

Determinazione dell'etanolo con metodo enzimatico su matrici diverse

Luisa Galla¹, Lucio Marchioro¹, Mariela Marinova¹, Carlo Artusi¹, Martina Zaninotto², Daniela Basso², Mario Plebani³

¹Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università Padova

²Università degli Studi di Padova

³QI.LAB.MED.- Spin-off dell'Università di Padova

ABSTRACT

Determination of ethanol using an enzymatic method in different matrices

Introduction: this study was designed to measure ethyl alcohol concentrations in blood samples of different matrices (Li-He plasma, K₂-EDTA plasma and serum) with the DRI[®] method on the ILab Taurus analyzer. The aim of the protocol was to compare the values between the matrices K₂-EDTA and serum with Li-He plasma. Furthermore, 18 real samples from the emergency room were used to compare the results obtained with the enzymatic method on both Li-He and K₂-EDTA plasma in comparison with the GC/HS reference method.

Methods: serum, Li-He and K₂-EDTA samples were obtained from left-over routine samples to obtain different pools (serum, Li-He plasma and K₂-EDTA plasma pools). Samples with different expected concentrations of ethanol (range 0.00-2.22 g/L) were prepared *in situ* (60 samples for each matrix) by precise additions of a 10% ethanol solution. All these samples were stored at -20°C until use.

Results: in the expected concentration range between 0.42 and 0.85 g/L and around 0.8 and 1.5 g/L [which incorporates most of the legally permitted levels of BAC (Blood Alcohol Concentration) in Europe including Italy] the CV% obtained are all <5.0%. The GC/HS correlation with ILab Taurus for both plasma matrices, LI-He and K₂-EDTA evaluated in 18 genuine samples was excellent.

Discussion: all the obtained results show that for all the matrices evaluated in the study, the analytical performances are highly satisfactory.

Parole chiave: etanolo, matrice, validazione metodi

INTRODUZIONE

La maggior parte degli esami vengono eseguiti nel laboratorio clinico per identificare la concentrazione di vari costituenti ematici (analiti) presenti nella frazione liquida del sangue (1).

La scelta di appropriati anticoagulanti permette di ottenere, dopo centrifugazione, la porzione liquida del sangue (plasma) che, a differenza della matrice siero, contiene sia il fibrinogeno che altri fattori della coagulazione nel loro stato originale. Il plasma così ottenuto è molto simile a quello circolante: dal punto di vista analitico e diagnostico, ciò consente la massima rappresentatività del campione *in vitro* rispetto allo stato *in vivo* del paziente (1). Storicamente il siero è stato utilizzato prima del plasma in quanto più semplice da ottenere diventando nel tempo il campione più utilizzato per i test di chimica clinica (1) relegando ad un 26% di

utilizzo in Europa (nel 2016) della matrice plasma rispetto a quella sierica (1). Entrambe le matrici presentano vantaggi e svantaggi (1) ponendo, però, a completo favore del plasma, la possibilità della sua immediata centrifugazione subito dopo l'esecuzione del prelievo di sangue, vantaggio da ritenersi quasi prioritario per gli analiti misurati in regime di urgenza.

A fronte del fenomeno di abuso alcolico che, come periodicamente riportato dai rapporti ufficiali dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (2,3) ha assunto, non solo in Italia ma anche in Europa e nel Mondo, una entità molto preoccupante per tutte le conseguenze fisiopatologiche legate al suo consumo (2,3), è necessario che il contributo della Medicina di Laboratorio sia rivolto a risolvere o a trovare una risposta a tutte le problematiche relative ad una corretta determinazione della concentrazione di etanolo nel sangue.

Corrispondenza a: Lucio Marchioro, Dipartimento Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università Padova
email: luma53@libero.it

Ricevuto: 17.10.2023

Revisionato: 27.10.2023

Accettato: 10.12.2023

Published on-line: 08.01.2024

DOI: 10.19186/BC_2023.095

Infatti un'accurata determinazione dei livelli di alcol nel sangue umano è fondamentale per fornire validi risultati destinati sia a studi di ricerca che di diagnostica clinico-tossicologica, con possibili implicazioni forensi (4).

