

Validação de metodologia analítica para determinação de oxalato na urina

C Grande¹, R Farinha², I Figueiredo², A Moreira^{1,3}, F Neves^{1,3} & M Sousa^{1,3}

¹Área Científica de Análises Clínicas e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, PORTUGAL

²Serviço de Patologia Clínica, Hospital de São João, EPE, Porto, PORTUGAL

³Centro de Investigação de Saúde e Ambiente, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, PORTUGAL

¹*carina_grande@hotmail.com*, ²*rmbfarinha@sapo.pt*

¹*www.estsp.ipp.pt*, ²*www.hsjoao.min-saude.pt*

RESUMO

A validação metodológica permite evidenciar se os resultados obtidos por um método são confiáveis, tornando-se um elemento essencial na qualidade.

Neste estudo, cujo objectivo é validar a metodologia enzimática para determinação de oxalato na urina, incluíram-se 30 amostras de urina de 24 horas, pré-tratadas e estudadas em dois auto-analisadores.

Os valores dos limites de detecção e quantificação foram 0,98 e 0,79 mg/L, respectivamente. Para a exactidão obteve-se $p=0,713$. Na precisão intermédia entre corridas não existem diferenças estatisticamente significativas, em oposição às repetições. Para a linearidade obteve-se $r=1$ e a sensibilidade foi 0,6%. Conclui-se que o método se mostrou exacto e linear.

Palavras-Chave: Validação, Parâmetros de validação, Oxalato urinário

ABSTRACT

Method validation gives evidence if the results obtained by a method are reliable, making it an essential element in quality.

In this study, whose aim is to validate the enzymatic method for determination of oxalate in urine, were included 30 urine samples of 24 hours, pre-treated and studied in two auto-analyzers.

The values of limit of detection and limit of quantification were 0.98 and 0.79 mg / L, respectively. For the trueness was obtained $p=0,713$. In the intermediate precision, it appears that between runs there aren't differences statistically significant, as opposed to repetitions. For the linearity was obtained $r=1$ and a sensitivity of 0.6%. We concluded that the method was exact and linear.

Keywords: Validation, Validation parameters, Urinary Oxalate

1. INTRODUÇÃO

1.1 Validação Metodológica

A validação metodológica é uma medida necessária de um sistema global de garantia da qualidade (Thompson et al, 2002) e é definida como 'a confirmação por exame e provisão de evidência objectiva de que os requisitos particulares para uma utilização específica são cumpridos' (Boqué et al, 2002, p.129).

Assim, a validação verifica se os requisitos do método, pré-estabelecidos para um teste específico, podem ser cumpridos e se o método possui capacidade de desempenho compatível com o que a aplicação requer, sendo, por isso, uma medida essencial a implementar para avaliar a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados obtidos (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Huber, 2007; Thompson et al, 2002).

No processo de validação está implícito que os estudos para determinar os parâmetros de validação são realizados com o equipamento dentro das especificações, funcionando correctamente, e devidamente calibrado e controlado. Esses parâmetros são determinados por procedimentos estatísticos e incluem: exactidão, precisão, especificidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade e robustez (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002).

A validação metodológica deve ser realizada antes de um novo método ser incluído na rotina laboratorial, ou quando um método que já foi validado sofrer alterações. É um processo que envolve quatro fases importantes: planeamento dos testes; realização dos testes; avaliação dos resultados e documentação, que deve ser contínua em todas as fases (Bruce et al, 1998; Huber, 2007).

1.2 Parâmetros de validação

1.2.1 Exactidão. A exactidão é definida como o grau de concordância entre um valor aceite como referência, para uma dada determinação, e o valor médio obtido a partir de um conjunto de resultados (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Huber, 2007; Thompson et al, 2002).

Este parâmetro, afectado por erros sistemáticos, é avaliado em termos de *bias*, através da análise de amostras de referência. Como estas não têm o mesmo nível de rastreabilidade, devem ser escolhidas para a finalidade a que o método se destina. Assim, a exactidão pode ser avaliada pela comparação com materiais de referência certificados, com métodos de referência, em programas interlaboratoriais ou através de estudos de recuperação (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Thompson et al, 2002).

