

Siero, plasma o sangue intero? Quale anticoagulante usare?

Giuseppe Banfi

Casa di cura S. Maria, Castellanza VA

Presentazione del documento

Ho proposto per la pubblicazione su *Biochimica Clinica* la traduzione e l'adattamento di un lavoro uscito sulla rivista della Società Tedesca di Medicina di Laboratorio e che è stato diffuso da diverse altre società ed organizzazioni. Ritengo che possa essere utile nella pratica di laboratorio, con i limiti dell'approvvigionamento delle fonti di informazione, per quanto vi abbiano lavorato molte persone della professione e dell'industria con specifiche competenze nel campo della fase preanalitica. Inoltre, l'aggiornamento è continuo, tanto che è già in fase avanzata la preparazione di un documento da parte dello stesso gruppo che include tipo di campione e stabilità dello stesso e che si intitola "The quality of diagnostic sample". Pertanto alcune informazioni potrebbero essere già sopravanzate da ricerche recenti: cito, ad esempio, i lavori pubblicati su *Clinical Chemistry* 2000, volume 46 di Gerhardt W et al (pagg.817-21, troponine) e di Korte W & Riesen W (pagg 871-2, D-Dimero). Il lavoro qui presentato può essere di stimolo per raccogliere ricerche, osservazioni e commenti dei biochimici clinici italiani per aggiornare le tabelle e per far conoscere le migliori condizioni di raccolta e conservazione dei campioni per la diagnostica di laboratorio.

Raccomandazioni del Gruppo di Studio sulle Variabili Preanalitiche della Società Tedesca di Chimica Clinica

Membri: WG Guder, Monaco (coordinatore), W Ehret, Augsburg, F Da Fonseca-Wolheim, Berlino, W Heil, Wuppertal, O Muller-Plathe, Amburgo, G Topfer, Gorlitz, H Wisser, Stoccarda, B Zawta, Mannheim.

Hanno contribuito al lavoro i membri corrispondenti: G Banfi, Milano - A Deom, Ginevra - CG Fraser, Dundee - P Hagemann, Zurigo - J Henny, Nancy - A Kallner, Stoccolma - EA Leppanen, Helsinki - S Narayanan, New York - M Neumaier, Amburgo - MA Peça Amaral Gpmes, Lisbona - R Probst, Monaco - Y Schmitt, Darmstadt

Rappresentanti dell'industria: R Zinck, Abbott GmbH - KH Buscher, P Mikulcik, Bayer - R Hinzmann, Beckman - A Karallus, G Linke, Becton Dickinson - M Lammers, Dade-Behring - M Buchberger, Greiner - J Kukuk, Rolf Greiner Biochemica - H Gross, Heraeus - D Klahr, Hettich Zentrifugen - D Kolpe, Kabe Labor Technik - H Kitta, Klinika - G Gunzer, Olympus - O Sonntag, Ortho Clinical Diagnostics - S Speidel, Roche - W Brand, Sarstedt - VJ Friemert, Sigma - T Kunert-Latus, Terumo Europe - G Hoffmann, Trillium

Riprodotta con permesso da *J Lab Med* 1998;22:297-312, Blackwell WissenschaftsVerlag, Berlin. *Journal of Laboratory Medicine (Laboratoriums Medizin)* è la rivista ufficiale della Società Tedesca di Medicina di Laboratorio (Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin e.V.), dell'Associazione Tedesca dei Professionisti di Laboratorio (Berufsverband Deutscher Laborärzte e.V.), della Società Austriaca di Medicina di Laboratorio (Österreichische Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin) e di INSTAND e.V. (Istituto di Standardizzazione e Documentazione dei Laboratori Medici).

1. INTRODUZIONE

E' importante che la quantità di analita presente in vivo nei fluidi biologici sia trasferito senza modificazioni al processo analitico, per ottenere dati validi e corretti nel laboratorio clinico. Ciò non è sempre possibile nella misurazione di componenti intra ed extracellulari nel sangue. Le piastrine e i fattori della coagulazione sono attivati allorché vengono punti i vasi sanguigni e tali processi continuano se sono utilizzati contenitori privi di anticoagulante. Il siero ottenuto con questo metodo è storicamente il materiale preferito per la misurazione delle quantità extracellulari di un determinato analita nel sangue.

Le modificazioni collegate all'attivazione della coagulazione possono esser evitate in massima parte usando anticoagulanti aggiunti nei contenitori per i campioni. Tipo e concentrazione degli anticoagulanti usati nei campioni di sangue venoso periferico sono stati definiti nello standard internazionale (1) pubblicato nel 1996 e sono attualmente usati come modello per standardizzare i campioni di plasma nel mondo intero. Il fine di tale raccomandazione è di riunire i dati descritti in letteratura e quelli ottenuti dai membri del Gruppo di Studio sull'uso degli anticoagulanti. I dati raccolti costituiscono la base per determinare l'affidabilità dei vari tipi di campione nelle procedure diagnostiche. La rassegna che qui riportiamo è stata sviluppata negli incontri del Gruppo di Studio dopo discussione con i rappresentanti dell'industria diagnostica e con esperti di altre nazioni.