La standardizzazione dei metodi e la conoscenza approfondita delle differenze tra metodi e soprattutto della loro applicabilità su diverse tipologie di campione biologico, sono fondamentali per garantire l'accuratezza della concentrazione di alcol misurata (4). Come per molti altri misurandi, anche per l'etanolo è necessario quindi procedere alla verifica della confrontabilità dei livelli di alcol determinati nel plasma raccolto con diversi anticoagulanti, nel siero e nel sangue intero e della reale possibilità che tutte le matrici considerate forniscano risultati accurati e siano tutte utilizzabili nella pratica clinica.

È generalmente riconosciuto che i livelli di etanolo nel sangue intero sono inferiori a quelli del plasma o del siero dello stesso individuo in quanto i campioni di siero e plasma contengono più acqua del sangue intero. Allo stesso modo è stata dimostrata una buona equivalenza tra i risultati di etanolemia ottenuti su siero e plasma (4). Tuttavia, lo sviluppo di nuovi metodi enzimatici per la determinazione dell'etanolo impone al professionista di laboratorio di intraprendere le verifiche precedentemente citate.

A tale scopo e partendo dalla consapevolezza, come sopra riportato, che la matrice siero è ancora estesamente utilizzata dai laboratori anche in regime di urgenza, abbiamo realizzato un protocollo di valutazione di un metodo enzimatico che a seguito di recenti modifiche applicative attuate dal Produttore non risulta ancora rilasciato per le tre classiche matrici: plasma Litio-eparina (Li-He), plasma EDTA-K₂ e siero. La matrice di riferimento è il plasma Li-He, che è la matrice utilizzata nell'UOC Medicina di Laboratorio di Padova, sia in regime di urgenza che di routine.

METODI

Valutata la difficoltà di ottenere, in un periodo di tempo accettabile per la sperimentazione, un numero significativo di campioni reali positivi all'etanolo (in plasma Li-He inviati al laboratorio dal Pronto Soccorso in regime di urgenza) la raccolta e un aggiuntivo allestimento di campioni sono stati effettuati secondo uno specifico protocollo.

In particolare, 18 campioni reali (campioni residui in plasma Li-He, provenienti da pazienti diversi) positivi all'etanolo, misurati in tempo reale al loro arrivo in laboratorio in regime d'urgenza con il metodo enzimatico DRI® (Werfen Company, Milano-Italia) applicato allo strumento I Lab Taurus [Instrumentation Laboratory (Werfen Company) Milano], sono stati in seguito analizzati anche su plasma EDTA-K₂. Per la matrice plasmatica Li-He è stata eseguita l'analisi di conferma in gascromatografia con spazio di testa (GC/HS) (GC/Head Space 7967A, Agilent, Santa Clara, CA, USA.).

Il protocollo ha inoltre previsto la preparazione di 3 pool di plasma Li-He, plasma EDTA-K₂ e siero (ricavati

da campioni residui e provenienti da soggetti diversi) da utilizzare come matrici base per l'allestimento di 60 campioni (per ciascuna matrice) addizionati con precise quantità di una soluzione di Etanolo 10%, per coprire un intervallo di misura clinicamente significativo (concentrazione <0,1 g/L cioè nessuna aggiunta di Etanolo 10%, concentrazione intorno al valore decisionale di 0,5 g/L e concentrazioni elevate (1,5-2,0 g/L) in accordo con il documento CLSI EP 35 (5). Per ragioni di tipo organizzativo non tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi lo stesso giorno della loro preparazione. Le diverse aliquote (come pure i campioni reali residuali) sono state quindi conservate a -20°C fino al momento del loro utilizzo. Allo scopo di "normalizzare" la matrice, in ogni seduta analitica è stato analizzato un numero uguale di aliquote per ogni diversa matrice, con la stessa concentrazione teorica e scegliendo una sequenza casuale per l'ordine di caricamento dei campioni nell'analizzatore (5). Tutte le determinazioni enzimatiche sono state eseguite su I Lab Taurus secondo le specifiche del Produttore. I campioni sono stati analizzati sempre dallo stesso operatore, in una singola serie analitica giornaliera, in un arco temporale di circa 15 giorni. Il protocollo attuato è stato appositamente studiato considerando due variabili principali: l'arco temporale di almeno 10 giorni per lo studio dell'imprecisione tra i giorni e scegliendo per i campioni addizionati (artificiali) un ambito di concentrazione di maggior interesse clinico. In particolare, ciascun campione per ciascuna delle tre matrici (compreso quello non addizionato) è stato analizzato in duplicato per tre volte nello stesso giorno distribuendo l'attività analitica in 13 giorni.

