

医学
拾萃

IMPROVE REVIEW

标本处理系统篇
Pre-Analytical System

二〇二三年六月刊
June, 2023

📖 Article Reading Guidance
文献导读

📄 Article Abstract Collection
文献摘要

🌟 Featured Article
文献精读

📖 Original Article Reading
文献原文

医学
拾萃

CONTENTS

 Article Reading Guidance
文献导读 | p01

 Article Abstract Collection
文献摘要 | p10

 Featured Article
文献精读 | p21

 Original Article Reading
文献原文 | p29

主编 邓冠华 博士
Chief Editor Dr. Guanhua Deng

联合主编 朱勇 博士
Co-Editor-in-Chief Dr. Yong Zhu

执行主编 高树勇
Executive Editor Shuyong Gao

专刊编辑 田艳丽 博士 李小林 博士 杨艳 博士
Special Editor Dr. Yanli Tian Dr. Jerry Li Dr. Yan Yang

李铁 罗江兰
Tie Li Jianglan Luo

审核编辑 卢嘉丽
Audit Editor Jiali Lu

协作单位 阳普学院
Partnership Improve College

广东省医用材料血液相容性研究企业重点实验室
Guangdong Enterprise Key Laboratory of
Blood Compatibility of Medical Materials

美国吉迪思诊断有限公司
GIMDx, Inc.

联系方式 yxsc@improve-medical.com
Contact Us

 **陽普醫療**
IMPROVE MEDICAL



电子文献



Article Reading Guidance

文献导读

本期的文献导读的是一篇关于《真空采血管标本放置时间和温度对常见检验项目的影响》的综述，结合国内外行业标准指南和已有的文献研究报道，简要归纳了真空采血管标本放置时间和温度对常见检验项目的影响，以便临床化验人员更好地处理标本。

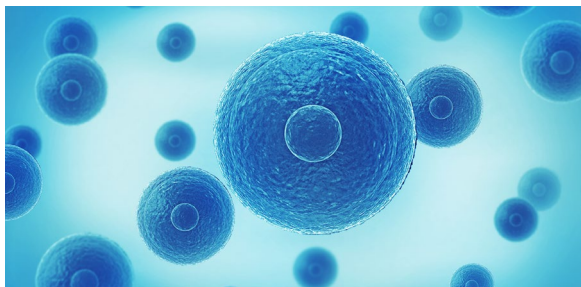
真空采血管标本放置时间和温度对常见检验项目的影响

赵鹭龙

广州市第一人民医院

1. 概述

真空采血管中的血液标本是进行各种检测的基础。在临床检验中，血液标本被用于多种不同类型的项目检验，如血液检验、化学检验、免疫学检验、分子生物学及细胞遗传学检验等，这些检测结果对于疾病的诊断和治疗具有重要的作用。但是，如果血液标本储存不当，会直接影响血液标本的质量以及检测结果的准确性，从而对临床诊断和治疗产生不利影响。因此对于真空采血管标本的处理方式非常重要。其中，标本放置时间和温度是影响标本质量和检验结果的重要因素。本文将综述真空采血管标本放置时间和温度对常见检验项目的影响，以便临床化验人员更好地处理标本。



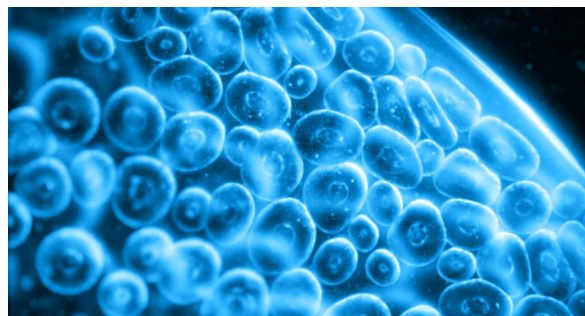
2. 国内外行业标准对静脉血液标本处理的建议

静脉血液标本处理是临床实验室中非常重要的一项工作，它直接影响到检验结果的准确性和诊断结果的正确性。因此，各个国家和地区都制定了相应的行业标准来规范静脉血液标本

的采集、处理和运输。《临床化学检验血液标本的收集与处理》（WS/T 225-2002）^[1]里关于全血处理为血清或血浆标本指出：血清或血浆应尽快地、自然地与细胞接触的全血中分离出来（除非有结论性的证据证明较长时间与细胞接触对结果的准确性没有影响）。从采集标本算起，必须在 2 h 内分离出血清或血浆。已分离的血清/血浆，在 22℃ 保存不超过 8 h。《全国临床检验操作规程》（第 4 版）^[2]建议空腹血浆或全血样本应在采集后 2 h 内分离离心，且应保存在 2~8℃ 下。《静脉血液标本采集指南》（WS/T 661-2020）^[3]在关于血液标本采集后的保存运送的部分指出，静脉血液标本采集后宜及时送检，宜在 2 h 内完成送检及离心分离血清/血浆（全血检测标本除外）。美国临床和实验室标准协会（Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI）^[4]提到，分离的血清/血浆应在室温下保存不超过 8 h。如果测定不能在 8 h 内完成，血清/血浆应冷藏（2~8℃）。如果测定未在 48 h 内完成，或分离的血清/血浆的存储时间超过 48 h，血清/血浆应在 -20℃ 或低于 -20℃ 冷冻。在一般情况下，血清可在 4℃ 下在凝胶上储存长达 48 h，但除外，如苯妥英、苯巴比妥、三环抗抑郁药（阿米替林、丙咪嗪、卡马西平）、奎尼丁、利多卡因和雌二醇，这些药物在吸收到分离凝胶后会随着时间的推移而减少。国际血液学标准委员会（ICSH）^[5]建议血液标本应在采集后 1 h 内送到实验室，并在 4 h 内进行分离血清或血浆，血液标本在运输途中应保持恒温。