2. DEFINIZIONI

2.1 Sangue intero

Un campione venoso, arterioso o capillare in cui la concentrazione e le caratteristiche delle quantità di analita intra ed extracellulare restano invariati in comparazione con la situazione in vivo. Ciò viene ottenuto per mezzo di anticoagulanti in vitro.

2.2 Siero

Parte extracellulare e non diluita del sangue dopo completa coagulazione.

2.3 Plasma

Sovranatante privo di cellule del sangue contenente anticoagulante ottenuto dopo centrifugazione.

2.4 Anticoagulanti

Gli anticoagulanti sono additivi scelti in base alla capacità di assicurare che la quantità da misurare venga modificata il meno possibile prima del processo analitico attraverso l'inibizione della coagulazione. L'anticoagulazione avviene sia attraverso il legame degli ioni calcio (EDTA, citrato) sia attraverso l'attività antitrombinica (eparina, irudina). E' importante che il sangue venga miscelato con le seguenti concentrazioni di anticoagulante liquido o solido immediatamente dopo la raccolta del sangue:

2.4.1 EDTA

Sale dell'acido etilendiamminotetracetico. I sali usati come cationi sono il bipotassico (K₂), il tripotassico (K₃), il bisodico (Na₂) (1,2). Concentrazioni: da 1.2 a 2.0 mg/mL di sangue intero (da 4.1 a 6.8 mmol/L di sangue) con EDTA anidro.

2.4.2 Citrato

Citrato trisodico con 0.100-0.136 mol/L di acido citrico. Citrato tamponato con pH da 5.5 a 5.6: 84 mmol/L di citrato trisodico con 21 mmol/L di acido citrico. 0.105 mol/L (3.2%) è la concentrazione raccomandata per la standardizzazione (3). WHO e NCCLS raccomandano 3.2%, dato che sono state rilevate differenze tra le concentrazioni 3.2% e 3.8% utilizzando l'INR (4,5). La International Society for Thrombosis and Hemostasis (ISTH) ha raccomandato l'uso di Hepar tamponato per tutte le valutazioni delle funzioni dell'emostasi (3). E' raccomandata una miscela di una parte di citrato con 9 parti di sangue per i test della coagulazione (1,5). La concentrazione di citrato deve esser adeguata allorché l'ematocrito è al di sopra di 0.55 o al di sotto di 0.3 usando la formula: citrato (vol)

= ematocrito x sangue (vol) /9 x 0.55. Per la determinazione della velocità di eritrosedimentazione si raccomanda l'utilizzo di una parte di citrato miscelata con 4 parti di sangue (1).

2.4.3 Eparina

Si raccomanda l'uso di una quantità da 12 a 30 unità internazionali per mL di eparinato di sodio, di litio o di ammonio con una massa molecolare da 3 a 30 KDa (1). Per la determinazione del calcio ionizzato si raccomanda eparina titolata con calcio ad una concentrazione di 40-60 UI/mL di sangue (eparinizzazione secca) o 8-12 UI/mL di sangue (eparinizzazione liquida) (6).

2.4.4 Irudina

E' un'antitrombina estratta dalla sanguisuga e utilizzata come preparazione da tecnologia di ingegneria genetica come anticoagulante. Lega la trombina in un complesso irudina-trombina 1:1. Viene usata ad una concentrazione di 10 mg/L (7).

I codici colore degli anticoagulanti in accordo con la norma ISO 6710 sono: EDTA = viola; citrato 9:1 = azzurro; citrato 4:1 = nero; eparina = verde; nessun additivo (per siero) = rosso (1).

3. PLASMA O SIERO?

3.1 Vantaggi del plasma

Il plasma potrebbe esser preferito al siero per la seguente serie di motivi.

3.1.1. Risparmio di tempo

I campioni per il plasma possono esser centrifugati direttamente dopo la raccolta del sangue, mentre i campioni per il siero devono attendere il completamento del processo di coagulazione che avviene non prima di 30 minuti.