Per tutta la durata dello studio sono stati utilizzati i materiali di controllo forniti dal produttore (MAS Alcohol/Ammonia Control, ThermoScientific): Livello 1 (valore assegnato: 0,4 g/L) e Livello 2 (valore assegnato: 1,51 g/L).

Per l'analisi statistica, i risultati ottenuti sono stati confrontati secondo il metodo di Bland-Altman [bias e intervallo di confidenza al 95% (IC95%)] mentre la concordanza dei valori è stata valutata utilizzando la regressione lineare e la regressione Passing-Bablok. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando Analyse-it per Microsoft Excel (Analyse-it, Software Ltd., Leeds, Regno Unito).

Il protocollo dello studio (numero 23307) è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Padova ed è stato condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki. La necessità del consenso informato è stata omessa per quanto riguarda il disegno dello studio (retrospettivo) effettuato su campioni residui.

RISULTATI

Lo studio dell'imprecisione (coefficiente di variazione percentuale, CV%) per le tre diverse matrici alle varie concentrazioni di etanolo ha fornito CV tutti <5% con valori medi pari a 2,7, 2,6 e 1,5% per siero, plasma EDTA-K₂ e plasma Li-He rispettivamente. Relativamente alla concentrazione <0,1 g/L (campione

non addizionato) i valori di CV% per le tre diverse matrici non sono stati considerati in quanto corrispondenti ad un campione a concentrazione di etanolo inferiore al Limite di Quantificazione (LoQ) del metodo oggetto della sperimentazione.

Sulla base di quanto previsto dal documento CLSI (5), per ciascun livello di concentrazione di etanolo e per ciascuna matrice, sono stati calcolati i rapporti (ratio) tra le diverse matrici considerate, delle imprecisioni espresse come CV% e come deviazione standard (DS): siero/Li-He; EDTA-K₂/Li-He (Tabella 1).

Il confronto tra le matrici siero e Li-He, effettuato su 63 coppie di campioni in un intervallo di concentrazioni teoriche <0,1-2,22 g/L, ha generato una retta di regressione secondo Passing-Bablok di $y=0,99x-0,00$ (IC95% per la pendenza 0,99-1,00; IC95% per l'intercetta da -0,01 a 0,00) con un bias percentuale (secondo Bland-Altman) statisticamente significativo di -1,8% (IC95% da -2,3% a -1,3%) (Figura 1).

Nel confronto tra le matrici EDTA-K₂ e Li-He, effettuato sullo stesso numero di campioni e per lo stesso intervallo di concentrazione, è risultata una retta di regressione di $y=1,02x+0,01$ (IC95% per la pendenza 1,02-1,03; e per l'intercetta 0,01-0,01) con un bias percentuale statisticamente significativo di 4,4% (IC95% 3,9%-4,9%) (Figura 2).

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati dei 18 campioni plasmatici reali (per le matrici Li-He ed EDTA-K₂) ottenuti su ILabTaurus misurati con il metodo DRI® in confronto a quelli ottenuti solo su plasma Li-He con il metodo di riferimento GC/HS.

DISCUSSIONE

Lo studio dell'imprecisione ha dimostrato, per tutte e tre le matrici alle varie concentrazioni, CV%, mediamente inferiori al 3%. Inoltre, come si può rilevare dai dati riportati in Tabella 1, i risultati ottenuti in corrispondenza degli intervalli di concentrazione prossimi ai valori di Blood Alcohol Concentration (BAC) corrispondenti a 0,5, 0,8 e 1,5 g/L (valori soglia con valore legale nel nostro

Paese) presentano CV% <3,2% per le due matrici di plasma mentre nella matrice siero (comunque solo in un unico caso con $X_m=0,68$ g/L) è stato rilevato un CV% di 4,1.