尽管已有不少相关标准指南对静脉血液标本处理进行相应的推荐和建议，但在实际检验中，静脉血液标本的检测指标往

往会受标本类型、采集容器、时间、温度、检验仪器等多种因素的影响而显示出差异性。因此，在对标本进行分析处理时，需根据具体检测项目和需要，参照有关国内外标准指南和文献研究建议，选择适宜的处理方式，以确保检测结果的准确性。



3. 标本放置时间和温度对常见检验项目的影响

3.1 蛋白质测定

血清总蛋白代表许多不同蛋白质的总和，其中许多蛋白质彼此独立变化。由于血液中血清总蛋白浓度的测量可用于评估、诊断和监测各种疾病和病症，因此它是调查电解质紊乱、炎症或感染性疾病、初乳摄入量 and 健康状况的最常见的常规分析之一。

标本储存不当是分析前误差的潜在来源，可能会显著影响生化变量的浓度。一些常规临床生化参数（总蛋白、白蛋白、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、微量元素和激素）的稳定性已在不同实验室储存条件下的人类和一系列动物物种中进行了测试，这些研究表明，温度和储存时间是重要因素，可能会影响生化分析的结果^[6]。《临床常用生化检验项目参考区间第2部分：血清总蛋白、白蛋白》（WS/T 404.2-2012）^[7]关于蛋白质测定的血液样品处理建议：血液采用真空采血方式，样品在采集后2 h内及时分离血清，检查并剔除溶血、黄疸或乳糜样品，血清分离后2 h内进行分析。Cray 等^[8]研究了温度和贮存时间对大鼠血清常见生化分析指标的影响。将大鼠血清样本在不同的温度下（4℃、室温、37℃）和不同的存储时间（0 h、2 h、4 h、8 h、24 h）下对样本进行分析。研究发现，ALB和TP的浓度在室温下放置2 h后会逐渐下降，尤其是在高温条件下（超过25℃），ALB和TP的降解速度更快。因此，在蛋白质检测中，及时冷藏或低温保存血清样本可以有效保护ALB和TP的稳定性。

此外，不同的蛋白质对储存条件的敏感程度不同。Daniela 等^[9]评估短期储存马血清的影响（收集后3 h内、4℃/24 h后、4℃/48 h后以及-20℃/48 h后）分析对健康马的

总蛋白质和电泳组分（白蛋白和 α_1 -、 α_2 -、 β_1 -、 β_2 -和 γ -球蛋白）的影响。结果表明血清在4℃下储存24 h和48 h对总蛋白、白蛋白和 γ -球蛋白没有显著影响，但对 α -球蛋白有显著影响，并且血清在-20℃下储存48 h会显著改变所有这些参数。该研究与TOTHOVA^[10]报道的牛物种的结果一致，说明了除了 α -球蛋白以外，样本储存在4℃时，可以在采血后48 h内评估血清蛋白组分，冷藏不会改变分析结果。Christensen^[11]研究了储存温度和时间对人血清蛋白生物标志物稳定性的影响。发现在4℃下储存24 h，大部分蛋白质的含量没有显著变化。而在-20℃或-80℃的低温下长时间储存，某些蛋白质的含量会显著下降，如维生素A结合蛋白（RBP）和A1抗胰蛋白酶（A1AT）等。此外，长时间储存会导致蛋白质降解和聚集，影响其稳定性。因此，对于血清蛋白质生物标志物的储存和分析，应该选择合适的温度和储存时间，并尽可能快地进行分析。

总的来说，对于血清标本的处理，应该尽量避免长时间的存储和高温环境，以保证蛋白质的稳定性和准确性。了解血清标本的存储条件对蛋白质检测结果的影响，可以帮助实验室技术人员制定最佳的样本处理方法和测量条件，以确保结果的准确性和可靠性。

3.2 无机离子测定

血清钾、钠、氯测定是临床常见的组合检测项目之一，有助于水、电解质平衡和酸碱平衡紊乱的判断。标本放置的时间和温度均会使电解质浓度和PH值发生明显的改变。

《全国临床检验操作规程》^[2]指出，血清或血浆标本应及时分离，因全血标本放置时间过长，体外红细胞能量代谢受到抑制，能量不足导致红细胞膜上 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP酶不能正常运转，从而不能将红细胞内逸出的钾转运到胞内，造成血清钾升高，使测定结果出现假性增高。正常情况下，红细胞内外钠、钾离子的平衡由三磷酸腺苷酶维持，当标本冷藏时，三磷酸腺苷酶的活性降低，造成血钾假性升高。测定血钾标本时，室温放置30~45 min后离心分离血浆或血清。室温下，从接收标本到上机检测的最长时间限制是4 h，15~30℃的环境下不应超过8 h。如无法在4 h内完成，血清或血浆应该被保存在2~8℃，在48 h内完成测定。测定血钠时，血清、血浆标本可以在2~4℃或冷冻存放，红细胞中钠的含量仅为血浆中的1/10，即使溶血对钠浓度测定影响也不会太大。

正常的血钠水平是135~145 mmol/L。有研究报道^[12]抗凝全血在4℃条件下保存3周，可导致细胞内的钠离子水平升高和细胞内钾离子水平下降，同时伴随着悬浮血浆中钠离子和钾离子水平的相反变化。正常血钾水平为3.5~5.0 mmol/L，在第

10 天和第 15 天, 钾浓度分别增加了 21.4% 和 60.7%。钾浓度的增加可能是由于低温 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATP}$ 酶的保钠储钾功能受抑造成细胞内钾外移, 使血清钾测定结果增高。

