenzdisk enthält trockene testspezifische Reagenzien-Beads. Jede Reagenzdisk enthält ein trockenes Blindprobenreagenz (bestehend aus Puffer, Tensiden, Hilfsstoffen und Konservierungsmitteln) für die Berechnung der Probenindizes. Jede Reagenzdisk enthält außerdem ein aus Tensiden, ANS, T₄-Antikörpern und Konservierungsmitteln bestehendes Verdünnungsmittel.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für die *In-vitro*-Diagnostik
- Der Verdünnungsmittelbehälter in der Reagenzdisk wird beim Schließen des Schubfachs des Analysesystems automatisch geöffnet. Disks mit geöffneten Verdünnungsmittelbehältern können nicht wieder verwendet werden. Vor dem Schließen des Schubfachs prüfen, ob die Probe bzw. Kontrolle in die Disk eingesetzt wurde.
- Reagenzien-Beads können Säuren oder Basen enthalten. Bei Einhaltung der empfohlenen Verfahrensweisen kommt der Bediener nicht mit den Reagenzien-Beads in Berührung. Beim Umgang mit Beads (z. B. bei Reinigungsmaßnahmen nach dem Fallenlassen und Zerschlagen einer Reagenzdisk) Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen der Reagenzien-Beads vermeiden.
- Reagenzien-Beads und Verdünnungsmittel enthalten Natriumazid, das mit Abflussleitungen aus Blei und Kupfer reagieren und hochexplosive Metallazide bilden kann. Bei Einhaltung der empfohlenen Verfahrensweisen kommen die Reagenzien nicht mit Abflussleitungen aus Blei und Kupfer in Kontakt. Sollten die Reagenzien jedoch mit derartigen Abflussleitungen in Kontakt kommen, mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidansammlungen zu vermeiden.

Anweisungen zum Umgang mit Reagenzien

Reagenzdisks sind ohne Erwärmen sofort aus dem Kühlschrank heraus verwendbar. Den verschweißten Folienbeutel öffnen und die Disk herausnehmen. Dabei darauf achten, den Barcode-Ring auf der Oberseite der Reagenzdisk nicht zu berühren. Gemäß den Anweisungen des Bedienungshandbuchs für das VetScan-System verwenden. Nicht innerhalb von 20 Minuten nach Öffnen des Beutels verwendete Disks sind zu entsorgen. Disks in geöffneten Beuteln dürfen nicht zur späteren Verwendung wieder in den Kühlschrank gelegt werden.

Lagerung

Die Reagenzdisks in ihren verschlossenen Beuteln bei 2–8 °C (36–46 °F) lagern. Geöffnete oder ungeöffnete Disks vor direkter Sonneneinstrahlung oder Temperaturen über 32 °C (90 °F) schützen. Die in ihren Folienbeuteln verschlossenen Disks vor Gebrauch maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahren. Erst unmittelbar vor Gebrauch den Beutel öffnen und die Disk entnehmen.

Anzeichen für instabile oder zerfallene Reagenzdisks

- Alle in der Reagenzdisk enthaltenen Reagenzien bleiben bei den oben beschriebenen Lagerbedingungen bis zu dem auf dem Rotorbeutel aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Disks nach dem Verfallsdatum **nicht** mehr verwenden. Das Verfallsdatum ist auch in dem auf dem Barcode-Ring aufgedruckten Barcode enthalten. Bei Überschreitung des Verfallsdatums der Reagenzien erscheint auf der Anzeige des VetScan-Vollblut-Analysesystems eine Fehlermeldung.
- Bei einem aufgerissenen oder anderweitig beschädigten Folienbeutel kann Feuchtigkeit zur unbenutzten Disk vordringen und die Leistung der Reagenzien beeinträchtigen. Niemals Disks aus beschädigten Beuteln verwenden.

6. Gerät

Vollständige Angaben zum Gebrauch des Analysesystems enthält das Bedienungshandbuch für das VetScan-System.

7. Probenahme und Probenvorbereitung

Das erforderliche Mindestprobenvolumen ist ~100 µl heparinisiertes Vollblut, heparinisiertes Plasma, Serum oder Serumkontrolle. Die Probenkammer der Reagenzdisk kann eine Probenmenge von bis zu 120 µl aufnehmen.

- In heparinisierten Mikropipetten gesammelte Proben sind nach der Probenahme **sofort** in die Reagenzdisk einzubringen.
- Für Vollblut- oder Plasmaproben nur evakuierte Probensammelröhrchen mit Lithiumheparin (grüner Stopfen) verwenden. Für Serumproben nur evakuierte Probensammelröhrchen ohne Zusatz (roter Stopfen) oder Serumentrennröhrchen (roter oder rot/schwarzer Stopfen) verwenden.
- Durch Venenpunktion erhaltene Vollblutproben müssen homogen sein, bevor die Probe in die Reagenzdisk transferiert wird. Die Sammelröhrchen vor dem Probentransfer mehrmals vorsichtig überkopfdrehen. Das Sammelröhrchen **nicht** schütteln. Schütteln kann zu Hämolyse führen.
- Der Test muss innerhalb von 10 Minuten nach dem Probentransfer in die Reagenzdisk beginnen.
- Durch Venenpunktion erhaltene Vollblutproben sind innerhalb von 60 Minuten nach der Entnahme zu analysieren. Sollte dies nicht möglich sein, die Probe trennen und in ein sauberes Teströhrchen transferieren.⁷ Die getrennte Plasma- oder Serumprobe innerhalb von 5 Stunden nach der Zentrifugation analysieren. Sollte dies nicht möglich sein, die Probe in einem verschlossenen Teströhrchen maximal 48 Stunden lang bei 2–8 °C (36–46 °F) im Kühlschrank lagern. In Gefrierschränken ohne Selbstabtauungsfunktion können Plasma- oder Serumproben bei -10 °C (14 °F) bis zu 5 Wochen lang gelagert werden.

Bekannte Störsubstanzen

- Das einzige zur Verwendung mit dem VetScan-Vollblut-Analysesystem empfohlene Antikoagulans ist Lithium-Heparin.
- Physiologische Störungen (Hämolyse, Ikterus und Lipämie) können zu Veränderungen der berichteten Konzentrationen einiger Analyten führen. Die Probenindizes werden unten auf jeder Ergebniskarte ausgedruckt, damit der Bediener weiß, welche Konzentration an Störsubstanzen in den einzelnen Proben vorliegen. Das VetScan-Vollblut-Analysesystem unterdrückt alle Ergebnisse, die auf Grund von Hämolyse, Lipämie oder Ikterus Störungen von mehr als 10 % aufweisen. In solchen Fällen wird auf der Ergebniskarte an Stelle des Ergebnisses „HEM“ (Hämolyse), „LIP“ (Lipämie) oder „ICT“ (Ikterus) ausgedruckt.

8. Verfahren

Lieferumfang

- Eine VetScan-T4/Cholesterin-Reagenzdisk

Benötigte Materialien, die nicht zum Lieferumfang gehören

- VetScan-Vollblut-Analysesystem

Testparameter

Für den Betrieb des VetScan-Systems sind Umgebungstemperaturen zwischen 15 und 32 °C (59 und 90 °F) erforderlich. Die Analysedauer für jede VetScan-T4/Cholesterin-Reagenzdisk beträgt weniger als 14 Minuten. Das Analysesystem hält die Reagenzdisk während des Messintervalls auf einer Temperatur von 37 °C (98,6 °F).

Testverfahren

Das komplette Probennahmeverfahren sowie schrittweise Bedienungsanweisungen sind im Bedienungshandbuch für das VetScan-System ausführlich beschrieben.

Kalibrierung

Das VetScan-Vollblut-Analysesystem wird vor dem Versand vom Hersteller kalibriert. Der auf dem Barcode-Ring aufgedruckte Barcode enthält die diskspezifischen Kalibrierungsdaten für das Analysesystem. Hierzu bitte das Bedienungshandbuch für das VetScan-System einsehen.

Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der Genauigkeit des Analysesystems können am VetScan-Vollblut-Analysesystem in regelmäßigen Abständen Kontrollen analysiert werden. Abaxis empfiehlt die Analyse einer handelsüblichen Kontrolle auf Serumbasis. Die Kontrollen in der gleichen Weise auf der Reagenzdisk analysieren wie Patientenproben. Angaben zur Analyse von Kontrollen enthält das Bedienungshandbuch für das VetScan-System.

9. Ergebnisse

Das VetScan-Vollblut-Analysesystem berechnet und druckt die Analytkonzentrationen der Probe automatisch aus. Einzelheiten zu den Endpunkt- und Reaktionsgeschwindigkeitsberechnungen sind im Bedienungshandbuch für das VetScan-Vollblut-Analysesystem enthalten.