Relativamente al confronto tra matrici, quando Li-He è stata considerata come matrice di riferimento, sono stati osservati due diversi comportamenti della matrice siero e di EDTA-K₂ versus Li-He. Mentre per il siero è emersa una sottostima dei valori (bias% -1,8), per EDTA-K₂ è risultata una sovrastima (bias% 4,4): entrambi i bias sono risultati statisticamente significativi ($p_{\text{siero}} < 0,0001$ e $p_{\text{EDTA-K}_2} < 0,0001$).

Inoltre, relativamente ai risultati ottenuti sui campioni reali, riportati nella Tabella 2, pur mancando il confronto della matrice siero con GC/HS (per l'evidente impossibilità di disporre di campioni reali positivi all'etanolo su questa matrice) si può notare un comportamento sovrapponibile delle due matrici plasmatiche nel metodo di riferimento. Infatti i bias ottenuti per EDTA-K₂ e Li-He sono rispettivamente del -0,6% (IC95% da -2,1 a 0,9%) e -0,9% (IC95% da -2,3 a 0,5%), entrambi statisticamente non significativi: $p_{\text{EDTA-K}_2} 0,3911$ e $p_{\text{Li-He}} 0,1889$, a ulteriore dimostrazione dell'affidabilità analitica del metodo enzimatico. Un limite al confronto con il metodo di riferimento può essere rappresentato dalla mancanza di campioni reali con valori vicini al valore soglia con valore legale in Italia. Com'è facilmente comprensibile non è stato possibile scegliere o programmare i campioni per la determinazione dell'alcoemia provenienti dal Pronto Soccorso. Un limite generale dello studio, a nostro avviso marginale, potrebbe essere rappresentato dal fatto che il confronto tra matrici, anche con il metodo di riferimento, è stato fatto con campioni addizionati (artificiali): alternative diverse non erano peraltro percorribili.

Nonostante gli indubbi vantaggi che la matrice plasma (Li-He) assicura per la maggior parte dei costituenti biochimici ematici (anche in regime di urgenza, Etanolemia compresa) la matrice siero, come evidenziato dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dello studio è la matrice maggiormente utilizzata nei laboratori (1).

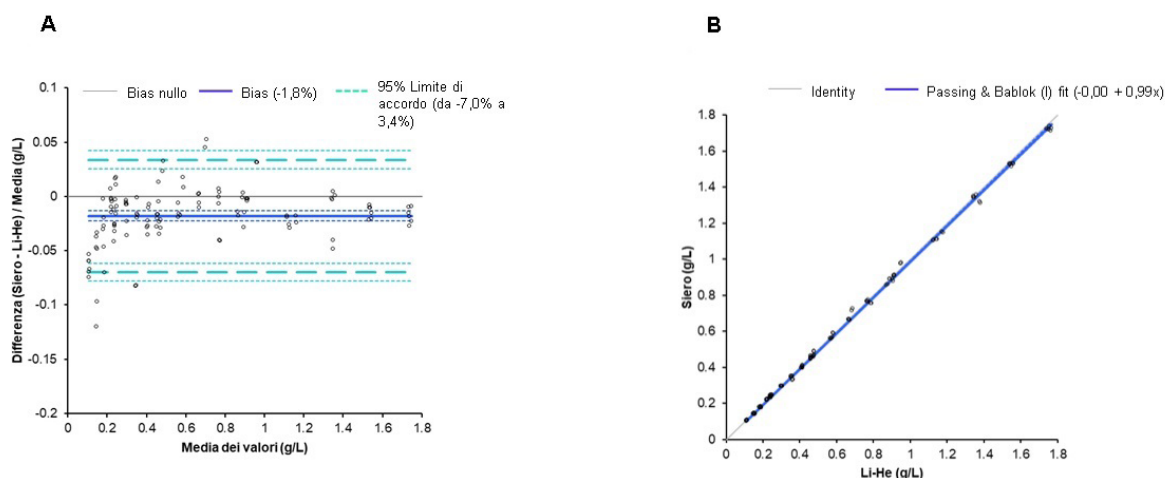


Figura 1

Confronto tra matrici (siero versus Li-He): pannello A, grafico di Bland-Altman; pannello B, regressione di Passing & Bablok.