3.1.2. Maggior rendimento

Si può ottenere dal 15 al 20% in più di plasma rispetto al siero dalla stessa quantità di sangue

3.1.3. Prevenzione dalle interferenze indotte dalla coagulazione

La raccolta di plasma previene la coagulazione nei contenitori originali e secondari dopo centrifugazione che può esser fonte di interferenze analitiche (ad esempio, ostruzione dell'ago campionatore nel sistema di analisi)

3.1.4. Prevenzione dalle modificazioni indotte dal processo di coagulazione

Il processo di coagulazione modifica le concentrazioni di numerosi analiti nel fluido extracellulare attorno al massimo valore limite (8,9). Ciò è indotto dai seguenti meccanismi:

a. aumento del numero di componenti piastrinici nel siero rispetto al plasma (ad esempio, potassio, fosfato, magnesio, aspartatoamminotransferasi, lattato deidrogenasi, serotonina, enolasi neuronospecifica, zinco). Rilascio di amide-NH₃ dal fibrinogeno indotto dal fattore XIII.

b. Decremento della concentrazione di analiti nel siero determinato dal processo di coagulazione (proteine totali, piastrine, glucosio)

c. Attivazione della lisi cellulare di eritrociti e leucociti nel sangue non coagulato (emoglobina libera, citochine, recettori).

A causa di questi fattori, per alcune analisi è indicato solamente l'uso del plasma (ad esempio, enolasi neuronospecifica, serotonina, ammonio)

3.2. Svantaggi del plasma rispetto al siero

L'aggiunta di anticoagulanti può interferire, d'altra parte, in alcuni metodi analitici o cambiare la concentrazione degli analiti misurati:

- a. contaminazione con cationi: ammonio, litio, sodio, potassio
- b. interferenza causata da metalli legati a EDTA e citrato (ad esempio, inibizione dell'attività della fosfatasi alcalina da blocco dello zinco, inibizione delle metalloproteasi, inibizione dell'attivazione cellulare dipendenti da metalli in test funzionali, legame del calcio ionizzato con l'eparina) (6)
- c. interferenza causata dal fibrinogeno in immunodosaggi eterogenei (9)
- d. inibizione di reazioni metaboliche o catalitiche da eparina, come Taq polimerasi nella PCR (10)
- e. interferenza nella distribuzione degli ioni tra spazio intra ed extracellulare (ad esempio Cl^- e NH_4^+) da parte di EDTA e citrato (8)
- f. l'elettroforesi del siero può essere determinata solo dopo pretrattamento.

3.3 Campioni per la diagnosi sierologica di malattie infettive

Numerosi metodi sono stati introdotti nella pratica di laboratorio per la diagnosi sierologica di malattie infettive. I metodi includono l'immunodiffusione, l'agglutinazione, la fissazione del complemento, l'immunofluorescenza indiretta (IFA), l'immunoenzimatica (ELISA), il radioimmunoassay (RIA), la neutralizzazione di tossine o di attività virale, l'immunoblotting (Western blot) ed altri ancora.

In generale, il siero è il campione di scelta per la diagnosi sierologica delle malattie infettive ed è necessario per alcune tecniche immunologiche come la fissazione del complemento o i test di agglutinazione batterica; per gli altri metodi, come l'emagglutinazione o l'ELISA o il blotting, si può usare siero o plasma, ma generalmente i metodi commerciali sono concepiti per l'uso esclusivo del siero.

4 RACCOMANDAZIONI

La tabella successiva indica i materiali raccomandati per ciascun test. Contiene anche informazioni sull'attendibilità di altri materiali allorché le misurazioni con tali metodi e materiali non oltrepassino il limite massimo tollerabile di deviazione come proposto dall'Associazione Medica Tedesca (11), accettando una deviazione massima del 10% per gli analiti non ricompresi nelle linee guida dell'associazione.

4.1 Raccolta del campione e tempi di trasporto

Quando si devono riempire molte provette, si raccomanda di seguire un certo ordine per evitare contaminazioni (8):

emocoltura, siero (evitare il siero come primo allorché si devono misurare elettroliti [19]), citrato, eparina, EDTA, provette con additivi e stabilizzanti (inibitori della glicolisi, ad esempio).

Agitare senza creare schiuma più volte la provetta per miscelare bene il sangue con l'anticoagulante. Per la separazione del siero in provette senza anticoagulante, lasciare le provette a temperatura ambiente per almeno 30 minuti. Tale periodo sarà più corto se si utilizzano attivatori della coagulazione. Non lasciare il materiale a temperatura ambiente per un tempo eccessivo rispetto alla stabilità degli analiti da misurare (12).

4.2 Centrifugazione

4.2.1 Generalità

La separazione delle cellule del sangue dal siero/plasma può essere rapidamente ottenuta aumentando la gravità mediante centrifugazione (accelerazione centrifuga relativa, rcf). Rcf e le rotazioni per minuto (rpm) possono essere calcolati utilizzando il raggio di rotazione r (distanza tra l'asse di rotazione e la base del contenitore in mm), seguendo l'equazione: $rcf = 1.118 \times r \text{ (rpm/1000)}^2$

Si raccomanda di centrifugare i contenitori con il sangue in rotori a 90° . Solo con questa condizione la superficie del sedimento forma un angolo retto con la parete del contenitore, prevenendo il contatto tra l'ago campionatore e la superficie dello strato cellulare o del gel separatore.