Os materiais de referência certificados devem ser usados sempre que possível uma vez que têm o nível mais alto de rastreabilidade. Estes materiais são padrões internacionais, semelhantes às amostras de rotina, com uma incerteza conhecida para um nível de confiança estabelecido. Na impossibilidade do uso destes materiais, outros materiais de referência podem ser usados desde que o analito em questão tenha sido minuciosamente estudado (Boqué et al, 2002; Thompson et al, 2002).

A exactidão também pode ser avaliada através de um método de referência, que tenha sido previamente validado e utilizado pelo laboratório. As amostras a ser analisadas no método validado e no método em validação devem ser representativas, homogéneas e estáveis (Boqué et al, 2002; Thompson et al, 2002).

Outra forma de avaliar a exactidão é comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida do programa interlaboratorial ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz da amostra (Boqué et al, 2002; Thompson et al, 2002).

1.2.2 Precisão. A precisão de um método é definida como o grau de concordância entre os vários resultados de ensaios independentes obtidos sob determinadas condições, previamente estipuladas, que dependem de diferentes factores (laboratório, operador, equipamento, calibração, dia em que o resultado foi obtido) (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Huber, 2007; Thompson et al, 2002).

Ao contrário da exactidão, a precisão é dependente dos erros aleatórios e não está relacionada com um valor de referência. Em termos quantitativos, e de acordo com as mudanças nos factores referidos, pode-se obter três tipos de precisão: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Bruce et al, 1998; Huber, 2007).

A repetibilidade é obtida quando uma amostra é analisada várias vezes no laboratório pelo mesmo operador, num equipamento único, durante um período de tempo curto. Se por outro lado, a amostra é analisada em diferentes laboratórios, com operadores diferentes e em diferentes equipamentos obtém-se a reprodutibilidade, que transmite maior precisão uma vez que há variação de todos os factores que afectam os resultados. A reprodutibilidade é obtida em estudos interlaboratoriais, cujo objectivo é verificar se para o mesmo método, os resultados também são os mesmos (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Huber, 2007).

A precisão intermédia, também conhecida como precisão em diferentes corridas, diz respeito à variação de um ou mais factores que podem afectar os resultados. Esta precisão é útil por indicar o tipo de variabilidade que um laboratório pode esperar nos resultados, para um determinado método (Boqué et al, 2002; Huber, 2007).

1.2.3 Especificidade. A especificidade é definida como a aptidão do método em medir apenas o analito de interesse, na presença de outros analitos interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra. Habitualmente este termo está intercalado com o termo selectividade e, por conseguinte, é necessário estabelecer a diferença entre os dois: a especificidade refere-se a um método que produz uma resposta para um único analito, ao passo que a selectividade se refere a um método que produz respostas para um grande

número de analitos que podem ou não ser distinguidos uns dos outros (Boqué et al, 2002; Bruce et al, 1998; Huber, 2007).

De um modo geral, tanto um termo como o outro avaliam a fiabilidade das medições na presença de analitos interferentes e geralmente a especificidade é considerada 100% de selectividade (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002).

Para avaliar este parâmetro é estudado o desvio dos resultados obtidos pela análise do analito de interesse em amostras fortificadas com interferentes específicos, e os resultados obtidos com amostras que apenas contêm o analito de interesse. Quando os interferentes mais comuns não são conhecidos, a especificidade é avaliada pela capacidade de medida do analito em comparação com outros métodos ou técnicas independentes (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002).

1.2.4 Sensibilidade. A sensibilidade de um método é a mudança na resposta de um equipamento de medição tendo em conta a alteração no estímulo que provocou essa resposta, isto é, corresponde à mudança na resposta quando há alteração na concentração do analito. Do ponto de vista prático, a sensibilidade é o gradiente de resposta da curva que, num intervalo linear, corresponde ao declive da recta de calibração (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002).

1.2.5 Limite de Detecção. O LD corresponde à menor quantidade ou concentração de um analito na amostra que é confiavelmente diferente de zero, isto é, a concentração mínima que o método detecta (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Thompson et al, 2002).

Se o objectivo essencial do método é fornecer resultados acima do limite de quantificação e apenas é necessário ter uma estimativa do limite de detecção, este parâmetro é estimado como três vezes o desvio padrão de um branco ou de uma amostra contendo um nível de concentração de analito baixa (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002).

Apesar de parecer simples obter este parâmetro, há problemas que dificultam esse processo, tais como factores operacionais que fazem com que as estimativas do LD sejam tendenciosas, uma vez que os valores são muito baixos e na prática não correspondem à realidade (Thompson et al, 2002).