Interpretation der Ergebnisse

Erhöhter T₄-Spiegel

- Die T₄-Konzentrationen sind bei weniger als ein Jahr alten Hunden gewöhnlich höher; sie sinken mit zunehmendem Alter des Hundes.
- Erhöhte T₄-Spiegel bei Katzen sind ein verlässliches Anzeichen für Hyperthyroidismus. Hyperthyroidismus ist die häufigste Ursache erhöhter T₄-Spiegel und eine der bei Kleintieren am häufigsten diagnostizierten Krankheiten. Die Ursache für spontan auftretenden Hyperthyroidismus bei Katzen ist typischerweise ein funktionales Schilddrüsenadenom. Bei Hunden tritt Hyperthyroidismus selten auf, ist dann jedoch gewöhnlich ein Anzeichen für Neoplasie oder für die Verabreichung einer zu großen Menge Natriumlevothyroxin im Falle von Hunden mit Hypothyroidismus. Bei ca. 66 % der Neoplasmen von Hunden handelt es sich um Adenokarzinome.

- Bei Katzen dienen Schilddrüsentests normalerweise zur Diagnostizierung von Hyperthyroidismus, zur Überwachung der Wirkung antithyroider Behandlungen oder zur Überwachung einer Schilddrüsenhormonersatztherapie nach der Zerstörung neoplastischer Schilddrüsen. Bei der Untersuchung von Gesamt-T₄ bei Katzen sind Alter und begleitende Erkrankungen zu berücksichtigen. Bei jüngeren Katzen sind die T₄-Werte höher; sie sinken normalerweise mit zunehmendem Alter. Bei älteren Katzen mit Verdacht auf Hyperthyroidismus führen begleitende Erkrankungen, wie Nierenversagen zu einem „Euthyreose-Krankheitssyndrom“, bei dem die Gesamt-T₄-Werte evtl. unterdrückt sind. In derartigen Fällen erfolgt die Bestätigung der Hyperthyroidismus-Diagnose durch einen Gleichgewichtsdialyse-Test auf freies T₄ (fT₄ED).
- Drei häufig auftretende Zustände erfordern eine Bestätigung durch den fT₄ED-Test. Hohe T₄-Normalwerte (3–5 mg/dl) bei jungen Katzen ohne erkennbaren Gewichtsverlust sind normal. Erhöhte Werte (>5 mg/dl) bei alten Katzen mit Anzeichen von Gewichtsverlust sind normalerweise ein diagnostisches Anzeichen für Hyperthyroidismus. Hohe Normalwerte (3–5 mg/dl) bei alten Katzen können auf Hyperthyroidismus hindeuten. Da diese Werte durch begleitende Erkrankungen unterdrückt werden können, ist für die Diagnose dieses okkulten Hyperthyroidismus ein Test auf aktives Hormon (fT₄ED) erforderlich.

Reduzierter T₄-Spiegel

- Bei Hunden kann eine Hypothyroidismus-Diagnose anhand des Gesamt-T₄-Werts ausgeschlossen werden. Liegen die Gesamt-T₄-Werte innerhalb des Normalbereichs, ist es höchst unwahrscheinlich, dass der Hund an Hypothyroidismus leidet. Niedrige T₄-Werte oder niedrige T₄-Normalwerte können Anzeichen für Hypothyroidismus sein. Sie können einen Hypothyroidismus jedoch nicht bestätigen, da nicht schilddrüsenbezogene Faktoren, wie Medikamente und Krankheiten, sich auf die T₄-Spiegel auswirken können. Zur Bestätigung von Hypothyroidismus-Diagnosen bei Hunden eignen sich Gleichgewichtsdialyse-Tests auf freies T₄ (fT₄ED).
- Weitere Ursachen für reduzierte T₄-Spiegel können mit einer medikamentösen Behandlung und dem „Euthyreose-Krankheitssyndrom“ zusammenhängen. Bei den klinisch relevantesten Medikamenten, die sich auf die T₄-Spiegel auswirken, handelt es sich um die Glukokortikoide. Beim „Euthyreose-Krankheitssyndrom“ kommt es zu reduzierten T₄-Spiegeln, wenn nicht schilddrüsenbezogene Krankheiten, wie akutes und chronisches Nierenversagen, *Diabetes mellitus*, Leberinsuffizienz und Fettleibigkeit vorliegen.
- Nach dem Ausschluss einer medikamentösen Behandlung und des „Euthyreose-Krankheitssyndroms“ ist primärer Hypothyroidismus die häufigste Ursache für reduzierte T₄-Spiegel. Bei Hunden ist Hypothyroidismus häufig eine Folge von Hashimoto-Thyreoiditis oder idiopathischer Atrophie. Durch Schilddrüsentumoren verursachte Schilddrüsenzerstörungen von >75 % können klinische Anzeichen von Hypothyroidismus produzieren. Kongenitale Hypophysendefekte, Zerstörung der Hypophyse und Unterdrückung der Hypophysenfunktion können bei Hunden zu sekundärem Hypothyroidismus führen.
- Bei Katzen ist ein spontan auftretender Hypothyroidismus selten zu beobachten. Die häufigsten Ursachen für Hypothyroidismus bei Katzen sind bilaterale Thyroidektomie und Überdosierung mit radioaktivem Jod oder antithyroiden Medikamenten im Falle von Katzen mit Hyperthyroidismus.
- An Hypothyroidismus leidende Patienten können auch erhöhte Cholesterinspiegel aufweisen.
- Zwecks Erhalt eines korrekten T₄-Grundspiegels sollte dem Patienten über mehrere Tage hinweg keine Medikamente verabreicht werden.

Hypercholesterinämie

- Stark fetthaltige Diäten oder die Entnahme von Blutproben kurz nach einer Nahrungsaufnahme des Patienten kann eine Ursache für Hypercholesterinämie sein. Hypercholesterinämie kann nicht durch Sichtprüfung der Probe festgestellt werden, da dieser Zustand keine Lipämie hervorruft.
- Reduzierte Schilddrüsenaktivität hat einen reduzierten Cholesterinstoffwechsel zur Folge, was zu erhöhten Cholesterinspiegeln führt. Ein bei einem Screening-Profil festgestellter hoher Cholesterinspiegel kann ein erstes Anzeichen für Hypothyroidismus sein. In Verbindung mit den Spiegeln an freiem T₄ sind die Cholesterinwerte ein guter Indikator für Hypothyroidismus bei Hunden.
- Eine vorläufige Hyperlipidämie-Diagnose lässt sich unter Heranziehung der Cholesterin-Spiegel und des auf der VetScan-Ergebniskarte ausgedruckten lipämischen Index erstellen. Cholesterinspiegel von > 300 mg/dl in Verbindung mit einem Lipämie-Index von 2+ oder 3+ kann bei nüchtern getesteten Hunden auf Hyperlipidämie hindeuten. Bei Katzen lässt sich eine Hyperlipidämie diagnostizieren, wenn sie bei Nüchterntests Cholesterinspiegel von >200 mg/dl und einen Index von mindestens 1+ aufweisen.
- Niedrige Cholesterinspiegel sind normalerweise unproblematisch. Hypocholesterinämie wurde bei Enteropathien mit Proteinverlusten, manchen Lebererkrankungen, bestimmten Tumorleiden und schwerer Mangelernährung beobachtet. Bei Verdacht auf eine Lebererkrankung sollten die Testergebnisse für Alaninaminotransferase (ALT), Albumin, alkalische Phosphatase (ALP), Globulin, Gesamtbilirubin und Gesamtprotein untersucht werden. Niedrige Protein-, Albumin und Globulinspiegel können bei Enteropathien mit Proteinverlusten und bei Mangelernährung auftreten.

10. Verfahrensgrenzen

Die allgemeinen Verfahrensgrenzen werden im Bedienungshandbuch für das VetScan-System behandelt.

- **Ein den Assaybereich überschreitendes Ergebnis für einen bestimmten Test sollte mit einem anderen zugelassenen Testverfahren analysiert oder an ein Referenzlabor geschickt werden. Die Probe nicht verdünnen und erneut im VetScan-Vollblut-Analysesystem testen.**
- Proben, deren Hämatokrit ein Erythrozytenkonzentrationsvolumen von über 60 % umfasst, können ungenaue Ergebnisse erbringen. Solche Proben mit hohen Hämatokritwerten können als hämolysiert berichtet werden. Diese Proben können dann zum Erhalt von Plasma zentrifugiert und in einer neuen Reagenzdisk erneut getestet werden.
- Die T₄-Methode von Abaxis ist anfällig für Störungen durch T₄-Autoantikörper. In seltenen Fällen, wenn eine Probe T₄-Autoantikörper enthält, fallen die T₄-Ergebnisse niedrig aus.

Achtung: Umfassende Prüfungen des VetScan-Systems haben ergeben, dass in sehr seltenen Fällen eine in die Reagenzdisk gegebene Probe nicht problemlos in die Probenkammer rinnt. Infolge des ungleichmäßigen Flusses kann eine unzureichende Probenmenge analysiert werden, und Ergebnisse können außerhalb des Referenzbereichs liegen. Die Probe kann mit einer neuen Reagenzdisk erneut analysiert werden.

11. Erwartete Werte

Am definitivsten sind die für die jeweilige Patientenpopulation ermittelten Normalbereiche. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit den klinischen Anzeichen des Patienten zu interpretieren.

Die Tiere sollten vor der Probennahme 12 Stunden lang nicht gefüttert werden, damit der Cholesterinspiegel nicht durch unlängst aufgenommene Nahrung beeinflusst wird.