血液离体后, 细胞内外钾离子分布差异, 以及细胞因代谢需要消耗能量, 细胞膜通透性增加、溶血以及血液凝固过程中血小板破坏, 均会导致细胞内钾离子发生转移和释放, 所以测定血钾的标本应尽早分离。CLSI 建议^[13,14]室温下测定钠和钾离子的标本应在收集后 60 min 内离心完。还建议在确定钙离子浓度时, 应在 30 min 内分析完, 因为室温下全血标本储存效果不如血清, 应尽快离心。这类似于 IFCC 的建议^[15], 该建议表示用于检测钙离子浓度的全血标本应在室温 15 min 内进行分析。Gerald 等^[16]研究了静脉血标本分析前钠离子、氯离子、钙离子在室温和冷藏条件下的稳定性, 结果显示在室温条件下, 全血钠、钾、离子钙和氯的浓度保持稳定至少 109 min。在冷藏环境中, 除钾离子外, 所有电解质浓度都保持稳定, 最长可达 178 min。

因此, 在进行血清无机离子测定时, 应该尽量避免将标本长时间暴露于室温或高温下。不同研究报道中对同一指标验证结果的差异仅可作为临床处理标本时的参考, 在实际检验项目开展时, 往往还需要结合其他因素进行综合评估, 以确保样本在适当的条件下存储和处理, 最终获得准确和可靠的结果。



3.3 血清酶检测

酶是能催化人体化学反应的一类特殊蛋白质。酶产生于人体不同组织, 体液中酶的浓度反映相应组织或器官的生理病理状态, 因而可用于临床诊断。通常, 血清/血浆谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的活性被作为肝脏损伤的指标来测量, 血清/血浆碱性磷酸酶 (ALP) 的活性被用来评估胆汁淤积症。然而, 酶活性测定的结果会受到分析前因素的影响, 如血液标本在采血和分析时的保存、储存或处理方法不当, 可能产生可能导致错误的诊断结果。

Divya 等^[17]研究了存储温度和时间对常见的几种血清酶活

性的影响。对不同温度条件下 (4°C、-20°C 和室温) 血清中酶的稳定性与第 1 天、2 天、5 天、8 天、11 天和 14 天的新鲜血清样本 (第 0 天) 的酶活性进行比较, 发现谷丙转氨酶 (ALT) 在 4°C 的条件下足够稳定, 而在室温和 -20°C 下则不稳定。谷草转氨酶 (AST) 在 4°C 和 -20°C 下都稳定到 14 天, 而在室温下只稳定到 2 天。碱性磷酸酶 (ALP) 在储存时显示出很大的变化, γ -谷氨酰转移酶 (GGT) 活性在 -20°C 时的稳定性比在 4°C 时的稳定性要差。同样, Nwosu 等^[18]对比在冰箱 (2~8°C, 平均 4°C) 和室温 (30~34°C, 平均 32°C) 下储存 120 h (5 天) 的血清和血浆样品中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和碱性磷酸酶 (ALP) 值的变化。发现检测的这几种酶在冷藏的样品中比在室温下保存的样品更稳定, 并且在相同储存温度下, 血清中的酶比血浆中的酶更稳定。其他研究者^[19]也报道了与血浆相比, 血清中的酶更稳定, 这使得血清成为检测这些酶活性的首选样品。这些酶在血浆样品中的不稳定性可能是由于在收集样品时使用的抗凝剂的干扰。

已有的报道大多评估了短期内研究标本储存时间和温度对血清酶的检测影响, 对于需要长期保存的标本稳定性研究也是非常必要的。Kolahdoozan^[20]评估了几种肝胆酶在 -70°C 储存 5 年的稳定性, 研究结果显示, ALT、AST 和 ALP 在最初储存后的三个月都有明显的下降趋势, GGT 在 5 年后没有明显差异, 所以不建议将样本在 -70°C 储存超过 2 年, 否则无法检测到大部分的酶。

血清标本的放置时间和温度是影响血清酶测定结果的重要因素, 对于不同的酶类, 其在不同的温度和时间下的稳定性和活性降解情况也不同。一般而言, 较高温度下酶的降解会更快, 而低温 (4°C) 则会使酶的活性保持更长时间, 但需要注意标本冷冻保存的时间不宜过长, 如需要长时间保存需要提前做好稳定性验证, 以确定最佳的保存时间。因此, 在实际操作中, 应根据具体酶的特性和实验需求, 选择合适的存储条件, 以保证测定结果的准确性和可靠性。

3.4 血液葡萄糖检测

细胞活动的大部分能量来自葡萄糖, 人体所需的能量有 70% 以上是由葡萄糖氧化过程提供的, 这对维持人体的正常生理功能非常重要。血液葡萄糖 (glucose, Glu) 测定在评估机体糖代谢状态、诊断糖代谢紊乱相关疾病, 指导临床医师制定并适时调整治疗方案等方面具有重要价值。

血糖的检测可以在全血、血清或血浆中进行。《全国临床检验操作规程》^[2]指出, 全血葡萄糖浓度比血浆或血清低 12%~15%。取血后如全血放置室温, 血细胞中的糖酵解会使葡萄糖浓度降低, 因此标本采集后应尽快分离血浆或血清。

血浆标本最常见的抑制剂是氟化钠，通常与抗凝剂草酸钾一起使用。全血标本常用的抗凝血剂是乙二胺四乙酸（EDTA 盐）。当 EDTA 盐加入血液样本中时，它会螯合血液凝结所需的钙，通过络合作用形成溶于水的络合物，从而防止纤维蛋白的形成。Kehaled 等^[21]以 30 min 为间隔，测定不同抗凝标本在 3 h 内血糖水平的变化。发现无论使用何种抗凝剂标本，葡萄糖的浓度在储存期间都不会一直处于稳定状态，但以氟化钠/草酸钾抗凝标本的糖酵解速度最慢。因为氟化钠能抑制糖酵解过程中烯醇酶的活性，从而减缓葡萄糖的分解。美国糖尿病协会（ADA）^[23]2002 年发布的建议和 2006 年世界卫生组织指^[24]明确指出，静脉血浆是血糖评估的首选样本，并且强调需立即将血浆葡萄糖样品放冷藏环境中，在 30 min 内进行离心。