1.2.6 Limite de Quantificação. O LQ corresponde à menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser quantificado com um nível aceitável de precisão, normalmente em termos de coeficiente de variação igual a 10%. Este limite é apenas um valor indicativo que não deve ser usado para tomar decisões, pois não representa o ponto abaixo do qual a quantificação é impossível e as medições abaixo desse ponto podem ser adequadas à finalidade (Bievre et al, 1998; Thompson et al, 2002).

1.2.7 Linearidade. A linearidade é definida como a capacidade do método para obter resultados proporcionais à concentração do analito, o que corresponde ao intervalo de concentração onde a sensibilidade do método pode ser considerada como constante (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Bruce et al, 1998).

Este parâmetro é utilizado para todos os métodos analíticos quantitativos, de modo a determinar a gama de concentrações para a qual o método pode ser aplicado. Na extremidade inferior tem-se o limite de detecção e de quantificação e na extremidade superior o limite de linearidade (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002).

1.2.8 Robustez. A robustez de um método analítico é definida como a capacidade dos resultados se manterem inalterados quando há pequenas alterações nos seus parâmetros, descrevendo assim, a estabilidade do método (Boqué et al, 2002; Bruce et al, 1998).

Para avaliar este parâmetro são introduzidas propositadamente pequenas alterações ao procedimento (ex. tempo, temperatura) e são analisados os efeitos dessas alterações nos resultados (Bievre et al, 1998; Boqué et al, 2002; Bruce et al, 1998; Thompson et al, 2002).

1.3 Oxalato (formação, interesse clínico e quantificação analítica)

O método enzimático de quantificação para a determinação de oxalato na urina utiliza a oxidase do oxalato para converter o oxalato em dióxido de carbono e peróxido de hidrogénio. Este último reage com a 3-metil-2-benzotiazolinohidrazona (MBTH) e 3-(dimetilamino) ácido benzóico (DMAB) na presença da peroxidase e é determinado fotometricamente a 600nm (Berckmans and Boer, 1988).

A quantidade de oxalato, um produto metabólico final, que é excretada na urina (oxalúria) desempenha um papel importante na supersaturação pelo oxalato de cálcio, resultando na formação de cristais ou após

crescimento destes, na formação de cálculos renais, sendo a hiperoxalúria o factor de risco primário para a *nefrolitíase* (Hall, 2009; Holmes et al, 2001; Taylor and Curhan, 2007, 2008; Siener et al, 2003).

A maioria do oxalato encontrado na urina deriva do metabolismo endógeno de alguns componentes (glicina, glicolato, vitamina C) e estima-se que uma parte variável seja proveniente da dieta (10-50%) (Holmes et al, 2001; Taylor and Curhan, 2007, 2008). Em situações normais, grande parte do oxalato resultante da dieta liga-se ao cálcio no intestino delgado, sendo excretado nas fezes como oxalato de cálcio. O restante, que permanece livre, é absorvido no cólon e posteriormente excretado na urina (Hall, 2009).

Deste modo, a hiperoxalúria pode ser resultado do aumento da síntese endógena, do aumento da ingestão de oxalato ou diminuição da ingestão de cálcio, ou ainda do aumento da absorção pelo tracto gastrointestinal (Hall, 2009; Holmes et al, 2001; Siener et al, 2003).

Segundo *Wilson and Liedtke* (1991) o oxalato em amostras de urina pré-acidificadas, é estável durante 14 dias armazenados em qualquer uma das temperaturas, ambiente (24°C), refrigerada (4°C) ou congelada (-20°C). Entre os dias 14 e 190, as amostras que foram mantidas à temperatura ambiente aumentaram progressivamente 71%. Já as amostras que foram refrigeradas apresentam um aumento de 22% entre os 14 e 28 dias e após esse período mantêm-se estáveis. Durante o período de 190 dias as amostras que foram congeladas não sofreram alterações (Figura 1).