Tabelle 1: Referenzbereiche für Hunde und Katzen

Analyt	Hunde	Katzen
Thyroxin (T ₄)	1,1–4,0 µg/dl (14,2–52,0 nmol/l)	1,5–4,8 µg/dl (19,4–61,9 nmol/l)
Cholesterin	125–270 mg/dl (3,24–6,99 mmol/l)	90–205 mg/dl (2,33–5,31 mmol/l)

12. Leistungsmerkmale

Linearität

Die Methodenkurve der einzelnen Analyten verläuft in dem hier präsentierten dynamischen Bereich linear, wenn das VetScan-System empfehlungsgemäß betrieben wird (siehe das Bedienungshandbuch für das VetScan-System). Die folgende Tabelle der dynamischen Bereiche repräsentiert das Nachweisspektrum des VetScan-Systems.

Tabelle 2: Dynamische Bereiche des VetScan-Systems

Analyt	Dynamischer Bereich Gebräuchliche Einheiten	SI-Einheiten
Thyroxin (T ₄)	0,5–8,0 µg/dl	6,5–103,2 nmol/l
Cholesterin	20–520 mg/dl	0,5–8,4 mmol/l

Präzision

Es wurden Präzisionsstudien durchgeführt, die den NCCLS-Richtlinien EP5-A⁸ entsprachen (mit Änderungen gemäß NCCLS EP18-P⁹ für am Behandlungsort eingesetzte Geräte). Die Ergebnisse für die Präzision innerhalb eines Laufs und die Gesamtpräzision wurden durch Testen von Kontrollmaterialien in 2 Konzentrationen ermittelt. Die Kontrollen wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen hinweg zweimal täglich im Zweifachansatz analysiert.

Tabelle 3: Präzision

Analyt	Probenumfang	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
Thyroxin (T₄) (µg/dl)	n=40		
<u>Kontrolle 1</u>			
Mittelwert		1,5	1,5
SA		0,15	0,19
% VK		9,6	12,5
<u>Kontrolle 2</u>			
Mittelwert		6,0	6,0
SA		0,32	0,33
% VK		5,3	5,4
Cholesterin (mg/dl)	n=40		
<u>Kontrolle 1</u>			
Mittelwert		155,5	155,5
SA		3,96	4,0
% VK		2,5	2,6
<u>Kontrolle 2</u>			
Mittelwert		313,4	313,4
SA		9,7	9,7
% VK		3,10	3,10

Korrelation

Es wurden Vor-Ort-Studien in einem veterinärmedizinischen Ausbildungskrankenhaus durchgeführt. Dabei wurden mit dem VetScan-Vollblut-Analysesystem und einer Vergleichsmethode Serumproben für den Thyroxin-Assay analysiert. Eine repräsentative Korrelationsstatistik ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Korrelation des VetScan-Systems mit Vergleichsmethode(n)

Thyroxin (µg/dl)	Hunde	Katzen
Korrelationskoeffizient (r)	0,96	0,96
Steigung	0,82	0,94
Schnittpunkt	0,16	0,10
Probenbereich	0,5–7,1	1,2–8,3
n	40	42
Cholesterin (mg/dl)	Hunde	Katzen
Korrelationskoeffizient (r)	0,99	0,99
Steigung	0,99	1,06
Schnittpunkt	6	-3
Probenbereich	103–450	63–257
n	159	34

13. Literaturverzeichnis

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.

Pour usage vétérinaire seulement
Service à la clientèle et technique 1-800-822-2947

Mai 2006
Réf. : 500-7118, Rév. C
© 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587 États-Unis

1. Usage prévu

Le rotor de réactif T₄/cholestérol VetScan employé avec l'analyseur de sang entier VetScan utilise des réactifs secs et liquides pour fournir les déterminations quantitatives *in vitro* de thyroxine (T₄) et de cholestérol dans le sang entier hépariné, le plasma hépariné ou le sérum.

2. Résumé et explication des tests

Thyroxine (T₄)

La thyroxine est une hormone synthétisée et sécrétée par la glande thyroïde. La principale forme sécrétoire de l'hormone thyroïdienne est la tétraiodothyronine (T₄), bien que de la triiodothyronine (T₃) soit également sécrétée dans le sang. Le rapport de la T₄ sur la T₃ dans le plasma canin est de 25:1. Une fois dans le sang, la T₄ et la T₃ sont liées aux protéines de transport. La principale protéine de liaison est la globuline de liaison de la thyroxine (TBG) chez le chien et l'albumine chez le chat. À son administration à la cellule cible, la T₄ est déionisée en T₃ à la surface de la cellule. La T₃ est la forme biologiquement active de l'hormone thyroïdienne et pénètre plus rapidement dans la cellule cible.

Les effets de l'hormone thyroïdienne sur le corps sont multiples : cliniques, physiologiques, calorigènes, métaboliques (glucides, protéines et lipides), hématologiques et elle participe au développement et au système reproductif. Les déterminations de la T₄ contribuent au diagnostic de l'hypothyroïdie et de l'hyperthyroïdie et à la surveillance des traitements à la lévothyroxine de sodium et au méthimazole.

Les signes cliniques de niveaux de T₄ anormaux sont souvent difficiles à déterminer avec exactitude. Les signes les plus courants de l'hypothyroïdie canine sont des changements observés au niveau de la peau et du pelage, par exemple une alopecie ou un pelage sec et terne. Parmi les autres symptômes observés chez le chien, on peut citer léthargie, intolérance à l'exercice, faiblesse, atrophie musculaire, dépôts gras sur la cornée et diarrhée. Les signes cliniques de l'hypothyroïdie chez les félins comprennent léthargie et obésité (en particulier en cas d'hypothyroïdie iatrogénique), alopecie, poils qui ne repoussent pas après un rasage et ralentissement de la fréquence cardiaque.

Les signes cliniques les plus fréquents de l'hyperthyroïdie chez les félins sont perte de poids et polyphagie. Parmi les autres symptômes courants, on peut citer hyperactivité, tachycardie, polyurie/polydipsie, alopecie et diarrhée.

Cholestérol

Le cholestérol est un précurseur majeur de l'ester cholestérol, des acides biliaires et des stéroïdes hormonaux et est un composant des membranes plasmiques. Le taux de biosynthèse du cholestérol dans le foie est indirectement proportionnel à la prise alimentaire. Les niveaux de cholestérol dans l'organisme sont indirectement contrôlés par l'hormone thyroïdienne, qui stimule la production d'acides biliaires. Les acides biliaires étant synthétisés à partir du cholestérol, les concentrations de cholestérol varient à l'inverse de l'activité de l'hormone thyroïdienne.

Les niveaux de cholestérol peuvent contribuer à la détection d'une hyperlipidémie ou au dépistage d'une hypothyroïdie et d'un hypercorticisme. Leur analyse est plus utile lorsqu'elle est accompagnée d'autres tests de chimie clinique.

Comme c'est le cas pour toute procédure de test de diagnostic, toutes les autres procédures de test, y compris l'état clinique du patient, doivent être prises en considération avant d'établir un diagnostic définitif.

3. Principes de la procédure

Thyroxine (T₄)

La première méthode directe de mesure de la thyroxine cliniquement faisable consistait en un test de liaison de protéines (CPBA) concurrentiel développé par Murphy & Pattee au début des années 1960.¹ Les techniques de dosages radioimmunologiques, d'une sensibilité et d'une spécificité supérieures, ont largement remplacé les tests CPBA.² Les préoccupations liées aux déchets radioactifs et aux risques potentiels pour la santé ont contribué au développement rapide de tests non isotopiques, comme les dosages immuno-enzymatiques et les méthodes fluorométriques. Il a été démontré que les dosages immuno-enzymatiques (EIA) de la thyroxine présentent, à des niveaux cliniquement importants, une exactitude et une précision équivalentes à celles des procédures RIA automatisées.³ Une procédure de spectrométrie de masse à dilution isotopique a été proposée comme méthode de référence, mais elle est très compliquée et exige une main-d'œuvre importante.⁴

Abaxis a adapté une méthode EIA disponible dans le commerce pour l'utiliser dans l'analyseur de sang entier VetScan. Dans la réaction, l'acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique (ANS) entraîne la libération de T₄ endogène à partir des protéines de liaison. Cette T₄ endogène entre en compétition, pour les sites de fixation des anticorps, avec la T₄ marquée avec l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (conjugué G6PDH-T₄). L'activité du conjugué G6PDH-T₄ lié à un anticorps est inférieure à celle du conjugué non lié. À mesure que la liaison de la T₄ endogène augmente, la quantité du conjugué enzymatique non lié augmente aussi. L'enzyme active réduit le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) à NADH.

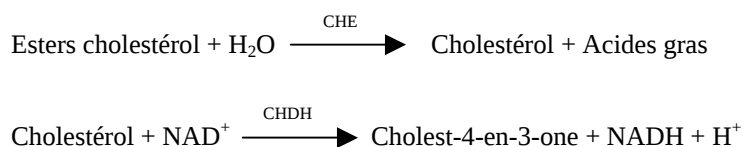


Le taux de variation de l'absorbance à 340 nm est causé par la conversion du NAD⁺ en NADH et est directement proportionnel à la quantité de T₄ endogène dans l'échantillon.