在实际临床检验中也常用血清标本检测葡萄糖水平，但其稳定性与标本的放置时间和温度有关，是临床检验结果准确判断的关键。Ahmed^[22]研究了在 4℃（24 h、48 h、72 h）和 25℃（0 h、2 h、6 h、12 h）的血浆和血清样本中葡萄糖水平的变化，发现室温下储存的血清葡萄糖的稳定性在 2 h 内，而在 4℃储存的血清葡萄糖在 24 h 内稳定。血浆葡萄糖在室温下的稳定性不超过 6 h，而在 4℃下储存时的稳定性为 48 h。

因此，为了得到可靠的结果，建议临床优先选择氟化钠/草酸钾抗凝血浆标本检测血液中的葡萄糖，也可以用血清或全血标本。但不管使用哪种标本类型，均应控制好标本适宜的放置时间和温度，在收集样本后立即或尽可能短的时间内进行葡萄糖测定。

3.5 血细胞分析

根据国际血液学标准化委员会建议^[25]，K₂-EDTA 抗凝血液是自动细胞计数的首选标本。血细胞分析标本的采集应使用 EDTA 抗凝剂。《临床血液与体液检验基本技术标准》（WS/T 806-2022）^[26]中关于标本的处理与储存建议：血细胞分析的临床标本宜在采集后 8 h 内完成检测。

全血细胞计数（CBC）和白细胞分类计数（DLC），是最常见的血液学实验室检测之一。CBC 的结果可能会受到不同的分析前因素的影响，例如温度和时间。根据国际血液学标准化委员会的建议和后续审查，CBC 和 WBC 计数自动分类计数的最大存储间隔在 4℃ 下稳定至少 24 h，甚至到 72 h，有显著差异取决于自动血细胞分析仪的类型^[27]。Gunawardena 等^[28]采用 Sysmex XS-500i（Sysmax）血细胞分析仪测量发现，在 CBC 参数中，白细胞（WBC）、红细胞（RBC）、血红蛋白（Hb）、平均细胞血红蛋白（MCH）、中性粒细胞和淋巴细胞在所有三个温度（4℃、10℃、23℃）下都稳定长达 48 h，除了血小板计数（PLT）应在采集后 6 h 内进行。

Kayadibi 等人^[29]评估了 CBC 在含有 K₂-EDTA 的样品中的稳定性，发现标本在 4℃ 和室温下储存长达 240 min。与 Cadamuro 等^[30]研究的结果类似，在常温或低温条件下，CBC 的大多数参数在 24 h 内保持稳定。而在进行 CBC 和 DLC 时，建议以 4℃保存 12 h 为最适保存条件。因此，也建议所有处理大量血液学标本的实验室提前确定好不同检测指标对于样本保存时间和温度的影响，以将误差降至最低。

综上所述，临床检验标本保存时间和温度会对全血细胞计数产生明显影响，应确保临床采集的全血标本及时送检，尽可能在 3 h 内完成检验，并注意全程避免接触可使标本温度升高的热源。对于未能及时送检的标本应及时放置于 4℃环境下保存，并在 24 h 内尽快检测。对于保存时间延长的标本，检测结果应充分考虑时间和温度因素的影响，从而为相关疾病早期筛查、诊断和治疗提供真实可靠的依据。



3.6 糖化血红蛋白检测

糖化血红蛋白是红细胞中血红蛋白与葡萄糖的结合产物，HbA_{1c} 是糖化血红蛋白的主要组成成分，是糖尿病患者长期并发症发展的指标。不同的样本储存条件可能会影响 HbA_{1c} 值，从而影响临床医生的诊断。

通常大规模流行病学研究和临床试验的样本可能需要长期保存，Bergmann 等^[31]的一项研究表明，样品在 -80℃下储存 2~12 周不会影响用高效液相色谱法（Bio-Rad D-10[®]分析仪）测量的 HbA_{1c} 浓度。对于许多常规临床样本一般在短时间内使用 4℃的储存温度。Niazpour 等^[32]采用 COBAS Integra 400 测量评估不同储存条件对全血标本中糖化血红蛋白（HbA_{1c}）浓度的影响，研究发现在常温下储存的血液样本中，HbA_{1c} 浓度在储存 2 天后显著下降；而在 4℃下储存的样本中，HbA_{1c} 浓度仅在储存 7 天后才出现显著下降。我国卫生行业标准《糖化血红蛋白检测》（WS/T 461-2015）^[33]指出：糖化血红蛋白检测需采用含有乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝剂的采血管。一般情况下，全血样品在 4℃储存，可以稳定 1 周。在 -70℃或

更低温度可以长期储存，至少稳定 1 年以上，但不宜在 -20℃ 长期储存。

标本存放的时间和温度对糖化血红蛋白值有较大影响，因此要结合行业标准推荐及有关文献报道，谨慎处理标本存放温度与时间。



3.7 血液流变学测定

血液流变学 (hemorheology) 是研究血液流动与变形性及其临床应用的，《全国临床检验操作规程》^[2]中关于血液流变学检查质量的要求明确：采血后的标本应立即送检进行测试，样本 18~25℃ 保存，最好于 4 h 内完成测试。在室温下存放时间过长，会引起测量结果偏高，若存于 4℃ 冰箱可延长至 12 h。血样不宜在 0℃ 以下存放，因为在冷冻条件下红细胞会发生破裂。