Tabella

Anallita	Siero	Plasma da eparina	Plasma da EDTA	Plasma da citrato	Sangue intero He, EDTA, CI	Note
ACE (enz. convertente l'angiotensina)	+		-	-		
Acetaminofene	+	+a,b	+a			
Acetilsalicilato	+	+b	+b	(+)b		
Acidi grassi liberi	+	(+)>	(+)<			l'eparina attiva la lipasi
Adenovirus (anticorpi)	+					Fissazione complemento
Alaninaamminotransferasi	+	+	+	(+)		
Albumina	+	+*	+	(+)		
Aldosterone	+	+	++			
Alfa1antitripsina	+	+c	+c			
Alfa1glicoproteina acida	+	+c	+c	(+)		
Alfa1microglobulina	+					
Alfafetoproteina (AFP)	+	+ a,b,c	+ a,b,c	(+) b,c		
Alluminio	-	-	-	-		provetta speciale
Amicacina	+	+	+b	(+)b		
Amilasi pancreatica	+	+	+	(+)		
Amilasi totale	+	+	+	(+)		
Amiloide A (SAA)	+					
Amiodarone	+	+	+			HPLC
Amitriptilina	+	+				HPLC
Ammonio	->	(+)>	++	-	+	usare senna 5mmol/L e borato 2 mmol/L per prevenire la formazione di ammonio in vitro [14], non usare ammonio eparina
Androstenedione	+					
Anfetamina	+	+	+			
Anticorpi anti recettore del TSH (TRAK)	+					
Anticorpi anticardiolipina	+					
Anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA)	+					
Anticorpi anticlamidia	+					
Anticorpi antimitocondri (AMA)	+					
Anticorpi antinucleo (ANA)	+					
Anticorpi antiplastrine			+	+		
Anticorpi antitossina tetanica	+					
Antidepressivi triciclici	+	+ b	+ b			
AntiDNAasi	+					
Antigene carcino embrionario (CEA)	+	+ b,c	+ b,c	+ c		
Antigene CD34			+			
Antigene del carcinoma a cellule squamose (SCC)	+					
Antigene prostatico specifico (PSA)	+	+ c	+ c	(+) c		
Antigene prostatico specifico, parte libera	+	+ c	+ c			
Antistafilolisina	+					
Antistreptochinasi	+					
Antistreptolisina	+	+b,c,d	+b,c,d			
Antistreptolisina O	+					
Antitrombina III	-			++		
Apolipoproteina A1	+>	+ c,d	++ c,d	(+)		
Apolipoproteina B	+>	+ c,d	++ c,d	(+)		
Aptoglobina	+	+	+			
Aspartatoamminotransferasi	+>	++	+	(+)		
Aspergillo (anticorpi)	+					
Aspergillo (antigene)	+					
Autoanticorpi antitiroidei	+					
Bartonella (anticorpi)	+					
Benzodiazepine	+	+				
Beta2microglobulina	+	+ c	+ c	(+) c		
Bicarbonato	+	+				
Bilirubina	+	+	+			
Bordetella pertussis (anticorpi)	+					
Borrelia burgdoferi (anticorpi)	+					
Brucella (anticorpi)	+					
C3 (complemento)	+	+	+ c	(+) c		
C4 (complemento)	+	+	+	(+)		
CA125	+	+c	+ c	(+) c		
CA15.3	+	+c	+ b,c	(+) c		