Cholestérol

Les tests les plus courants emploient des réactions à point final enzymatiques. Ces procédures simples utilisent généralement le cholestérol estérase et le cholestérol oxydase avec un fini Trinder.^{5,6} Abaxis a développé une méthode enzymatique qui remplace le cholestérol oxydase par le cholestérol déshydrogénase. L'utilisation du cholestérol déshydrogénase élimine la réaction Trinder et évite ainsi l'interférence des analytes physiologiques, comme la bilirubine et l'hémoglobine.

Le cholestérol estérase hydrolyse les esters cholestérol et H₂O pour former le cholestérol et les acides gras. Le cholestérol est oxydé par le cholestérol déshydrogénase en cholest-4-en-3-one et le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) est réduit en NADH.



L'absorbance est mesurée bichromatiquement à 340 nm et 405 nm. Un échantillon à blanc dédié est également mesuré pour s'assurer qu'aucune réaction étrangère n'interfère avec le calcul des niveaux de cholestérol. La production de NADH dans cette réaction à point final est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon.

4. Principe d'exécution

Se reporter au manuel de l'utilisateur de l'analyseur chimique VetScan pour en savoir plus sur les principes et les limitations de la procédure.

5. Description des réactifs

Réactifs

Chaque rotor de réactif T₄/cholestérol VetScan contient des billes de réactif sèches spécifiques au test. Un réactif à blanc d'échantillon sec (constitué de tampon, surfactants, excipients et agents conservateurs) est compris dans chaque rotor de réactif afin de calculer les indices de l'échantillon. Chaque rotor contient également un diluant composé de surfactants, d'ANS, d'anticorps T₄ et d'agents conservateurs.

Avertissements et précautions

- Destiné aux diagnostics *in vitro*
- Le récipient de diluant dans le rotor de réactif s'ouvre automatiquement lorsque le tiroir de l'analyseur se ferme. Un rotor dont le récipient à diluant est ouvert ne peut pas être réutilisé. Vérifier que l'échantillon ou le témoin a bien été placé dans le rotor avant de fermer le tiroir.
- Les billes de réactif peuvent contenir des acides ou des substances caustiques. L'utilisateur n'entre pas en contact avec les billes de réactif lorsqu'il respecte les procédures recommandées. Au cas où les billes seraient manipulées (par exemple, lors du nettoyage, après avoir laissé tomber un rotor de réactif qui s'est cassé), éviter l'ingestion, tout contact avec la peau ou l'inhalation des billes de réactif.
- Les billes de réactif et le diluant contiennent des azides de sodium, qui peuvent réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azides de métal hautement explosifs. Les réactifs n'entrent pas en contact avec les canalisations de plomb et de cuivre lorsque l'utilisateur respecte les procédures recommandées. Toutefois, au cas où les réactifs entreraient en contact avec les canalisations, rincer à grande eau afin d'éviter l'accumulation d'azides.

Manipulation des réactifs

Les rotors de réactif peuvent être utilisés dès leur sortie du réfrigérateur sans devoir être réchauffés. Ouvrir le sachet en aluminium scellé et en retirer le rotor en prenant soin de ne pas toucher l'anneau du code-barres qui se trouve sur le dessus du rotor. Utiliser conformément aux instructions du manuel de l'utilisateur du système VetScan. Tout rotor qui n'a pas été utilisé dans les 20 minutes suivant l'ouverture du sachet doit être jeté. En aucun cas les rotors dont le sachet est ouvert ne peuvent être replacés dans le réfrigérateur en vue de leur utilisation ultérieurement.

Conservation

Conserver les rotors de réactif dans leur sachet scellé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C (36 °F et 46 °F). Ne pas exposer des rotors ouverts ou fermés à la lumière directe du soleil ou à des températures supérieures à 32 °C (90 °F). Ne pas laisser les rotors scellés dans leur sachet en aluminium à température ambiante pendant plus de 24 heures avant emploi. Ouvrir le sachet et retirer le rotor juste avant son utilisation.

Indications d'instabilité/de détérioration du rotor de réactif

- Tous les réactifs contenus dans le rotor, lorsqu'ils sont conservés comme décrit ci-dessus, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le sachet du rotor. **Ne pas** utiliser un rotor au-delà de la date de péremption. La date de péremption est également encodée dans le code-barres imprimé sur l'anneau du code-barres. Un message d'erreur s'affichera sur l'écran de l'analyseur de sang entier VetScan si les réactifs sont périmés.
- Un sachet déchiré ou détérioré risque de laisser pénétrer l'humidité, qui atteindra le rotor inutilisé et aura un effet défavorable sur la performance du réactif. Ne pas utiliser un rotor provenant d'un sachet détérioré.

6. Instrument

Se reporter au manuel de l'utilisateur du système VetScan pour des informations complètes sur l'utilisation de l'analyseur.

7. Prélèvement et préparation des échantillons

La quantité minimale requise pour un échantillon est de ~100 µL de sang entier hépariné, de plasma hépariné, de sérum ou de sérum témoin. La chambre à échantillon du rotor de réactif peut contenir jusqu'à 120 µL d'échantillon.

- L'échantillon prélevé dans une micropipette héparinée doit être distribué dans le rotor de réactif **immédiatement** après son prélèvement.
- N'utiliser que des tubes de prélèvement sous vide à héparine de lithium (bouchon vert) pour les échantillons de sang entier ou de plasma. Utiliser des tubes de prélèvement sous vide (bouchon rouge) sans adjuvants ou des tubes de séparation de sérum (bouchon rouge ou rouge et noir) pour les échantillons de sérum.
- Les échantillons de sang entier obtenus par ponction veineuse doivent être homogènes avant de transférer un échantillon au rotor de réactif. Retourner doucement le tube de prélèvement à plusieurs reprises juste avant de transférer les échantillons. **Ne pas** agiter le tube de prélèvement. L'utilisateur évitera ainsi tout risque d'hémolyse.
- Le test doit être commencé dans les 10 minutes suivant le transfert de l'échantillon dans le rotor de réactif.

- Les échantillons de sang entier prélevés par ponction veineuse doivent être traités dans les 60 minutes suivant le prélèvement. Si cela n'est pas possible, séparer l'échantillon et le transférer dans un tube à essai propre.⁷ Traiter l'échantillon de plasma ou de sérum séparé dans les 5 heures suivant la centrifugation. Si cela n'est pas possible, réfrigérer l'échantillon dans un tube à essai muni d'un bouchon à une température comprise entre 2 °C et 8 °C (36 °F et 46 °F), pendant 48 heures au maximum. Un échantillon de plasma ou de sérum peut être conservé à -10° C (14° F) pendant 5 semaines au maximum dans un congélateur non doté d'un cycle de dégivrage automatique.

Substances interférentes connues

- L'héparine de lithium est l'unique anticoagulant dont l'utilisation est recommandée avec l'analyseur de sang entier VetScan.
- Les substances physiologiques interférentes (hémolyse, ictère et lipémie) peuvent entraîner des variations des concentrations telles que relevées dans certains analytes. Les indices des échantillons sont imprimés au bas de chaque fiche de résultats afin d'informer l'utilisateur des taux des substances interférentes présentes dans chaque échantillon. L'analyseur de sang entier VetScan supprime tout résultat affecté par une interférence >10 % due à une hémolyse, une lipémie ou un ictère. Le symbole « HEM », « LIP » ou « ICT » respectivement sera imprimé sur la fiche de résultats à la place du résultat.

8. Procédure

Matériel fourni

- Un rotor de réactif T4/cholestérol VetScan

Matériel nécessaire mais non fourni

- Analyseur chimique de sang entier VetScan

Paramètres de test

Le système VetScan fonctionne à des températures ambiantes comprises entre 15° C et 32° C (59° F et 90° F). Le temps d'analyse pour chaque rotor de réactif T4/Cholestérol VetScan est de moins de 14 minutes. L'analyseur maintient le rotor de réactif à une température de 37 °C (98,6 °F) pendant la durée de la mesure.

Procédure de test

Les procédures de prélèvement d'échantillons et d'utilisation complètes sont expliquées en détail dans le manuel de l'utilisateur du système VetScan.

Étalonnage

L'analyseur de sang entier VetScan est étalonné en usine par le fabricant avant son expédition. Le code-barres imprimé sur l'anneau du code-barres indique à l'analyseur les données d'étalonnage spécifiques au rotor. Se reporter au manuel de l'utilisateur du système VetScan.

Contrôle qualité

Des témoins peuvent être régulièrement analysés sur l'analyseur de sang entier VetScan afin de vérifier son exactitude. Abaxis recommande l'exécution d'un témoin à base de sérum disponible dans le commerce. Analyser les témoins sur le rotor de réactif de la même manière que les échantillons prélevés sur les patients. Se reporter au manuel de l'utilisateur du système VetScan pour plus d'informations sur l'analyse de témoins.

9. Résultats

L'analyseur de sang entier VetScan calcule et imprime automatiquement les concentrations des analytes dans l'échantillon. Les calculs des réactions à point final et de la cinétique sont expliqués en détail dans le manuel de l'utilisateur du système VetScan.