有关文献报道^[34]标本存放的温度为 4℃ 时血液流变学指标较为稳定。而随着温度的上升，血液流变性质会发生改变，如黏度、弹性模量等指标会产生较大的波动。Uyuklu 等^[35]评估了储存温度（即 4℃ 或 25℃）和持续时间对健康对照者和脓毒症患者血液的红细胞变形性和聚集性的影响，对于健康的血液标本，血液可以在 25℃ 下储存长达 6 h 以进行变形性研究，但如果研究还包括红细胞聚集，则这段时间应限制在 4 h 内。而在 4℃ 下存储可将聚集度测量的存储期延长至 12 h，但不能将变形性测量的存储期延长至 12 h。对于败血症患者的血液样本受储存的影响较小。因此，建议采样和测量之间的时间间隔应尽可能短，并与结果一起报告。

血液标本放置时间与温度都是影响血液流变学检测结果的重要因素。为了保证检测结果的准确性，必须严格控制这些因素。此外，由于各种因素的影响可能不同，在进行血液流变学检测时，还需要综合考虑不同的情况，确保最终结果的准确性和可信度。

3.8 红细胞沉降速率测定

血沉作为一项常见的炎症指标，在临床检验中应用广泛。红细胞沉降速率 (ESR) 是衡量血液黏稠度的指标，也是检测炎症反应程度的标志物之一。常见的检测方法有魏氏检测法和自动分析仪法，不同检测方法对本标的处理条件稍有差异。

《全国临床检验操作规程》^[2]指出：魏氏检测法血沉检测采集完静脉血标本，垂直立于室温 1 h 后，读取上层血浆高度的毫米数值即为红细胞沉降率。该检测应在标本采集后 3 h 内测定完毕。存放时间超过 3 h 的样品，会出现假性增高。自动分析仪法测定的抗凝血标本应在室温条件下 (18~25℃)，2 h 内测定。在测定期内温度不可上下波动，稳定在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 之内。室温过高时血沉加快，可按温度系数校正。室温过低时血沉减慢，无法校正，存放时间超过 3 h 的样品，结果会有假性增加。根据 1993 年国际血液学标准化委员会 (ICSH)^[36]的建议，当血沉检测的血液放置在室温下时，试验必须在 2 h 内完成，或在 4℃ 时在 6 h 内完成。美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS)^[37]建议血液样本可以在 4℃ 下保存 4 h 以上，但任何这样长时间的保存都必须得到验证。如果将试样放在环境（室温 18~25℃）温度下，必须在 4 h 内完成测试。如果标本保存在 4℃，标本应恢复到室温，测试应在 12 h 内完成。

有研究^[38]表明 ESR 的测量取决于样本储存的时间和温度，在 4℃ 和 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 的环境下，魏氏检测法测定的 ESR 稳定性分别为 8 h 和 6 h。意味着如果标本储存在冰箱里，必须在 8 h 内进行测试；如果标本储存在室温下，ESR 测试应在 6 h 内进行。因为 ESR 的稳定性会随着时间的推移而降低，常温下放置时间过长会使红细胞变成球形难以聚集。同时，红细胞膜表面和血浆蛋白之间的电荷相互作用也会发生改变。低温下放置时间过长会因血浆粘度在较低温度下增加，导致 ESR 稳定性降低。该研究与 Cladio^[39]采用 TEST1 研究的结果一致，在 15~25℃ 下 ESR 的稳定性长达 8 h，在 2~8℃ 稳定性长达 24 h，进一步证明了这两种检测方法对于血沉的检测适用性，不会影响检测结果。

因此，为了在临床研究环境中获得最佳结果，红细胞沉降率应该在采样后尽快测量，如需保存应进行有关验证或参考有关指南建议进行，并综合考虑其他因素的影响。

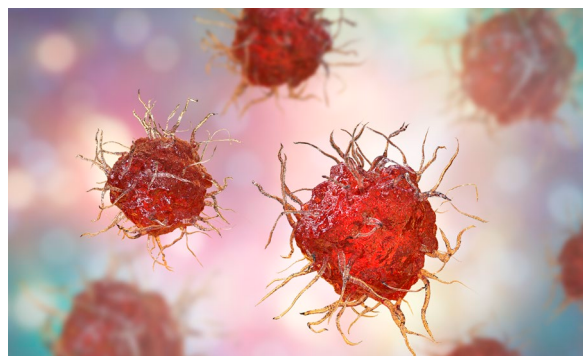
3.9 对血氨检测的影响

血液和血浆中的氨浓度在采集后会自发增加，这种增加主要是通过血浆和细胞蛋白脱氨和可能的溶血释放氨来实现的。血氨浓度与红细胞、血小板计数、血浆 γ -谷氨酰转氨酶和丙氨酸氨基转移酶活性呈正相关。所以，为了减缓体外氨

的产生,血液样本必须在采集后 15 min 内迅速运送到实验室,并立即在 4℃下离心后分析,以阻止细胞新陈代谢,并限制体外产生氨的酶的活性^[41]。对于血液采集点位于离实验室一段距离的地方,无法实现快速分离血浆和细胞的情况,也有研究验证了用于氨浓度测量的新鲜血液样本通过气动传输到实验室处理的时间对结果没有显著影响。离心前和离心后 1 h,只要样品保持低温,氨浓度不受等待时间长达 1.75 h 的影响(即 105 min)。否则,最好将血浆样品在 -80℃冷冻保存^[40]。