Nel grafico di Bland-Altman (A) sono riportati in blu il bias (linea continua) ed il relativo intervallo di confidenza al 95% (linee tratteggiate), e in verde i limiti di accordo (tratteggio lungo), che includono il 95% delle differenze, ed i relativi intervalli di confidenza al 95% (tratteggio breve). Nel grafico di regressione di Passing-Bablok (B), in grigio e in blu sono indicate, rispettivamente, la linea di identità e la retta di regressione.

Tabella 1
Studio di imprecisione: deviazione standard (DS), coefficiente di variazione (CV%), e i rispettivi rapporti (95% Intervallo di Confidenza) dei campioni addizionati nelle diverse matrici utilizzate

Concentrazione teorica (g/L)	Siero			EDTA-K ₂			Li-He			siero/Li-He (IC95%)			EDTA-K ₂ /Li-He (IC95%)				
	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%	Media	DS	CV%		
0,12	0,11	0,0019	1,79	0,12	0,0036	3,00	0,11	0,0019	1,73	0,97	(0,36-2,60)	1,04	(0,39-2,78)	1,84	(0,69-4,91)	1,73	(0,65-4,63)
0,17	0,14	0,0032	2,25	0,16	0,0048	2,98	0,15	0,0032	2,12	1,00	(0,37-2,66)	1,06	(0,40-2,84)	1,47	(0,55-3,94)	1,41	(0,53-3,76)
0,22	0,18	0,0020	1,12	0,20	0,0071	3,51	0,19	0,0039	2,11	0,52	(0,19-1,38)	0,53	(0,20-1,43)	1,80	(0,67-4,82)	1,67	(0,62-4,46)
0,26	0,22	0,0017	0,78	0,24	0,0084	3,53	0,22	0,0023	1,05	0,73	(0,27-1,96)	0,74	(0,28-1,97)	3,60	(1,35-9,64)	3,34	(1,25-8,94)
0,28	0,23	0,0017	0,72	0,25	0,0029	1,15	0,24	0,0017	0,69	1,02	(0,38-2,73)	1,05	(0,39-2,81)	1,76	(0,66-4,70)	1,67	(0,62-4,46)
0,29	0,24	0,0027	1,11	0,25	0,0144	5,63	0,24	0,0039	1,60	0,70	(0,26-1,86)	0,69	(0,26-1,85)	3,68	(1,38-9,83)	3,52	(1,32-9,41)
0,36	0,30	0,0008	0,26	0,33	0,0101	3,10	0,30	0,0037	1,22	0,21	(0,08-0,56)	0,21	(0,08-0,56)	2,76	(1,03-7,37)	2,53	(0,95-6,77)
0,42	0,34	0,0092	2,69	0,38	0,0097	2,55	0,36	0,0040	1,11	2,33	(0,87-6,23)	2,42	(0,90-6,46)	2,43	(0,91-6,51)	2,29	(0,86-6,12)
0,49	0,40	0,0057	1,41	0,43	0,0133	3,14	0,41	0,0024	0,59	2,35	(0,88-6,29)	2,40	(0,90-6,43)	5,53	(2,07-14,79)	5,36	(2,01-14,34)
0,56	0,45	0,0068	1,50	0,47	0,0099	2,10	0,46	0,0019	0,42	3,56	(1,33-9,52)	3,60	(1,35-9,63)	5,20	(1,94-13,89)	5,05	(1,89-13,50)
0,58	0,47	0,0152	3,22	0,50	0,0076	1,53	0,48	0,0026	0,55	5,76	(2,15-15,39)	5,81	(2,17-15,52)	2,88	(1,08-7,70)	2,75	(1,03-7,36)
0,71	0,57	0,0152	2,66	0,60	0,0088	1,46	0,57	0,0080	1,39	1,90	(0,71-5,08)	1,91	(0,72-5,11)	1,10	(0,41-2,95)	1,05	(0,39-2,81)
0,85	0,68	0,0280	4,09	0,72	0,0126	1,75	0,67	0,0094	1,40	2,98	(1,11-7,95)	2,93	(1,10-7,84)	1,34	(0,50-3,58)	1,26	(0,47-3,36)
0,98	0,76	0,0068	0,89	0,81	0,0110	1,35	0,77	0,0106	1,37	0,64	(0,24-1,70)	0,65	(0,24-1,73)	1,04	(0,39-2,77)	0,99	(0,37-2,64)
1,11	0,88	0,0159	1,80	0,91	0,0212	2,32	0,89	0,0151	1,69	1,05	(0,39-2,82)	1,07	(0,40-2,85)	1,41	(0,53-3,77)	1,37	(0,51-3,67)
1,15	0,93	0,0353	3,78	0,94	0,0282	2,99	0,92	0,0185	2,00	1,91	(0,71-5,10)	1,89	(0,71-5,06)	1,52	(0,57-4,08)	1,49	(0,56-3,99)
1,43	1,12	0,0220	1,96	1,17	0,0043	0,36	1,15	0,0227	1,98	0,97	(0,36-2,59)	0,99	(0,37-2,65)	0,19	(0,07-0,50)	0,18	(0,07-0,49)
1,70	1,34	0,0173	1,29	1,36	0,0270	1,98	1,36	0,0160	1,18	1,08	(0,41-2,90)	1,10	(0,41-2,94)	1,69	(0,63-4,51)	1,68	(0,63-4,50)
1,96	1,53	0,0063	0,41	1,57	0,0129	0,82	1,55	0,0082	0,53	0,77	(0,29-2,06)	0,78	(0,29-2,09)	1,57	(0,59-4,21)	1,55	(0,58-4,14)
2,22	1,72	0,0088	0,51	1,81	0,0136	0,75	1,75	0,0092	0,53	0,96	(0,36-2,56)	0,98	(0,36-2,61)	1,47	(0,55-3,94)	1,43	(0,54-3,83)