Interprétation des résultats

Augmentation de la T₄

- Les concentrations de la T₄ tendent à être plus élevées chez les chiens de moins de un an et baissent à mesure que le chien prend de l'âge.
- Un niveau de T₄ supérieur chez le félin indique de manière fiable la présence d'une hyperthyroïdie. L'hyperthyroïdie est la cause la plus courante d'un niveau de T₄ élevé et est l'une des maladies les plus fréquemment diagnostiquées chez les petits animaux. L'hyperthyroïdie spontanée chez les chats est généralement due à un adénome thyroïdien fonctionnel. L'hyperthyroïdie est rarement observée chez les chiens mais, lorsqu'elle est diagnostiquée, elle indique généralement une néoplasie ou l'administration d'une trop grande quantité de sodium lévothyroxine à un chien souffrant d'hypothyroïdie. 66 % environ des néoplasmes canins sont des adénocarcinomes.

- Les tests de la thyroïde chez les félins visent généralement à diagnostiquer une hyperthyroïdie, à surveiller les effets d'un traitement antithyroïdien ou d'un traitement de substitution de la thyroïde en cas d'ablation des glandes thyroïdiennes néoplasiques. Lors de l'évaluation de la T₄ totale chez le chat, l'âge et les maladies concomitantes doivent être pris en compte. Les valeurs de la T₄ sont supérieures chez les chats jeunes et baissent avec l'âge. Chez les chats âgés qu'on soupçonne de souffrir d'une hyperthyroïdie, les maladies concomitantes, par exemple une insuffisance rénale, entraînent une pathologie appelée « euthyroid sick syndrome » (ou maladie euthyroïdienne) susceptible de provoquer une baisse de la T₄ totale. Dans ces cas, un dosage de T₄ libre par dialyse à l'équilibre (fT4ED) est effectué pour confirmer le diagnostic de l'hyperthyroïdie.
- Trois conditions doivent être généralement confirmées par le dosage fT4ED. Une valeur de la T₄ élevée proche de la normale (3-5 mg/dL) chez les jeunes chats sans perte de poids importante n'indique aucun dysfonctionnement de la thyroïde. Une valeur élevée (>5 mg/dL) chez les chats âgés, avec perte de poids, indique généralement une hyperthyroïdie. Une valeur élevée proche de la normale (3-5 mg/dL) chez les chats âgés peut indiquer une hyperthyroïdie. Étant donné que ces valeurs peuvent être occultées par des maladies concomitantes, un dosage de l'hormone active (fT4ED) est nécessaire pour diagnostiquer cette hyperthyroïdie occulte.

Baisse de la T₄

- Chez le chien, la T₄ totale peut être utilisée pour exclure le diagnostic d'une hypothyroïdie. Si sa valeur est comprise dans la plage normale, il est fort peu probable que le chien souffre d'hypothyroïdie. Si sa valeur est faible ou faible et proche de la normale, elle peut suggérer une hypothyroïdie, mais elle ne la confirme pas puisque des facteurs non thyroïdiens, par exemple des médicaments ou une maladie, affectent la T₄. Le diagnostic d'une hypothyroïdie chez le chien peut être confirmé par un dosage de la T₄ libre par dialyse à l'équilibre (fT4ED).
- D'autres causes de niveaux de T₄ faibles peuvent être associées à un traitement médicamenteux et à la maladie euthyroïdienne. Les glucocorticoïdes sont les médicaments les plus pertinents du point de vue clinique qui affectent les niveaux de la T₄. En cas de maladie euthyroïdienne, des niveaux de T₄ bas sont observés avec des pathologies non thyroïdiennes, telles que des insuffisances rénales aiguës et chroniques, le diabète sucré, l'insuffisance hépatocellulaire et l'obésité.
- Après l'élimination du traitement médicamenteux et de la maladie euthyroïdienne, la cause la plus fréquente de niveaux de T₄ bas est l'hypothyroïdie endogène. L'hypothyroïdie chez le chien résulte le plus souvent d'une thyroïdite chronique de Hashimoto ou d'une atrophie idiopathique. Les tumeurs thyroïdiennes qui ont détruit plus de 75 % de la glande thyroïde peuvent entraîner des signes cliniques d'hypothyroïdie. Des malformations congénitales de l'hypophyse ou l'ablation de cette glande peuvent entraîner une hypothyroïdie exogène chez le chien.
- L'hypothyroïdie spontanée est rarement observée chez les chats. L'hypothyroïdie chez les félins résulte le plus souvent d'une thyroïdectomie bilatérale et de l'administration excessive d'iode radioactif ou de médicaments anti-thyroïdiens aux chats souffrant d'hyperthyroïdie.
- On peut également observer de fortes concentrations de cholestérol chez les patients souffrant d'hypothyroïdie.
- Pour obtenir une concentration de T₄ de base exacte, l'administration de médicaments au patient doit être suspendue pendant plusieurs jours.

Hypercholestérolémie

- Un régime alimentaire riche en matières grasses ou un prélèvement sanguin effectué peu après le repas du patient peut entraîner le diagnostic d'une hypercholestérolémie. L'hypercholestérolémie n'est pas apparente à l'examen visuel de l'échantillon puisqu'elle n'entraîne pas de lipémie.
- Une réduction de l'activité thyroïdienne provoque une baisse du catabolisme du cholestérol et donc des niveaux de cholestérol élevés. L'observation d'un niveau de cholestérol élevé sur un profil de dépistage peut indiquer une hypothyroïdie. Le cholestérol, lorsqu'il est associé aux niveaux de T₄ libre, est un bon indicateur d'hypothyroïdie canine.
- Le diagnostic préliminaire d'une hyperlipidémie peut être établi au vu des niveaux de cholestérol et de l'indice lipémique imprimé sur la fiche de résultat VetScan. Les concentrations de cholestérol supérieures à 300 mg/dL associées à un indice lipémique de 2+ ou 3+ peuvent indiquer une hyperlipidémie chez les chiens à jeun. On peut diagnostiquer une hyperlipidémie chez les félins lorsque les concentrations de cholestérol sont supérieures à 200 mg/dL et l'indice lipémique égal au moins à 1+ chez les chats à jeun.
- Les niveaux de cholestérol bas ne posent généralement pas problème. Une hypocholestérolémie a été observée en cas d'entéropathies avec perte de protéines, de certaines insuffisances hépatiques, de certaines malignités et d'une malnutrition aggravée. Les résultats des dosages de l'aminotransférase alanine (ALT), de l'albumine, de la phosphatase alcaline (ALP), de la globuline, de la bilirubine totale et des protéines totales doivent être examinés si on soupçonne une insuffisance rénale. On peut observer des niveaux de protéines, d'albumine et de globuline faibles en cas d'entéropathies avec perte de protéines et de malnutrition.

10. Limitations de la procédure

Les limitations générales de la procédure sont indiquées dans le manuel de l'utilisateur du système VetScan.

- **Si le résultat d'un test spécifique dépasse la plage de dosage, l'échantillon doit être analysé à l'aide d'une autre méthode de test approuvée ou il doit être envoyé à un laboratoire de référence. Ne pas diluer l'échantillon et le réanalyser dans l'analyseur de sang entier VetScan.**
- Les échantillons dont les hémocrites dépassent 60 % du volume globulaire total risquent de donner des résultats inexacts. Les échantillons dont les hémocrites sont élevés peuvent être décrits comme étant hémolysés. La rotation de ces échantillons peut être décélérée et le plasma réanalysé dans un nouveau rotor de réactif.
- Les autoanticorps T₄ peuvent interférer avec la méthode T₄ développée par Abaxis. Dans les rares cas où des autoanticorps T₄ sont présents dans un échantillon, les résultats de la T₄ seront bas.

Attention : Des tests étendus du système VetScan ont montré qu'en certains cas très rares, l'échantillon distribué dans le rotor de réactif ne s'écoule pas facilement dans la chambre d'échantillon. Suite à cet écoulement irrégulier, il se peut qu'une quantité inadéquate d'échantillon soit analysée et plusieurs résultats risquent de se trouver hors de vos plages de référence. L'échantillon peut être réanalysé en utilisant un nouveau rotor de réactif.

11. Valeurs attendues

Les plages normales définitives sont celles définies pour la population de patients. Les résultats des tests doivent être interprétés conjointement aux signes cliniques du patient.

Les animaux doivent être à jeun 12 heures avant le prélèvement de l'échantillon afin que le dernier repas ingéré n'affecte pas les concentrations de cholestérol.

Tableau 1 : Intervalles de référence pour chiens et félins

Analyte	Chien	Félin
Thyroxine (T ₄)	1,1-4,0 ug/dL (14,2-52,0 nmol/L)	1,5-4,8 ug/dL (19,4-61,9 nmol/L)
Cholestérol	125-270 mg/dL (3,24-6,99 mmol/L)	90-205 mg/dL (2,33-5,31 mmol/L)

12. Caractéristiques de performance

Linéarité

Les réactions chimiques pour chaque analyte sont linéaires dans la plage dynamique indiquée ci-dessous quand le système VetScan est utilisé conformément à la procédure recommandée (se reporter au manuel de l'utilisateur du système VetScan). Le tableau des plages dynamiques ci-dessous représente le spectre que le système VetScan est capable de détecter.