《全国临床检验操作规程》对于血浆氨测定的标本采集要求指出^[2],血氨检测标本应使用草酸钾、EDTA 或肝素抗凝的血浆标本,不能用肝素铵和氟化物抗凝,将使测定值增高。标本采集后,血液中氨基酸即可发生脱氨分解,可造成血氨浓度升高。即使在 0℃,采血后 15 min 以上就可引起血氨浓度升高;在 25℃时,血氨浓度增高速率约为 0.017 μg/(min·mL)血液。因此,采血后必须立即置冰浴,尽快分离出血浆,及时进行测定。Gifford 等^[42]人开发了一种简单的方法,用于稳定采血后超过 12 h 的血氨分析标本。该方法包括用酶抑制剂硼酸钠/L-丝氨酸对血浆标本进行预处理,并在 4℃下运输和储存。经过这样的预处理,他们表明,对于 ALT 或 GGT 活性正常和升高的样本,体外氨的生成率低于 0.5 μmol/L/h。另外该研究还证实了在 -80℃下储存样本可以保持氨的稳定性,不受 ALT 或 GGT 活性的影响,但是样本必须在 30 min 内解冻完毕。

因此,对于血浆氨的检测应在采集完标本后立即进行分析,特别是对于代谢或肝脏病理疾病患者的血液样本应尽快分析,以尽量减少分析前血浆氨在不同储存条件中引起的不稳定性对检测结果判断造成影响。



3.10 止血与血栓检测

常见检测凝血四项包括凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)和凝血酶时间(TT)。其中,PT 主要用于评估外路凝血系统的功能,检测

凝血因子I、II、V、VII、X和纤维蛋白原等凝血因子的活性情况。《全国临床检验操作规程》^[2]建议标本采集到处理的时间尽量缩短。这对某些检测很重要,如因子VIII最不稳定,若无法立即检测,可将标本置于 -80℃冰箱中。血小板功能检测,标本应该储存于 18~24℃,禁止存放于冰箱中。临床实验室和标准协会(CLSI)^[43]建议大多数凝血参数必须在室温 4 h 内进行评估,但旨在监测全剂量普通肝素治疗的测试除外,其延迟时间不得超过 2 h。欧洲血栓形成协调行动(ECAT)^[44]和法国凝血酶与血栓形成研究组(GEHT)^[45]也提出了类似的建议。对于常规凝血测试,如凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT),应在 2 h 内将标本送到实验室进行测试。如果不能立即测试,则应将标本保存在室温下,不超过 4 h。如果需要更长时间的存储,则应将标本保存在冰箱中,温度在 2~8℃之间,并在 72 h 内进行测试。

《临床血液与体液检验基本技术标准》(WS/T 806-2022)^[25]中建议,用于血栓与止血常用检测项目的抗凝剂为 105 mmol/L~109 mmol/L (3.1%~3.2%,通常为 3.2%)的枸橼酸钠水合物($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),血液与抗凝剂体积的比例为 9:1。用于血栓与止血常用项目检测的标本,宜置于室温(18℃~24℃)条件下,在标本采集后 1 h 内分离出血浆,4 h 内完成检测;若标本无法在采集后 4 h 内检测,应分离血浆并移至洁净干燥的不导致接触激活的试管(如聚丙烯材质的试管)中,加可螺旋封口的盖子,冷冻于 -20℃(最多保存 2 周)或 -70℃(最多保存 6 个月)。用于血小板聚集实验的标本,宜在 18℃~24℃条件下处理,不能冷藏或冷冻。血小板聚集实验宜在采血后 30 min 到 4 h 之间完成检测。

有研究^[46]显示标本放置时间过长、过短均会影响到检测结果。当将标本放置于室温中 8 h 之后进行检测时,检测所得 PT、APTT 均显著高于即时检测结果;送检时间超过 4 h 就会导致 TT 检测结果高于即时检测。Feng 等^[47]研究发现用于 Fbg、PT/INR 和 TT 测定的血浆样本可以在 4℃和 25℃下安全储存长达 24 h;用于 APTT 测量的标本可以在 4℃下安全储存 12 h,在 25℃下稳定储存 8 h。Toulon 等^[48]报道了未离心的柠檬酸盐血液样本在室温下不同储存时间对常规凝血试验结果的影响,PT/INR、APTT、纤维蛋白原、FV 和 D-二聚体可以在采血后室温下储存长达 8 h;对于 FVIII,最佳储存时间是 6 h。

因此,在临床中进行凝血四项检测时,需加强对标本的放置时间和保存温度进行严格控制。在标本采集后送检时间需控制在室温 2 h 之内完成,建议不超过 4 h。进而提高检测结果的准确性。受实验室不同的条件或分析系统的影响,研究结论可能会有所不同,需要综合评估判断。

4. 总结

真空采血管标本检测结果受影响因素较多,包括真空采血管类型、标本放置温度、标本放置时间及检验设备等,相同环境中,同一项目的不同检测指标也会表现出差异性。而检测结果的精确性对保证疾病治疗方案合理性及有效性具有重要意义。因此,在临床实践中,需根据具体检测项目和需要,遵循有关标准和指南的建议,以确保检测结果的准确性和可靠性。同时,应选择适宜规格的真空气血管,并严格控制血液标本放置温度及时间。此外,医护人员在进行标本采集、运送和储存过程中,应严格遵循标准化操作指南,切实做好检验前标本质量控制相关工作。因临床实际工作中不可避免会遇到标本不合格情况,所以掌握不合格标本出现的可能因素及对检验造成的影响,有利于临床对检验结果做出正确的客观评价,最大程度降低误判风险。