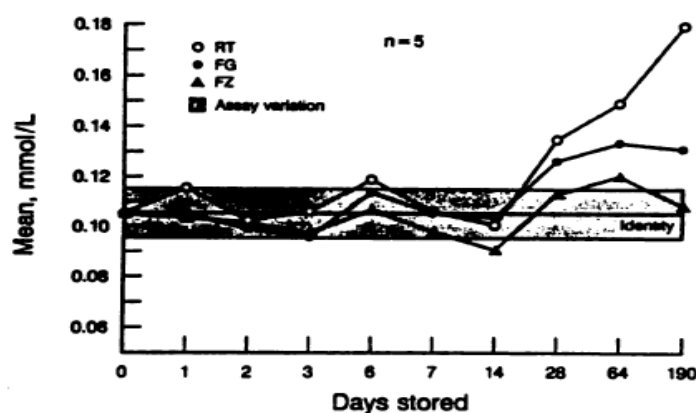


Fig. 5. Stability of urinary oxalate over time at room temperature (RT), refrigerated (FG), and frozen (FZ), in urine samples from five normal volunteers

Figura 1. Estabilidade do oxalato em diferentes temperaturas: ambiente (RT), refrigerada (FG), congelada (FZ). Esta foto é cortesia de [Wilson e Liedtke, 1991].

O objectivo do presente trabalho é validar a metodologia supra-citada para determinação do oxalato na urina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo quase-experimental.

2.2 Amostra

Para este estudo foram incluídas 30 amostras de urina de 24horas provenientes de utentes internos e externos do Hospital de São João no Porto, que deram entrada no serviço de Patologia Clínica, com a solicitação de oxalato na urina, no período de Abril a Junho de 2010.

2.3 Procedimento

As amostras de urina de 24horas, os controlos e o padrão foram tratados de acordo com o procedimento descrito na bula *Oxalate*, Procedimento N°591 (*Trinity Biotech*, Irlanda).

Os dois auto-analisadores que foram utilizados, *Olympus AU 5400 (Beckman Coulter, EUA)*, e o equipamento de referência o *Cobas Mira Plus (Roche, Suíça)*, foram alvo de manutenção, calibração e controlo rotineiros.

2.3.1 Exactidão. Para determinar a exactidão foram estudadas 30 amostras, nos dois auto-analisadores. A análise das amostras ocorreu em três dias diferentes, correspondendo a três corridas de 10 amostras cada.

2.3.2 Precisão. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e em termos de precisão intermédia. Para a determinação da repetibilidade foram efectuadas 10 medidas da mesma amostra e para a determinação da precisão intermédia foram usadas duas amostras independentes, sujeitas a 2 repetições por dia em três dias diferentes (que diferiram entre si cerca de 20 dias). Para conservação das amostras, estas foram mantidas em refrigeração, a 4°C.

2.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação. Para estabelecer o LD foi seleccionada a amostra com valor mais baixo de oxalato na urina, para ser repetidamente analisada 10 vezes. Daqui calculou-se o valor médio e o desvio-padrão (SD), que permitem o cálculo do valor estimado do LD, 3xSD.

Para a determinação do LQ fez-se uma diluição de uma amostra de modo a que concentração se situasse entre 2 a 5 vezes o LD estimado. Dessa amostra diluída fizeram-se 10 repetições.

2.3.4 Linearidade e Sensibilidade. Para determinar a linearidade foram efectuadas 6 diluições sucessivas do padrão, foi traçada a recta e através da sua equação foi possível obter a sensibilidade, que corresponde ao declive da recta.

2.3.5 Especificidade e Robustez. Estes dois parâmetros não foram exequíveis de serem avaliados uma vez que para a especificidade não foi possível obter amostras fortificadas, nem amostras livres de interferências e para a robustez as condições a serem alteradas envolviam custos adicionais.

2.3 Questões Éticas

O estudo desenvolvido está de acordo com a declaração de Helsínquia, uma vez que é mantido o anonimato dos participantes e não há interferências no seu bem-estar.

2.4 Análise Estatística

Para a análise estatística foram usados os *softwares MS-Excel® 2007* e *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)®*, versão 17.0. Todos os valores de oxalato na urina obtidos nos dois analisadores foram inseridos inicialmente no *MS-Excel® 2007* e, posteriormente, divididos de acordo com o parâmetro de validação em estudo.

A repetibilidade, o LD e o LQ foram obtidos após tratamento descritivo dos dados no *MS-Excel® 2007*. Usando o *SPSS*, foi determinada a exactidão testando-se a igualdade das médias dos resultados obtidos nos dois analisadores pelo teste *t-Student* para amostras independentes, com um nível de significância de 5%. A precisão intermédia foi determinada usando a análise de variância a dois factores (*two-way ANOVA*), repetições e corridas, e para a linearidade e sensibilidade foi usada a regressão linear e o coeficiente de correlação.