Li-He, linfo-eparina

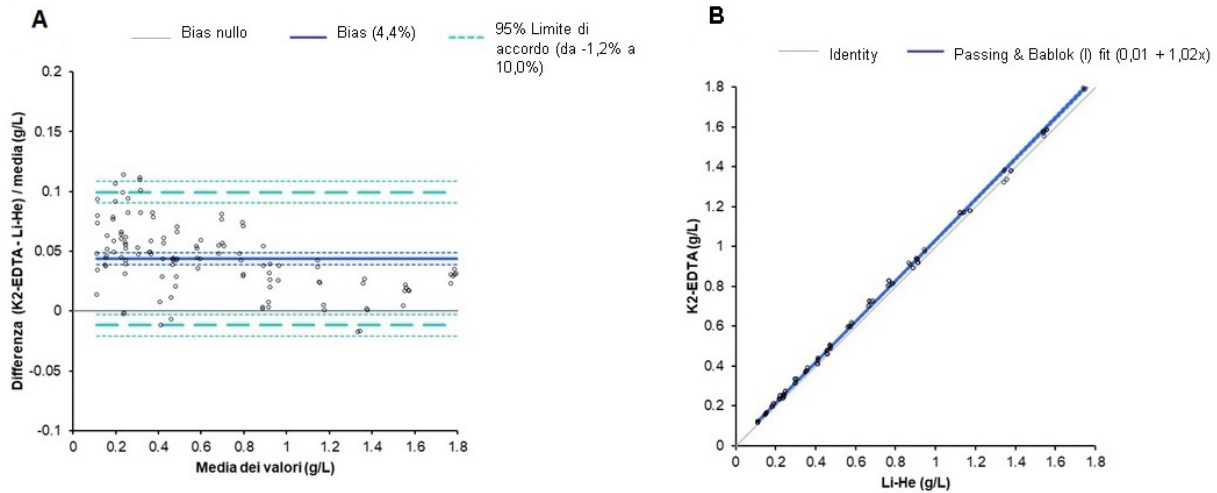


Figura 2
 Confronto tra matrici (EDTA-K₂ versus Li-He): pannello A, grafico di Bland-Altman, pannello B, regressione di Passing & Bablok. Nel grafico di Bland-Altman (A) sono riportati in blu il bias (linea continua) ed il relativo intervallo di confidenza al 95% (linee tratteggiate), e in verde i limiti di accordo (tratteggio lungo), che includono il 95% delle differenze, ed i relativi intervalli di confidenza al 95% (tratteggio breve). Nel grafico di regressione di Passing-Bablok (B), in grigio e in blu sono indicate, rispettivamente, la linea di identità e la retta di regressione.