参考文献

1. 中华人民共和国卫生部.WS/T 225-2002. 临床化学检验血液标本的收集与处理. [S]. 北京:中国标准出版社,2002.
2. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 全国临床检验操作规程 (第四版). 北京: 人民卫生出版社,2015.
3. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 静脉血液标本采集指南.[J]. 中国实用乡村医生杂志 2020 年 27 卷 5 期, 7-11 页, 2020.
4. CLSI GP44-A4 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline--Fourth Edition.USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.2010.
5. ICSH. Specimen Collection and Handling for Diagnosis of Blood Diseases. 6th ed. International Council for Standardization in Haematology; 2003.
6. Jakubowski J, Aebischer V, Luetzelschwab J, et al. Stability of clinical chemistry parameter values in minipig serum under different storage conditions. [J]. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 1998, 25: 197-204.
7. WS/T 404.2-2012, 临床常用生化检验项目参考区间第 2 部分:血清总蛋白、白蛋白.[S].
8. Cray C, Rodriguez M, Zaias J, et al. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. [J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2009, 48(2): 202-204.
9. Alberghina Daniela,Casella Stefania,Giannetto Claudia et al. Effect of storage time and temperature on the total protein concentration and electrophoretic fractions in equine serum.[J].Can J Vet Res, 2013, 77: 293-6.
10. TOTHOVA C, Nagy O, Seidel H, et al. The effect of storage on the protein electrophoretic pattern in bovine serum. [J]. 2010.
11. Christensen EI, Birn H. Effect of storage temperature and time on the stability of serum protein biomarkers. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2011, 71(7): 573-579.
12. Ono T,Kitaguchi K,Takehara M et al. Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood.[J].Clin Chem, 1981, 27: 35-8.
13. Clinical and Laboratory Sciences Institute (CLSI). Standardization of sodium and potassium ion-selective electrode systems to the flame photometric reference method; approved standard, 2nd Ed. Report no. C29-A2 (Vol. 20, No. 17). CLSI; 2000. 21 pages.
14. Clinical and Laboratory Sciences Institute (CLSI). Ionized calcium determination: precollection variables, specimen choice, collection, and handling; approved guideline, 2nd Ed. Report no. C31-A2 (Vol. 21, No. 10). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2001. 23 pages.
15. Boink AB, Buckley BM, Christiansen TF, Covington AK, Maas AHJ, Mullerplathe O, et al. IFCC recommendation on sampling, transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum. Clin Chim Acta 1991; 2021;202: S13-S21.
16. Gerald S Zavorsky, Xander M R van Wijk, Samuel Gasparyan, Nicholas S Stollenwerk, Rebecca A Brooks, Stability of Whole Blood Electrolyte Specimens at Room Temperature vs. Slushed Ice Conditions, The Journal of Applied Laboratory Medicine, Volume 7, Issue 2, March 2022, Pages 541–554.
17. Divya P D, Jayavardhanan K K. Effect of time and temperature on the storage stability of hepatobiliary enzyme activities in cattle serum. [J]. Indian Journal of Animal Research, 2014, 48(2): 129-133.
18. Nwosu O K, Aloh G S, Ihedioha J L. Changes in alt, ast and alp values of plasma and serum samples stored at refrigerator (4°C) and room temperature (32°C) for up to five days. [J]. Bio-Research, 2009, 7(2).
19. Kachhawa Kamal,Kachhawa Poonam,Varma Meena et al. Study of the Stability of Various Biochemical Analytes in Samples Stored at Different Predefined Storage Conditions at an Accredited Laboratory of India.[J]. J Lab Physicians, 2017, 9: 11-15.
20. Kolahdoozan S, Sepanlou S G, Sharafkhan M, et al. Effect of storage temperature and time on stability of liver enzymes in blood serum. [J]. Archives of Iranian Medicine, 2020, 23(5): 296-301.
21. Al Salhen K S, Saad E K, Aznine A J. The effect of storage time and different anticoagulants on fasting blood glucose concentration. [J]. Al-Mukhtar Journal of Sciences, 2018, 33(2): 104-111.
22. Ahmed M O H M. Effects of Storage Temperature and Duration on Glucose Levels in Serum and Plasma[D]. Sudan University of Science and Technology, 2018.
23. Sacks D B, Bruns D E, Goldstein D E, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. [J]. Clinical chemistry, 2002, 48(3): 436-472.
24. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. [J]. 2006.