3. RESULTADOS

3.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os LD e LQ foram determinados com base no desvio padrão dos resultados obtidos no analisador em validação, sendo 0,98 e 0,79 mg/L, respectivamente.

3.2 Exactidão

O teste *t-Student* usado para determinar a exactidão depende da homogeneidade de variâncias obtidas pelos resultados dos dois analisadores, que é verificada pelo teste *F de Levene*. Assim, da análise dos resultados obtidos para este teste, o valor de *p* (0,733) é superior ao valor do nível de significância estabelecido, pelo que é assumida a igualdade de variâncias.

No teste *t-Student* para amostras independentes, usado para determinar a igualdade das médias, obteve-se um valor de *p*=0,713 para o nível de significância estabelecido (quadro 1).

Quadro 1. Resultados do Estudo da Exactidão

Teste de Levene		Teste <i>t</i> -Student		
F	<i>p</i>	t	Graus de liberdade	<i>p</i> (bilateral)
0,117	0,733	-0,369	58	0,713

3.3 Precisão

Para este parâmetro, em termos de repetibilidade, o cálculo do coeficiente de variação foi de 3,8%. A precisão intermédia foi avaliada entre repetições e corridas obtendo-se os valores de *p* que se encontram no quadro 2, de onde se pode verificar que dentro das corridas não existem diferenças estatisticamente significativas e entre as várias repetições existem diferenças significativas nos resultados.

Quadro 2. Resultados do Estudo da Precisão

Análise de variância <i>two-way ANOVA</i>					
Repetições			Corridas		
F	Graus de liberdade	<i>p</i>	F	Graus de liberdade	<i>p</i>
383,041	1	0,032	0,705	2	0,587

3.4 Linearidade e Sensibilidade

Para a linearidade a análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação e coeficiente de determinação igual a 1 (quadro 3). No gráfico 1 está expressa a equação da recta, $y=0,0059x - 5^{-06}$ da qual se verifica uma sensibilidade igual a 0,0059 unidades de densidade óptica por cada unidade de concentração, que corresponde a 0,6%.

Quadro 3. Resultados do Estudo da Linearidade

R	R ²	R ² ajustado	Desvio padrão da estimativa
1,000	1,000	1,000	0,00242

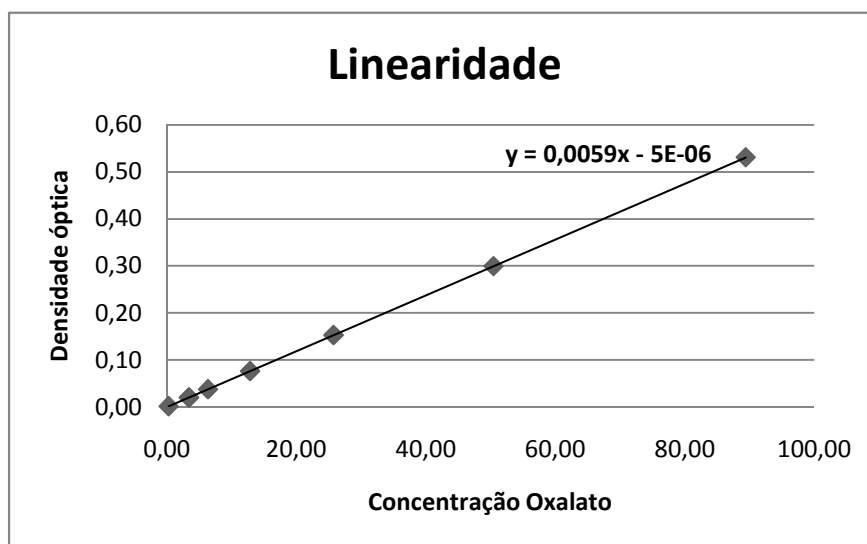


Gráfico 1. Recta de linearidade.

4. DISCUSSÃO

Os parâmetros de validação determinados ao longo do estudo foram: LD, LQ, exactidão, precisão, linearidade e sensibilidade.

Os valores de LD e LQ foram de 0,98 e 0,79 mg/L, respectivamente, o que teoricamente não deveria acontecer. No entanto, esta incongruência pode dever-se ao pré-tratamento da amostra que inviabilizou a possibilidade de se cumprir o mínimo de 10 medições por sobrenadante de amostra.