continua Tabella

CA19-9	+	+ c	+ c	(+) c				
CA72-4	+	+ c	+ c	(+) c				
Cadmio	-		++	-				Provetta speciale
Calcio	+	+	-<	-<	+			
Calcio ionizzato	-	(+)	-<	-<	+			[6]
Calcitonina	+	+						Stabilizzata con aprotinina 400 KU/mL
Candida albicans (anticorpi)	+							
Candida albicans (antigene)	+							
Carbamazepina	+	+ b,c,d	+ b,c	(+) b,c				
Catecolammine	-	++	(+)	-				Stabilizzate con EGTA e/o glutatione 1.2 mg/mL
Catene leggere	+	+ c	+ c					
Ceruloplasmina	+	+	+					
Chinidina	+	+ b	+ b	(+) b				
Chinidina	+	+ b	+ b	(+) b				
Ciclosporina A	-	-	-	-	++	++ b		
Cistatina C	+	+						
Citomegalovirus (amplificazione DNA)							++	
Citomegalovirus (anticorpi)	+	+ b	+ b	(+) b				
Citomegalovirus (antigene, pp65)							++	
Citometria (markers di membrana)								
Cloramfenicolo	+	+ b	+ b					
Cloruro	+	+	-	-	+			
Cocaina	+	+			+			Stabilizzare con NaF
Colesterolo	+	+	++	(+)				
Colesterolo HDL	+	+	++ d	-				
Colesterolo LDL	+	-	++	-				
Colinesterasi	+	+	+					
Conta leucocitaria					+	++	(+)	
Coriogonadotropina (hCG)	+	+ b,c	(+) b,c	(+) c				
Corticotropina (ACTH)		+	++					Stabilizzazione con aprotinina 400KU/mL, mercaptoetanolio 2 ug/mL
Cortisolo	+	+	+ c					
Coxsackie (anticorpi)	+							
C-peptide	+							
Creatin chinasi MB (massa)	+	+ b,c	+ b,c,d	(+)				
Creatin chinasi (CK)	+	+ b,d	+ b,d	(+)				
Creatinina	+	+	+	(+)				
Criptococco					+			Emocoltura
Cyfra 21-1	+	+ c	+ c	(+) c				
D-dimero	-	+	-	++				
Deidroepiandrosterone solfato (DHEAS)	+							
Diazepam	+	+	+					
Digitossina	+	+ a,b,c	+ c	(+) b				
Digossina	+	+ a,b,c	+ b,c	(+)				
Disopiramide	+	+	+					
DNA e RNA (amplificazione)					-	++	+	L'eparina inibisce la Taq-polimerasi ed enzimi di restrizione [21] LiCl 1.8 mol/L elimina l'errore [22]
Dopamina			+					
Echinococco (anticorpi)	+							
Elastasi						+		
Elastasi pancreatica	+							
Elettroforesi	++							
Elettroforesi	++							
Ematocrito					+	++		
Emoglobina F						+		
Emoglobina glicata						++		emolisato
Emoglobina in plasma	(+)>	++	+					
Emoglobina in sangue intero						++		
Enolasi neurono specifica (NSE)	+>	++						aumentata in trombocitosi
Entamoeba histolytica (anticorpi)	+							
Enterovirus (anticorpi)	+							
Eparina (anti Xa)				++				

continua Tabella

Epatite B, DNA			+					
Epatite C, amplificazione RNA (virus load)	+		+					
Epatite C, tipizzazione del genoma	+		+					
Epatite D, amplificazione RNA	+		+					
Epatite D, anticorpi	+							
Epatite E, anticorpi	+							
Epatite, anticorpi (anti HAV, antiHBsAg, antiHBe, antiHBe, antiHCV)	+	+b	+b	(+)b				
Epstein Barr (anticorpi, Paul Bunnel)	+							
Eritrociti					+	++	(+)	
Eritropoietina	++	+	+					
Estradiolo (E2)	+	(+)c	(+)c	(+)c				
Estriolo (E3)	(+)	+						
Etanolo	+	++b	+b	(+)b,d		+		in sangue intero stabilizzare con 10 g/L di NaF
Etosuccimide	+	+	+					
Fattore reumatoide	+		+ c	(+) c				
Fattori della coagulazione (II-XIII)	-	-	-	++				
Fenciclidina	+							
Fenitoina	+	+ a,b,c,d	+ b,c,d	(+) a,b,c				
Fenobarbital	+	+ b,c,d	+ b,c,d	(+) b,c,d				
Ferritina	+	+b,c,d	(+)c	(+) c				
Ferro	+	+	- <	- <				
Fibrina (monomeri)	-	-	-	++				
Fibrinogeno (Clauss)	-	-	-	++				
Fibrinogeno (immunologico)	-	-	-	++				
Fibrinopeptide A	-	-	-	++				
Folati	+	+	+b	(+)b		+b		emolisato preparato con 0.5 di sangue e 4.5 mL di acido ascorbico (2 g/L)
Follitropina (FSH)	+	+ a,b,c	+ a,b,c	(+)c				
Formula leucocitaria				*		++		K3 o K2EDTA, dipendente dallo strumento
Fosfatasi alcalina	+>	++	-	(+)				l'EDTA lega lo zinco, cofattore essenziale
Fosfati	(+)>	++	-	-				dipendente dalle piastrine nel siero [8,9,15]
Fruttosammina	+	+	+					
Gammaglutamiltransferasi IFCC/Szasz	+	+	(+)<	(+)<				
Gastrina	+	++	+	(+)				in eparina aggiungere aprotinina 2000 KIU/mL
Gentamicina	+	+ b,c,d	+ b,c,d	(+)b				
Glucagone			+					Stabilizzare con aprotinina 500 KIU/mL
Glucosio	-<	+<	+<		(+)			usare un inibitore della glicolisi (fluoruro)
Glutammato deidrogenasi	+	+	+					
HBeAg	+	+b	+b	(+)b				
HbsAg	+	+d	+d	(+)d				
Helicobacter pylori, anticorpi	+							
Herpes simplex, anticorpi per virus 1 o 2 e amplificazione del DNA	+							
HHV 6, amplificazione del DNA						++		
HHV 6, anticorpi	+							
HLA, tipizzazione						++		eparinato di ammonio
HLA, tipizzazione DR						++		
HLA-B27						++	++	eparinato di ammonio
HTLV I, amplificazione DNA							++	
HTLV I, amplificazione RNA	+		+					
HTLV I, anticorpi	+							
Idrossibutirrato					+			deproteinizzare
IgA	+	+ c,d	+ c,d					
IgD	++		(-)< c					
IgE	++	+ d,e	(-)< d,e	(+) e				
IgG sottoclassi	+	+ c,d	- <	-				
IgM	+	+ c,d	< c, + d					
Immunocomplessi circolanti	+							
Influenza, virus, anticorpi	+							