Tableau 2 : Plages dynamiques VetScan

Analyte	Gamme dynamique Unités communes	Unités SI
Thyroxine (T ₄)	0,5-8,0 ug/dL	6,5-103,2 nmol/L
Cholestérol	20-520 mg/dL	0,5-8,4 mmol/L

Précision

Des études de précision ont été effectuées selon les directives NCCLS EP5-A⁸ avec des modifications basées sur NCCLS EP18-P⁹ pour les appareils à utilisation par unité. Les résultats intra-test et de précision totale ont été déterminés en utilisant des témoins à deux niveaux. Les témoins ont été analysés en double deux fois par jour, pendant une semaine.

Tableau 3 : Précision

Analyte	Taille de l'échantillon	Intra-test	Total
Thyroxine (T₄) (ug/dL)	n=40		
<u>Témoin n° 1</u>			
Moyenne		1,5	1,5
É-T		0,15	0,19
CV (%)		9,6	12,5
<u>Témoin n° 2</u>			
Moyenne		6,0	6,0
É-T		0,32	0,33
CV (%)		5,3	5,4
Cholestérol (mg/dL)	n=40		
<u>Témoin n° 1</u>			
Moyenne		155,5	155,5
É-T		3,96	4,0
CV (%)		2,5	2,6
<u>Témoin n° 2</u>			
Moyenne		313,4	313,4
É-T		9,7	9,7
CV (%)		3,10	3,10

Corrélation

Des études de terrain ont été réalisées dans un hôpital universitaire de médecine vétérinaire. L'analyseur de sang entier VetScan et une méthode comparative ont analysé des échantillons de sérum pour le dosage de la thyroxine. Des statistiques de corrélation représentatives sont indiquées au tableau 4.

Tableau 4 : Corrélation du système VetScan avec la(les) méthode(s) comparative(s)

Thyroxine (ug/dL)	Chien	Félin
Coefficient de corrélation (r)	0,96	0,96
Pente	0,82	0,94
Ordonnée à l'origine	0,16	0,10
Plage d'échantillon	0,5-7,1	1,2-8,3
n	40	42
Cholestérol (mg/dL)	Chien	Félin
Coefficient de corrélation (r)	0,99	0,99
Pente	0,99	1,06
Ordonnée à l'origine	6	-3
Plage d'échantillon	103-450	63-257
n	159	34

13. Bibliographie

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.

Exclusivamente para uso veterinario
Servicio técnico y Servicio al cliente 1-800-822-2947

Mayo 2006
PN: 500-7118, Rev. C
© 2002, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587

1. Indicaciones

El rotor reactivo VetScan para T4/colesterol utilizado con el analizador de sangre entera VetScan emplea reactivos secos y líquidos para proporcionar determinaciones cuantitativas *in vitro* de tiroxina (T₄) y colesterol en sangre entera heparinizada, plasma heparinizado o suero.

2. Resumen y explicación de las pruebas

Tiroxina (T₄)

La tiroxina es una hormona sintetizada en la glándula tiroidea y secretada por ésta. La forma principal de secreción de la hormona tiroidea es la tetrayodotironina (T₄), aunque también se secreta algo de triyodotironina (T₃) en la sangre. La relación de T₄ a T₃ es de 25:1 en plasma canino. Una vez en la sangre, T₄ y T₃ quedan fijadas por medio de proteínas de transporte. La principal proteína de fijación es la globulina de fijación de tiroxina (TBG) en el perro y la albúmina en el gato. En el momento del suministro a la célula objetivo, T₄ se desioniza a T₃ en la superficie celular. T₃ es la forma biológicamente activa de la hormona tiroidea e ingresa con mayor facilidad a la célula objetivo.

La hormona tiroidea tiene muchos efectos en el cuerpo, que incluyen aquellos clínicos, fisiológico, calorigénico, metabólico (carbohidratos, proteínas y lípidos), de desarrollo, reproductivos y hematológicos. Las determinaciones de T₄ ayudan en el diagnóstico de hipotiroidismo e hipertiroidismo, y en el control de las terapias con levotiroxina sódica y tiamazol.

Las señales clínicas de niveles anormales de T₄ con frecuencia son vagas. Las señales observables más comunes de hipotiroidismo canino son cambios en la piel y en el manto, tales como alopecia o un manto seco y opaco. Otras señales en los perros incluyen letargo, intolerancia al ejercicio, debilidad, atrofia muscular, depósitos corneales de lípidos y diarrea. Las señales clínicas de hipotiroidismo felino incluyen letargo y obesidad (especialmente en el caso de hipotiroidismo yatrogénico), alopecia, epilación del pelo y bradicardia.

Las señales más prevalentes de hipertiroidismo felino son pérdida de peso y polifagia. Otras señales comunes son inquietud, taquicardia, poliuria-polidipsia, alopecia y diarrea.

Colesterol

El colesterol es un precursor principal del éster del colesterol, ácidos biliares y hormonas esteroideas, y es un componente de las membranas plasmáticas. La tasa de la biosíntesis del colesterol en el hígado es indirectamente proporcional al insumo dietario. Los niveles de colesterol en el cuerpo son controlados indirectamente por la hormona tiroidea, que estimula la producción de ácido biliar. Dado que los ácidos biliares son sintetizados a partir del colesterol, las concentraciones de colesterol varían inversamente con la actividad de la hormona tiroidea.

Pueden usarse niveles de colesterol para ayudar en la detección de hiperlipidemia o como prueba de detección para hipotiroidismo e hiperadrenocorticismos. Los resultados de colesterol son de mayor utilidad cuando se los analiza conjuntamente con otras pruebas químicas clínicas.

Al igual que con cualquier procedimiento diagnóstico de prueba, hay que considerar todos los procedimientos de prueba restantes, incluido el estado clínico del paciente, antes del diagnóstico final.

3. Principios del procedimiento

Tiroxina (T₄)

El primer método directo clínicamente factible de medición de la tiroxina fue un ensayo de fijación de proteínas competitivas (CPBA) desarrollado por Murphy y Pattee a principios de la década de 1960¹. Las técnicas de los radioinmunoensayos, con su mayor sensibilidad y especificidad, reemplazaron en gran medida al CPBA². Las preocupaciones con respecto a los desechos radiactivos y los potenciales peligros para la salud ayudaron a promover el desarrollo de pruebas no isotópicas, tales como los inmunoensayos con enzimas y por fluorescencia. Los inmunoensayos con enzimas (EIA) para la tiroxina han demostrado tener, a niveles clínicamente importantes, una exactitud y precisión equivalentes a los procedimientos RIA automáticos³. Se ha propuesto un procedimiento espectrométrico de masa por dilución de isótopos como método de referencia, pero éste es muy complicado y elaborado⁴.

Abaxis ha adaptado un método EIA comercialmente disponible para uso en el analizador de sangre entera VetScan. En la reacción, el ácido 8-anilino-1-naftalén sulfónico (ANS) causa la liberación de T₄ endógena de las proteínas de fijación. La T₄ endógena liberada compite para sitios de fijación de anticuerpos (Ab) con la T₄ marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (conjugado G6PDH-T₄). El conjugado G6PDH-T₄ fijado a un anticuerpo tiene una menor actividad que el conjugado no fijado. A medida que aumenta la fijación de la T₄ endógena, aumenta también la cantidad de conjugado de enzima sin fijar. La enzima activa reduce la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) a NADH.

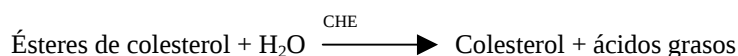


El índice de cambio de la absorbancia a 340 nm se debe a la conversión de NAD⁺ en NADH y es directamente proporcional a la cantidad de T₄ endógena en la muestra.

Colesterol

Las pruebas más comunes emplean reacciones enzimáticas de punto final. Típicamente, estos procedimientos sencillos usan colesterol esterasa y colesterol oxidasa con un acabado de Trinder^{5,6}. Abaxis desarrolló un método enzimático que usa colesterol deshidrogenasa en lugar de la colesterol oxidasa. El uso de la colesterol deshidrogenasa elimina la reacción de Trinder, evitando así la interferencia de los sustratos fisiológicos como la bilirrubina y la hemoglobina.

La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol y H₂O para formar colesterol y ácidos grasos. El colesterol es oxidado por colesterol deshidrogenasa a colesteno y la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) se reduce a NADH.



La absorbancia se mide bicromáticamente a 340 nm y 405 nm. También se mide una muestra de referencia dedicada a asegurar que las reacciones secundarias no interfieren con los cálculos de los niveles de colesterol. La producción de NADH en esta reacción de punto final es directamente proporcional a la cantidad de colesterol en la muestra.

4. Principios de la operación

Consulte el Manual del usuario del analizador químico VetScan para obtener información sobre los principios y limitaciones del procedimiento.