Tabella 2
 Concentrazioni di etanolo misurato nei campioni reali di plasma Li-He e plasma EDTA-K₂ (entrambi determinati con metodo enzimatico DRI®) in confronto con la determinazione in gascromatografia su plasma Li-He [LOQ metodo DRI®: 0,10 g/L (dichiarato dal produttore), LOQ metodo GC/HS: 0,01 g/L].

Numero campione	Li-He (g/L)	EDTA-K ₂ (g/L)	GC-HS (Li-He, g/L)
17	<0,1	<0,1	0,05
16	<0,1	<0,1	0,06
18	<0,1	<0,1	0,06
13	<0,1	<0,1	0,13
9	0,98	0,99	1,03
2	1,36	1,34	1,41
10	1,66	1,67	1,61
14	1,64	1,64	1,69
8	1,87	1,86	1,91
6	2,39	2,44	2,42
15	2,39	2,44	2,44
1	2,78	2,82	2,73
7	3,01	2,97	2,96
12	3,12	3,09	3,06
11	3,10	3,13	3,16
5	3,35	3,34	3,41
3	3,88	3,86	3,84
4	3,97	4,01	4,02

Li-Hep, litio-eparina; LOQ, Limite di Quantificazione; GC-HS, gascromatografia con spazio di testa

I risultati del nostro studio confermano non solo quanto già evidenziato da altri autori relativamente all'ideoneità di utilizzo della matrice siero per la determinazione dell'etanolo (4) ma anche dimostrano la possibilità di utilizzare il plasma EDTA-K₂ garantendo comunque l'accuratezza dei risultati.

L'assorbimento e l'eliminazione dell'alcol nel corpo umano sono stati ben caratterizzati in passato (4). Sebbene lo scopo del nostro studio non sia stato quello di una verifica della farmacocinetica dell'etanolo, la confrontabilità dei risultati ottenuti indipendentemente dal tipo di campione o di metodo utilizzato (DRI® o GC/HS), consentono di confermare l'accuratezza, l'affidabilità oltre che la robustezza analitica con importanti implicazioni nella pratica clinica.

Rimane comunque nostra opinione che la matrice plasma (nello specifico Li-He) sia la matrice di scelta anche per aderire alla motivazione della OMS che indica il plasma come rappresentativo dello stato *in vivo* del paziente (1).

In conclusione, il razionale dello studio ed i risultati ottenuti evidenziano ancora una volta, il ruolo fondamentale della Medicina di Laboratorio nella gestione e soluzione di problematiche e criticità che possono sorgere in ambito sanitario e socio-economico; nel caso specifico, correlate ai rischi derivanti dal consumo dannoso di alcol come causa di oltre 200 affezioni o condizioni patologiche (2) e che immancabilmente emergono dalla cronaca e dallo svolgersi della vita quotidiana.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M, Banfi G, Bernardini S, Bondanini F, Conti L, Dorizzi R, et al. Serum or plasma? An old question looking for new answers. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:178-87.
2. Rapporti ISTISAN 22/1 – Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia e nelle Regioni, Rapporto 2022. https://www.iss.it/-/rapporti_istisan_22_1 (ultimo accesso: novembre 2023).
3. <https://www.epicentro.iss.it/alcol/conferenza-nazionale-alcol-2022> (ultimo accesso: novembre 2023).
4. Penetar DM, McNeil JF, Ryan ET e Lukas SE. Comparison among plasma, and whole blood ethanol concentrations: impact of storage conditions and collection tubes. *J Anal Toxicol* 2008;32,505-10.
5. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Assessment of Equivalence or Suitability of Specimen Types for Medical Laboratory Measurement Procedures, 1stEdition . CLSI document EP35. CLSI Wayne, PA, 2019