continua Tabella

Insulina	(+)<	+	+					
JC poliooma virus, amplificazione DNA						++		
JC poliooma virus, anticorpi	+							
Lattato	->	->	->	-	(+)			usare una provetta con inibitore della glicolisi (fluoruro/ossalato), se non si deproteinizza
Lattodeidrogenasi	(+)>	++	+	(+)				dipendenza dalle piastrine [8,9,15]
LCM virus, amplificazione DNA						++		
LCM virus, anticorpi	+							
Legionella, anticorpi	+							
Leishmania, anticorpi	+							
Leptospira, anticorpi	+							
Lidocaina	+	+ b	+ b					
Linfociti, tipizzazione						+		raccomandato uno stabilizzante, come Cyfix II
Lipasi	+	+	-<	-				l'EDTA lega il calcio (attivatore)
Lipoproteina (a)	+	+ c	+ c	- c				
Lipoproteine (elettroforesi)	++	-	-	-				
Listeria, amplificazione DNA						++		
Listeria, anticorpi	+							
Litio	+	+	-	-				non usare litio-eparina
Lupus, anticoagulante	-	-	-	++				
Lutropina (LH)	+	+ b	+ b					
Magnesio	+>	+	-	-<	++			separare le cellule del sangue prima dell'analisi [16]
Malaria, Plasmodium anticorpi	+							
Malaria, Plasmodium spp.						++		esame microscopico dello striscio di sangue
Mercurio						+		provetta speciale
Metadone	+	+						
Metotrexate	+							
Micobatteri spp, amplificazione DNA						++		
Microfilaria						+	+	campione concentrato
Mioglobina	+	+ c,e	+ c,d,e	(+) c,e				
Morbillo, virus, amplificazione DNA						++		
Morbillo, virus, anticorpi	+							
Mycoplasma pneumoniae, anticorpi	+							
N-acetilprocainamide	+	+ b	+ b	(+) b				
Netilmicina	+							
Omocisteina	+>	+	+	(+)		++		campione con EDTA/acido citrico (0.5 mol/L) [17]. Mantenere a <4°C. Emolizzare in detergente il campione [18]
Opiacei	+	+						
Ormone della crescita (hGH)	++	-	-					
Oro	+							
Osmolalità	+	+						
Osteocalcina	+		++					meglio stabilizzare a 4°C e con aprotinina
Paracetamolo	+	+ b	+ b	(+) b				
Paratirina (PTH)			++					
Parotite, virus, anticorpi	+							
Parvovirus 19, anticorpi	+							
Parvovirus, amplificazione DNA						++		
Piastrine, conta					(+) <	++	(+)	si usa eparina e citrato nella pseudotrombocitopenia da EDTA
Piastrine, funzionalità							++	provetta speciale [23]
Piombo	-	-	+	-	(+)			usare provette dedicate
Piruvato	-<	(-)<			+			su sangue deproteinizzato
Potassio	(+)>	++	-	-				
Prealbumina	+		+ c					
Primidone	+	+	+	(+)				
Procainamide	+	+ b	+ b	(+) b				
Procalcitonina	+							