Em termos de exactidão verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas, pois o valor p obtido foi superior ao nível de significância estabelecido, pelo que o método é considerado exacto.

Em relação à precisão, em termos de repetibilidade, o coeficiente de variação obtido foi 3,8%. Para a precisão intermédia, avaliada dentro das corridas evidenciou que não existiam alterações estatisticamente significativas entre os resultados, facto não observado entre repetições. Estes resultados podem ter como explicação subjacente o facto de não ter sido possível executar em dias consecutivos o doseamento de oxalato, nem de, por motivos externos à investigação, terem sido congeladas as amostras. Como refere a literatura os valores de oxalato aumentam cerca de 22% quando as amostras são conservadas a 4°C por vários dias, o que foi o caso. Se por outro lado, as amostras forem congeladas não sofrem alterações, por um período de 190 dias (Wilson and Liedtke, 1991).

Para os parâmetros linearidade e sensibilidade, foi efectuada uma recta de calibração cuja equação foi $y=0,0059x - 5^{-06}$, com coeficientes de correlação e de determinação iguais a 1.

O coeficiente de correlação demonstra que há uma correlação linear muito forte entre as variáveis e o coeficiente de determinação indica que a relação entre a concentração e a densidade óptica é directamente proporcional.

No que diz respeito à sensibilidade verificada (0,6%), esta indica que o método altera 0,0059 unidades de densidade óptica por cada unidade de concentração. No entanto este resultado ficou um pouco aquém das expectativas, uma vez que o número de determinações realizadas para avaliar este parâmetro foi reduzido.

5. CONCLUSÃO

A validação de um método analítico corresponde a um processo que visa confirmar que o procedimento usado para um teste é adequado ao uso pretendido, sendo por esta razão, uma ferramenta útil para a emissão de resultados analíticos fiáveis (Huber, 2007; Thompson et al, 2002).

Num estudo futuro alguns parâmetros devem ser alvo de correcção, nomeadamente, a precisão intermédia, cujo número de repetições deve ser superior a 2 e a sensibilidade deverá ser avaliada com mais diluições de padrões, com diferentes concentrações.

Contudo, este estudo permitiu avaliar os diferentes parâmetros usados no processo de validação e obter resultados que se pretendiam próximos dos esperados. Pode-se, portanto, concluir que o método se mostrou exacto e linear para a determinação efectuada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berckmans, R. J., & Boer, P. (1988). An inexpensive method for sensitive enzymatic determination of oxalate in urine and plasma. *Clin Chem*, 34(7), 1451-1455.
- Bievre, P. d., Hoechst, D. B., Eastwood, C., Hlavay, J., Holmgren, M., Horwitz, W., et al. (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 22-05-2010, from <http://www.eurachem.org/guides/html/mval.htm>
- Boqué, R., Maroto, A., Riu, J., & Rius, F. X. (2002). Validation of Analytical Methods. *Grasas y Aceites*, 53(1), 128-143.
- Bruce, P., Minkinen, P., & Riekkola, M.-L. (1998). Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochim Acta*, 128, 93-106.
- Hall, P. M. (2009). Nephrolithiasis: treatment, causes, and prevention. *Cleve Clin J Med*, 76(10), 583-591.
- Holmes, R. P., Goodman, H. O., & Assimos, D. G. (2001). Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int*, 59(1), 270-276.
- Huber, L. (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories* (2ª ed.). USA: Informa Healthcare.
- Siener, R., Ebert, D., Nicolay, C., & Hesse, A. (2003). Dietary risk factors for hyperoxaluria in calcium oxalate stone formers. *Kidney Int*, 63(3), 1037-1043.

- Taylor, E. N., & Curhan, G. C. (2007). Oxalate intake and the risk for nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*, 18(7), 2198-2204.
- Taylor, E. N., & Curhan, G. C. (2008). Determinants of 24-hour urinary oxalate excretion. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3(5), 1453-1460.
- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74(5), 835-855.
- Wilson, D. M., & Liedtke, R. R. (1991). Modified Enzyme-Based Colorimetric Assay of Urinary and Plasma Oxalate with Improved Sensitivity and No Ascorbate Interference: Reference Values and Sample Handling Procedures. *Clin. Chem.*, 37(7), 1229-1235.