5. Descripción de los reactivos

Reactivos

Cada rotor reactivo T4/colesterol VetScan contiene soportes sólidos reactivos específicos para pruebas secas. Se incluye en cada rotor reactivo un reactivo seco de muestra de referencia (que consta de amortiguador, surfactantes, excipientes y estabilizadores) para usar en el cálculo de los índices de la muestra. Cada rotor reactivo contiene también un disolvente formado por surfactantes, ANS, anticuerpos a T₄ y estabilizadores.

Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*
- El envase del diluyente del rotor reactivo se abre automáticamente cuando se cierra el cajón del analizador. No puede reutilizarse un rotor con un envase de diluyente abierto. Asegúrese de que la muestra o la prueba esté colocada en el rotor antes de cerrar el cajón.
- El reactivo en soporte sólido puede contener sustancias ácidas o cáusticas. El usuario no entra en contacto con el reactivo en soporte sólido si sigue los procedimientos recomendados. En el caso de que se manipule el reactivo en soporte sólido (por ejemplo, limpieza tras caerse y romperse un rotor reactivo) se debe evitar la ingestión, el contacto con la piel y la inhalación del mismo.
- El reactivo en soporte sólido y el diluyente contienen compuestos nitrogenados sódicos que pueden reaccionar con plomo y cobre para formar compuestos nitrogenados metálicos muy explosivos. Los reactivos no entrarán en contacto con el plomo y cobre si se siguen los procedimientos recomendados. Sin embargo, si los reactivos entran en contacto con los metales, se debe lavar abundantemente con agua para prevenir la acumulación de azida.

Instrucciones para la manipulación de los reactivos

Los rotores reactivos pueden usarse inmediatamente después de retirarse del refrigerador, sin calentarlos previamente. Abra la bolsa de cierre hermético y saque el rotor, teniendo cuidado de no tocar el anillo del código de barras situado en la parte superior del rotor reactivo. Utilice de acuerdo con las instrucciones provistas en el Manual del usuario del sistema VetScan. Deseche los rotores no usados transcurridos 20 minutos de la apertura de la bolsa. Los rotores dentro de bolsas abiertas no pueden volver a colocarse en el refrigerador para uso en otro momento.

Almacenamiento

Almacene rotores reactivos en sus bolsas selladas a 2-8°C (36-46°F). No exponga los rotores abiertos o sin abrir a la luz solar directa o a temperaturas superiores a los 32°C (90°F). No permita que los rotores sellados en sus bolsas de aluminio permanezcan a temperatura ambiente más de 24 horas antes del uso. Abra la bolsa y retire el rotor inmediatamente antes de usarlo.

Indicaciones de inestabilidad o deterioro del rotor reactivo

- Todos los reactivos contenidos en el rotor reactivo, cuando se almacena tal como se describe más arriba, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa del rotor. **No** utilice un rotor después de la fecha de caducidad. La fecha de caducidad también aparece codificada en el código de barras impreso en el anillo del código de barras. Si los reactivos han caducado, aparecerá un mensaje de error en la pantalla del analizador de sangre entera VetScan.
- Una bolsa desgarrada o dañada puede hacer que el rotor sin uso entre en contacto con la humedad, lo que puede afectar el rendimiento del reactivo de manera negativa. No utilice un rotor de una bolsa dañada.

6. Instrumento

Consulte el Manual del usuario del sistema VetScan para recibir información completa sobre el uso del analizador.

7. Obtención y preparación de las muestras

El tamaño mínimo necesario para la muestra es ~100 µl de sangre entera heparinizada, plasma heparinizado, suero o suero de control. La cámara de muestra del rotor reactivo puede contener hasta 120 µl de muestra.

- La muestra recogida en una micropipeta heparinizada debe dispensarse en el rotor reactivo **inmediatamente** después de la recolección de la muestra.
- Para las muestras de sangre o plasma use sólo tubos de recolección de muestras tratados con heparina litio (tapón verde). Para las muestras de suero use tubos para obtención de muestras sin aditivo (tapón rojo) o tubos separadores de suero (tapón rojo o rojo/negro).
- Las muestras de sangre entera obtenidas por venopunción deben homogeneizarse antes de transferir una muestra al rotor reactivo. Invierta cuidadosamente los tubos para obtención de muestras varias veces justo antes de transferir la muestra. **No** agite el tubo de recolección. La agitación puede causar hemólisis.
- La prueba debe comenzarse en los 10 minutos siguientes a la transferencia de la muestra al rotor reactivo.
- Las muestras de sangre entera obtenidas por venopunción deben analizarse en los 60 minutos de la recolección; si esto no es posible, separe la muestra y transfírela a un tubo de ensayo limpio⁷. Analice la muestra separada de plasma o suero en las 5 horas siguientes a la centrifugación. Si esto no es posible, refrigere la muestra en un tubo de ensayo tapado a 2-8°C (36-46°F) durante no más de 48 horas. Una muestra de plasma o suero puede almacenarse a -10°C (14°F) durante un máximo de 5 semanas en un congelador que no tiene un ciclo de autodescongelación.

Sustancias conocidas como interferencias

- El único anticoagulante recomendado para uso con el analizador de sangre entera VetScan es heparina de litio.
- Los interferentes físicos (hemólisis, ictericia y lipidemia) pueden causar cambios en las concentraciones informadas de algunos analitos. Los índices de la muestra son impresos en la base de cada tarjeta de resultados para informar al usuario sobre los niveles de factores de interferencia presentes en cada muestra. El analizador de sangre entera VetScan suprime cualquier resultado que sea afectado por más del 10% de interferencia por hemólisis, lipidemia o ictericia. “HEM”, “LIP” o “ICT” se imprime en la tarjeta de resultado en vez del resultado.

8. Procedimiento

Materiales suministrados

- Un rotor reactivo de T4/colecsterol VetScan

Materiales necesarios pero no suministrados

- Analizador químico de sangre entera VetScan

Parámetros de prueba

El sistema VetScan opera a temperaturas ambientes entre 15°C y 32°C (59-90°F). El tiempo de análisis para cada rotor reactivo T4/colecsterol VetScan es de menos de 14 minutos. El analizador mantiene el rotor reactivo a una temperatura de 37° C (98,6° F) durante el intervalo de medición.

Procedimiento de prueba

La recolección completa de la muestra y los procedimientos paso por paso se detallan en el Manual del usuario del sistema VetScan.

Calibrado

El analizador de sangre entera VetScan es calibrado por el fabricante antes de ser enviado. El código de barras impreso en el anillo del código de barras proporciona al analizador los datos de calibración específicos del rotor. Consulte el Manual del usuario del sistema VetScan.

Control de calidad

Pueden analizarse controles periódicamente en el analizador de sangre entera VetScan para verificar la exactitud del analizador. Abaxis recomienda analizar un control comercialmente disponible, basado en suero. Los controles deben analizarse en el rotor reactivo de la misma manera que las muestras de pacientes. Consulte el Manual del usuario del sistema VetScan para aprender cómo analizar los controles.

9. Resultados

El analizador de sangre entera VetScan calcula automáticamente e imprime las concentraciones de electrolitos en la muestra. Los detalles de los cálculos del criterio de valoración y velocidad de la reacción se encuentran en el Manual del usuario del sistema VetScan.

Interpretación de resultados

Aumento de T₄

- Las concentraciones de T₄ tienden a ser superiores en los perros de menos de un año de edad, disminuyendo a medida que envejece el perro.
- Un aumento en el nivel de T₄ en un felino es un indicador fiable de hipertiroidismo. El hipertiroidismo es la causa más común de T₄ elevada y es una de las enfermedades diagnosticadas con mayor frecuencia en animales pequeños. La causa típica del hipertiroidismo espontáneo en los gatos es un adenoma tiroideo funcional. El hipertiroidismo es raramente observado en perros pero, cuando aparece, por lo general es indicativo de neoplasia o la administración de demasiada levotiroxina sódica a un perro hipotiroideo. Aproximadamente el 66% de los neoplasmas caninos son adenocarcinomas.

- Las pruebas tiroideas felinas por lo general se realizan para diagnosticar hipertiroidismo, para controlar los efectos del tratamiento antitiroideo o para controlar el tratamiento de reemplazo tiroideo después de la destrucción de las glándulas tiroideas neoplásicas. Al evaluar la T₄ total en gatos, se debe tener en cuenta la edad y las enfermedades concurrentes. Los valores de T₄ son mayores en los gatos más jóvenes y normalmente disminuyen con la edad. En gatos de mayor edad con sospecha de hipertiroidismo, las enfermedades concurrentes como insuficiencia renal causan una condición conocida como síndrome de enfermedad eutiroida, que puede deprimir los valores de la T₄ total. En estos casos, se utiliza una prueba de T₄ libre por diálisis de equilibrio (fT₄ED) para confirmar un diagnóstico de hipertiroidismo.
- Tres condiciones comunes requieren confirmación con la prueba fT₄ED. Los valores altos normales de T₄ (3-5 mg/dl) en un gato joven sin pérdida marcada de peso son normales. Los valores altos (>5 mg/dl) en un gato de mayor edad con señales de pérdida de peso es por lo general un diagnóstico de hipertiroidismo. Los valores altos normales (3-5 mg/dl) en un gato de mayor edad pueden indicar hipertiroidismo. Dado que estos valores pueden suprimirse por enfermedad concurrente, es necesaria una prueba para la hormona activa (fT₄ED) para diagnosticar este hipertiroidismo oculto.