continua Tabella

Prodotti di degradazione del fibrinogeno	+	-	-	(+)				provette speciali con trombina/callicreina per siero e aprotinina o altri inibitori della tripsina in citrato
Progesterone	+	+ b	+ b					
Prolattina	+	+ b,d	+ b					
Propafenone	+	+						
Propossifene	+	+						
Proteina C-reattiva (PCR)	+	+ a,e	+ a,e	(+)				
Proteina S	-	-	-	++				
Proteina S100	+							
Proteine totali	+ <	++	+ d	(+)				la quantità nel plasma risulta più alta per la presenza del fibrinogeno
Rame	+	+	-	-				Provetta speciale disponibile
Renina	-	-	+	-				
Resistenza all'APC				++				alte concentrazioni di eparina devono essere neutralizzate dipendente dal K2 o dal K3 EDTA
Reticolociti					(+)	++		
Rickettsia, anticorpi	+							
Rosolia, virus, anticorpi	+							
Rotavirus, anticorpi	+							
Salicilati	+	+ a,b,d	+ b,d	(+) b,d				
Selenio	-	-	-	-		+		usare provetta speciale dedicata
Sodio	+	+	-	-	+			su sangue intero usare sodioeparina stabilizzata 8-12 IU/mL [6]
Tacrolimus (FK 506)			-	-		++		
Tempo di protrombina	-	-	-	++				
Tempo di trombina	-	-	-	++				
(aPTT)	-	-	-	++				
Teofilina	+	+ a,b,c	+ b,c,d	(+) b,c				
Testosterone	+	+ c	+ c	(+) c				
Tetracannabinolo (THC)	+	+						
Thyroxine binding globulin (TBG)	+	+						
Tireotropina (TSH)	+	+ b,c	+ b,c	(+) c				
Tiroglobulina	+							
Tiroxina (T4)	++	+ b,c	+ b,c	(+) c				Differenza tra metodi su plasma (eparina spiazza la T4 dall'albumina)
Tiroxina libera (fT4)	+	+ b,c	+ c	(+) c				
Tobramicina	+	+ b,d	+ b,d	(+) b				
Toxoplasma gondii, anticorpi	+	+ b	+ b	+ b				
Transferrina	+	+	+ c					
Transferrina con deficienza di carboidrati (CDT)	+	+						Dipendente dal metodo
Treponema pallidum, amplificazione DNA						++		
Treponema pallidum, anticorpi	+							TPHA, VDRL, FTA, immunoblot
Trigliceridi	+	+	++	(+)				
Triiodotironina libera (fT3)	+	+ b,c	+ b,c	(+) c				Differenza tra metodi su plasma
Triiodotironina (T3)	++	(+) > b,c,d						Differenza tra metodi su plasma
Troponina I	+	+	+			+		
Troponina T	+	+ c	(+) c					
Urato	+	+	+ <	(+)				
Urea	+	+	+					non usare eparinato di ammonio
Valproato	+	+ b,c,d	+ b,c,d	(+) b,c				
Vancomicina	+	+ b	+ b	(+) b				
Varicella Zoster, virus, amplificazione DNA						++		
Varicella Zoster, virus, anticorpi	+							
Vasopressina (ADH)			+					plasma congelato
Velocità di eritrosedimentazione (VES)						++		1 parte citrato, 4 parti sangue
Virus respiratorio sinciziale, anticorpi	+							
Vitamina A (retinolo)	+							

continua Tabella

Vitamina B1 (tiamina)		+	+					
Vitamina B12 (cobalamina)	+	+ b	++ b					
Vitamina B2 (riboflavina)		+	+					
Vitamina B6 (piridossalfosfato)			++					
Vitamina C (acido ascorbico)		+						stabilizzare con metafosfato 60 mg/L.
Vitamina D (1,25diidrossicolecalciferolo)	+							
Vitamina E (tocoferolo)	+		++					
Vitamina K	+							
Zinco	-	+	-	-				usare provetta speciale dedicata, evitare la contaminazione dal tappo

Legenda della tabella

++ campione raccomandato

+ campione che può essere usato senza variazioni sul risultato

(+) campione che deve essere usato con alcune limitazioni (vedi commenti, in caso di campione in plasma da citrato si riferisce alla considerazione della diluizione da citrato [20])

- campione non raccomandato

He eparina

Ci citrato

< valore diminuito rispetto al campione raccomandato

> valore aumentato rispetto al campione raccomandato

[] riferimento bibliografico

spazi bianchi non si sono ritrovate informazioni in letteratura

lettere a,b,c,d,e informazioni ottenute da ditte di diagnostica

a Ortho, sistemi Vitros

b Abbott, AxSYM

c Roche: Hitachi, Elecsys

d Beckman: Synchron LX/CX, Array, Access

e Dade Behring: BNA

4.2.2 Siero

A coagulazione completata, il campione dovrebbe essere centrifugato per almeno 10 minuti ad una velocità minima di 1500 x g.

4.2.3 Plasma

Per ottenere plasma senza cellule, occorre centrifugare il sangue anticoagulato (con citrato, EDTA o eparina) per almeno 15 minuti da 2000 a 3000 x g. Durante la separazione del siero o del plasma, la temperatura non dovrebbe superare i 24°C e non essere inferiore ai 15°C.