Disminución de T₄

- En perros, el valor de T₄ total puede usarse para eliminar un diagnóstico de hipotiroidismo. Si la T₄ total se encuentra dentro del intervalo normal, es muy poco probable que el perro sea hipotiroideo. Un valor bajo o bajo normal de T₄ puede sugerir hipotiroidismo, sin confirmarlo, porque hay factores no tiroideos, tales como fármacos y enfermedad, que afectan la T₄. Un diagnóstico de hipotiroidismo en perros puede confirmarse por medio de una prueba de T₄ libre por diálisis de equilibrio (fT₄ED).
- Otras causas de una disminución de los niveles de T₄ pueden estar asociados con la terapia de fármacos y con el síndrome de enfermedad eutiroida. Los glucocorticoides son los fármacos más clínicamente relevantes que afectan los niveles de T₄. En el síndrome de enfermedad eutiroida, la disminución de los niveles de T₄ se observan con enfermedades no tiroideas, tales como insuficiencia renal aguda y crónica, diabetes mellitus, insuficiencia hepática y obesidad.
- Después de eliminar la terapia con fármacos y el síndrome de enfermedad eutiroida, la causa más común de la disminución de niveles de T₄ es el hipotiroidismo primario. El hipotiroidismo en perros es con más frecuencia un resultado de la tiroiditis linfocítica o de la atrofia idiopática. Los tumores tiroideos que hayan destruido más del 75% de la glándula tiroidea pueden causar señales clínicas de hipotiroidismo. Los defectos congénitos de la glándula pituitaria, la destrucción pituitaria y la supresión pituitaria pueden causar un hipotiroidismo secundario en los perros.
- Raras veces se informa de hipotiroidismo espontáneo en los gatos. Las causas comunes de hipotiroidismo felino son la tiroidectomía bilateral y las sobredosis de yodo radiactivo o fármacos antitiroideos en gatos hipertiroides.
- Los pacientes hipotiroideos también pueden tener concentraciones elevadas de colesterol.
- Para obtener una concentración basal exacta de T₄, debe suprimirse la administración de los medicamentos al paciente durante varios días.

Hipercolesterolemia

- Una dieta de alto contenido graso o una muestra de sangre recogida poco después de que el paciente haya comido puede causar hipercolesterolemia. La hipercolesterolemia no es aparente al realizarse un examen visual de la muestra dado que no causa lipemia.
- Una reducción en la actividad tiroidea causa una disminución en el catabolismo del colesterol, resultando en niveles elevados de colesterol. La observación de un elevado nivel de colesterol en un perfil de detección puede ser el primer indicador de hipotiroidismo. El colesterol, cuando se utiliza junto con los niveles de T₄ libre, es un buen indicador de hipotiroidismo canino.
- Un diagnóstico preliminar de hiperlipidemia puede hacerse usando los niveles de colesterol y el índice lipémico impreso en la tarjeta de resultados VetScan. Las concentraciones de colesterol mayores a 300 mg/dl junto con un índice lipémico de 2+ o 3+ pueden indicar hiperlipidemia en perros en ayunas. La hiperlipidemia felina puede diagnosticarse cuando se observan concentraciones de colesterol mayores a 200 mg/dl y un índice de 1+ o superior en gatos en ayunas.
- Los niveles bajos de colesterol por lo general no representan un problema. Se ha observado hipocolesterolemia en el caso de enteropatía con pérdida de proteína, algunas enfermedades hepáticas, ciertas malignidades y una malnutrición grave. Deben examinarse los resultados de las pruebas de alanina aminotransferasa (ALT), albúmina, fosfatasa alcalina (ALP), globulina, bilirrubina total y proteína total, en caso de sospecharse enfermedad hepática. Pueden observarse bajos niveles de proteína, albúmina y globulina en casos de enteropatías con pérdida de proteína y malnutrición.

10. Limitaciones del procedimiento

Las limitaciones generales del procedimiento se detallan en el Manual del usuario del sistema VetScan.

- Si un resultado para una prueba particular supera los valores del análisis, la muestra deberá analizarse por otro método de prueba homologada o enviarse a un laboratorio de referencia. No diluya la muestra ni vuelva a analizarla en el analizador de sangre entera VetScan.
- Las muestras con hematocritos que excedan del 60% de volumen corpuscular de eritrocitos darán resultados inexactos. Las muestras con un hematocrito elevado pueden ser analizadas como hemolizadas. Estas muestras pueden ser centrifugadas y luego volver a analizar el plasma con un nuevo rotor reactivo.
- El método de T₄ de Abaxis es susceptible a interferencia por el autoanticuerpo a T₄. En los raros casos en que hay presencia de autoanticuerpo a T₄ en una muestra, los resultados de T₄ serán bajos.

Advertencia: Pruebas exhaustivas del sistema VetScan han demostrado que, en casos muy raros, la muestra aplicada al rotor reactivo podría no fluir con facilidad a la cámara de la muestra. Debido al flujo irregular, puede analizarse una cantidad inadecuada de muestra y los resultados obtenidos pueden quedar fuera de los valores de referencia establecidos. La muestra puede volverse a analizar con un nuevo rotor reactivo.

11. Valores esperados

Los valores normales más definitivos son aquellos establecidos para su población de pacientes. Los resultados deben interpretarse conjuntamente con las señales clínicas del paciente.

Los animales deben estar en ayunas durante 12 horas antes de extraerse la muestra, de modo que las concentraciones de colesterol no queden influenciadas por una comida recientemente consumida.

Tabla 1: Intervalos de referencia caninos y felinos

Analito	Canino	Felino
Tiroxina (T ₄)	1,1 – 4,0 ug/dl (14,2 – 52,0 nmol/l)	1,5 – 4,8 ug/dl (19,4 – 61,9 nmol/l)
Colesterol	125 – 270 mg/dl (3,24 – 6,99 mmol/l)	90 – 205 mg/dl (2,33 – 5,31 mmol/l)

12. Características de eficacia

Linealidad

La química para cada analito es lineal a lo largo del intervalo dinámico enumerado a continuación cuando el sistema VetScan se opera de acuerdo con el procedimiento recomendado (consulte el manual del usuario del sistema VetScan). La tabla de intervalos dinámicos que aparece a continuación representa el espectro que puede detectar el sistema VetScan.

Tabla 2: Intervalos dinámicos de VetScan

Analito	Intervalo dinámico Unidades comunes	Unidades SI
Tiroxina (T ₄)	0,5 – 8,0 ug/dl	(6,5 – 103,2 nmol/l)
Colesterol	20 – 520 mg/dl	0,5 – 8,4 mmol/l

Precisión

Los estudios de precisión fueron conducidos mediante las recomendaciones NCCLS EP5-A⁸, con modificaciones basadas en NCCLS EP18-P⁹ para equipos utilizados en unidad. Los resultados para los análisis intraserials y de precisión total fueron determinados evaluando controles de dos niveles. Los controles fueron analizados por duplicado, dos veces al día, a lo largo de un período de una semana.

Tabla 3: Precisión

Analito	Tamaño de la muestra	Intraserial	Total
Tiroxina (T₄) (ug/dl)	n=40		
<u>Control 1</u>			
Media		1,5	1,5
DE		0,15	0,19
% VR		9,6	12,5
<u>Control 2</u>			
Media		6,0	6,0
DE		0,32	0,33
% VR		5,3	5,4
Colesterol (mg/dl)	n=40		
<u>Control 1</u>			
Media		155,5	155,5
DE		3,96	4,0
% VR		2,5	2,6
<u>Control 2</u>			
Media		313,4	313,4
DE		9,7	9,7
% VR		3,10	3,10

Coefficiente

Fueron realizados estudios en terreno en un hospital de enseñanza de medicina veterinaria. El analizador de sangre entera VetScan y un método comparativo analizaron muestras de suero para el ensayo de tiroxina. En la tabla 4 se muestran las estadísticas de correlación representativas.

Tabla 4: Correlación del sistema VetScan con uno o más métodos comparativos

Tiroxina (ug/dl)	Canino	Felino
Coefficiente de correlación (r)	0,96	0,96
Pendiente	0,82	0,94
Intercepción	0,16	0,10
Límites de la muestra	0,5 – 7,1	1,2 – 8,3
n	40	42
Colesterol (mg/dl)	Canino	Felino
Coefficiente de correlación (r)	0,99	0,99
Pendiente	0,99	1,06
Intercepción	6	-3
Límites de la muestra	103 – 450	63 – 257
n	159	34

13. Bibliografía

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.

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.

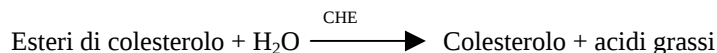


La velocità di variazione dell'assorbanza a 340 nm è dovuta alla conversione di NAD⁺ in NADH ed è direttamente proporzionale alla T₄ endogena presente nel campione.

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 colesteno e il nicotinammide adenin dinucleotide (NAD⁺) viene ridotto in NADH.



L'assorbanza viene misurata bicompativamente 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 autoscongelo.

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.