4.3 Conservazione

I campioni non centrifugati possono essere conservati a temperatura ambiente per periodi già inseriti nelle raccomandazioni per la stabilità (12). Dopo centrifugazione, le analisi su siero o plasma dovrebbero essere effettuate nel tempo indicato nelle raccomandazioni per il sangue intero se il sangue intero viene tenuto a temperatura ambiente senza l'uso di gel separatori o filtri di separazione. Se il siero o il plasma deve essere refrigerato o congelato per una conservazione a lungo termine per la labilità di taluni analiti, occorre prima di tutto separarli completamente dalla componente cellulare del sangue. Se si utilizzano gel separatori polimerici, occorre evitare di congelare campioni di sangue intero prima o dopo la centrifugazione.

BIBLIOGRAFIA

1. DIN ISO 6710. Single-use containers for venous blood specimen collection. Berlin (DE): Beuth Verlag, 1996.
2. Goosens W, Van Duppen V, Verwilghen RL K2 or K3-EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology? Clin Lab Haemat 1991; 13:291-5.
3. Polack B, Mossuz P, Barro C, Pernod G. Pre-analytical phase in haemostasis. Proceedings of the First Symposium on the impact of the pre-analytical phase on the quality of laboratory results in haemostasis; 1996 Oct 14; Montpellier (France). Becton Dickinson 1996.

4. Adcock DM, Kressin DC, Martar RA. Effects of 3.2% vs. 3.8% citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997;107:105-10
5. Witt I, Beeser H, Müller-Berghaus G. Minimalanforderungen zur Gewinnung von Citraplasma für hämostaseologische Analysen. *Lab med* 1995;19:245-7.
6. Burnett RW, Covington AK, Fogh-Andersen N, Külpmann WR, Maas AHJ, Müller-Plathe O, Siggard-Anderson O, van Kessel AI, Wimberley PD, Zijlstra WG: Approved IFCC recommendation on whole Blood sampling, transport, and storage for simultaneous determination of pH, blood gases, and electrolytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33:247-53.
7. Engstadt Cs, Guttenberg TJ, Posterut B. Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. *Thrombosis and Hemostasis* 1997;77:690-6.
8. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. Darmstadt (DE): GIT Verlag, 1996.
9. Voit R. Plasma-SerumUnterschiede und Lagerungsstabilität klinisch-chemischer Meßgrößen bei Verwendung von Plasmatrennröhrchen [dissertation] München (FRG): Ludwig-Maximilians-Universität, 1993.
10. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Recommendations on quality assessment of molecular biologic methods in clinical diagnostics. *Clin Chem* 1998; (in press)
11. Qualitätssicherung der quantitativen Bestimmungen im Laboratorium. Neue Richtlinien der Bundesärztekammer. *Dt. Ärztebl* 1998;85:B517-32.
12. Guder WG, da Fonseca-Wolheim F, Heil W, Müller-Plathe O, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. Stabilität der Meßgrößen in der Probenmatrix. *Mitt Dtsch Ges Klein Chem* 1995;26:205-24.
13. Hallbach J, Hoffmann GE, Guder WG. Overestimation of albumin in heparinized plasma. *Clin Chem* 1991; 37:566-8.
14. Da Fonseca-Wollheim F. Deamidation of glutamine by increased plasma γ -glutamyltransferase is a source of rapid ammonia formation in blood and plasma specimens. *Clin Chem* 1990; 36:1479-82
15. Lutomski Dm, Bower RH. The effect of thrombocytosis on serum potassium and phosphorus concentration. *Am J Med Sci* 1994;307:255-8
16. Schwinger R, Antoni DH, Guder WG. Simultaneous determination of magnesium and potassium in lymphocytes, erythrocytes and thrombocytes. *J trace Elem Electrolytes Health Dis* 1987; 1:88-98.
17. Willems HPJ, Bos GMJ, Gerrits WBJ, Heijer M, Vloet S, Blom HJ. Acidic citrate stabilizes blood samples for assay of total homocysteine. *Clin Chem* 1998;44:342-4.
18. Probst R, Brandl R, Blümke M, Neumeier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. *Clin Chem* (in press).
19. Leppänen E, Gräsbeck R. The effect of the order of filling tubes after venipuncture on serum potassium, total protein, and aspartate and alkaline aminotransferase. *Scand Clin Lab Invest* 1980;46:189-91.
20. Lammers M. Dilution of citrated plasma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:369.
21. Holodny M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves Ew, Merigan TC. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991;29:676-9.
22. Jung R, Lübcke C, Wagener C, Neumaier M. Reversal of RT-PCR inhibition observed in heparinized clinical specimens. *Biotechniques* 1998;23:24-8.
23. Ruf A, Patscheke H. Whole blood stabilization for the immunocytometric analysis of blood cells. Basel: FESCC Educational Program, 1997:24.
24. Schmitt Y. Influence of preanalytical factors on the atomic absorption spectrometry determination of trace elements in biological samples. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1987;1:107-14.