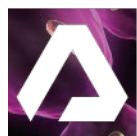
25. England JM, Rowan RM, Van Assendelft OW, et al. Recommendations of the international council for standardization in haematology for Ethylene Diamine Tetraacetic Acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *Am J Clin Pathol* 1993; 100:371–372.
26. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床血液与体液检验基本技术标准. WS/T 806-2022.
27. Unalli OS, Ozarda Y. Stability of hematological analytes during 48 hours storage at three temperatures using Cell-Dyn hematology analyzer. *J Med Biochem*. 2021 Jun 5;40(3):252-260.
28. Gunawardena D, Jayaweera S, Madhubhashini G, Lokumarakkala DD, Senanayake SJ. Reliability of Parameters of Complete Blood Count With Different Storage Conditions. *J Clin Lab Anal*. 2017;31(2): e22042.
29. Kayadibi H, Acar IA, Cam S. Stability of complete blood count parameters depends on the storage temperature, storage time, transport position and selected stability criterion. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2020: 1–9.
30. Cadamuro J, Lippi G, von Meyer A, et al. European survey on preanalytical sample handling - Part 1: How do European laboratories monitor the preanalytical phase? On behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Biochem Med (Zagreb)*. 2019;29(2):020704.
31. Bergmann K, Sypniewska G. The influence of sample freezing at - 8°C for 2 - 12 weeks on glycated haemoglobin (HbA_{1c}) concentration assayed by HPLC method on Bio-Rad D-10® auto analyzer. *Biochem Med (Zagreb)* 2016;26(3):346-52.
32. Niazpour F, Bandarian F, Nasli-Esfahani E, Ebrahimi R, Abdollahi M, Razi F. The Effect of Blood Sample Storage Conditions on HbA_{1c} Concentration. *Clin Lab*. 2019 Jul 1;65(7).
33. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 糖化血红蛋白检测. WS/T 461-2015.
34. 胡子红, 汪琛, 黄志彬. 血液保存温度和时间对测量血液流变学指标的影响[J]. *流体机械*, 2019, 47 (4): 104-108.
35. Uyuklu M, Cengiz M, Ulker P, et al. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;41(4):269-278.
36. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology). *J Clin Pathol*. 1993; 6:198–203.
37. Koepke J A, Chairholder, Bull B S, et al. Reference and Selected Procedure for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test; Approved Standard—Fourth Edition.
38. Hu, QL., Li, ZJ., Lin, L. et al. Effect of storage temperature and time on erythrocyte sedimentation rate. *Eur J Med Res* 27, 76 (2022).
39. Ilardo Claudio, Richerd Christiane, Rostain Vanessa, Impact of preanalytical storage on the measurement of erythrocyte sedimentation rate using an infrared microphotometer system (TEST1). [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2020, 80: 523-524.
40. Ib A, Pep B, Ja A, et al. Transportation and handling of blood samples prior to ammonia measurement in the real life of a large university hospital – ScienceDirect. [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 510:522-530.
41. Dukic L, Simundic AM. Short-term and long-term storage stability of heparin plasma ammonia. *J Clin Pathol*. 2015;68(4):288-291.
42. J.L. Gifford, W.N.T. Nguyen, L. de Koning, I. Seiden-Long, Stabilizing specimens for routine ammonia testing in the clinical laboratory, *Clin. Chim. Acta*. 478 (2018) 37–43.
43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline. 5th ed. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
44. Walker ID. Blood collection and sample preparation: pre-analytical variation. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, eds. *Laboratory Techniques in Thrombosis - A manual*. 2nd revised edition of ECAT assay procedures. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 21-28.
45. Polack B, Schved J F, Boneu B et al. Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. [J]. *Haemostasis*, 2001, 31: 61-8.
46. 周以华. 凝血真空采血管和标本放置时间与温度对常规凝血四项检测结果的影响[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(A02):3.
47. Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep*. 2014 Jan 27; 4:3868.
48. Toulon P, Metge S, Hangard M et al. Impact of different storage times at room temperature of unspun citrated blood samples on routine coagulation tests results. Results of a bicenter study and review of the literature. [J]. *Int J Lab Hematol*, 2017, 39: 458-468.

分离 - 稳定

阻隔一切干扰可能



IMPROVACUTER®
分离胶促凝管



Article Abstract Collection

文献摘要

本期的文献摘要，选取了综述中若干有关标本放置时间与温度对几种检验项目影响的参考文献，针对其中的文献摘要部分进行中文翻译。这些文献或综述研究了关于静脉血液标本放置时间和温度对临床不同检验项目的影响及相关的标本分析过程处理建议。

参考文献摘要翻译

1. Jakubowski J, Aebischer V, Luetzelshwab J, et al. Stability of clinical chemistry parameter values in minipig serum under different storage conditions. [J]. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 1998, 25: 197-204.

摘要

常规临床化学参数（葡萄糖、总蛋白、白蛋白、尿素、肌酐、天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、肌酸激酶、总胆红素、胆固醇、甘油三酯、无机磷酸盐、钠、钾、镁、钙、氯）的稳定性和乳酸脱氢酶）在不同实验室储存条件下在小型猪血清中进行了测试。这些值是在 Beckman Synchron CX-5 的帮助下确定的。根据 IFCC 的建议对所有酶进行了测定。这些分析是在小型猪和质量控制的血清中进行的。表中列出了各种酶活性、电解质和其他临床生化值。在不同时间段后测定在室温和 -20°C 下储存的 24 只小型猪血清（12 只雄性和 12 只雌性）的参数值。在所有血清（新鲜和储存）中发现了相似的临床化学值。对测量值进行参数或非参数统计分析。未观察到新鲜血清和储存血清之间存在统计学显著差异 ($p > 0.05$)。可以得出结论，在 -20°C 下储存 70 或 90 天不会导致小型猪血清样本的临床化学测量发生统计学上的显著变化。

2. Cray C, Rodriguez M, Zaia J, et al. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. [J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2009, 48(2): 202-204.

摘要

血清通常被冷冻并储存起来，以备日后分析。这项研究评估了大鼠血清中 17 种分析物在 4°C 冷藏和 -20°C （无霜和无霜冰柜）和 -70°C 延长储存期间的稳定性。使用自动干玻片化学分析仪在 0 时间对样品进行分析，然后以等分的形式存储在 7 天、30 天、90 天和 360 天进行分析。冷藏 7 d 后，只有肌酸激酶活性变化超过起始值的 10%。在 -70°C 下冷冻明显优于 -20°C ，后者最早在第 30 天观察到二氧化碳的变化，在第 90 天观察到丙氨酸转氨酶的变化。保存在无霜和无霜 -20°C 冰柜中的样品在 90 天内没有显著差异。在设计任何回溯性研究时，应考虑储存时间和温度等因素。



3. Alberghina Daniela, Casella Stefania, Giannetto Claudia et al. Effect of storage time and temperature on the total protein concentration and electrophoretic fractions in equine serum. [J]. Can J Vet Res, 2013, 77: 293-6.

摘要

血清蛋白电泳 (SPE) 是一种技术, 可以被认为临床医生最有用的诊断辅助手段之一。评估了 24 匹健康马的总蛋白和电泳组分 (白蛋白、 α_1 -、 α_2 -、 β_1 -、 β_2 -和 g-球蛋白) 的储存时间和温度的影响。通过颈部静脉穿刺收集的所有样本都被离心, 并分成 4 个等分样本。单向重复测量方差分析 (ANOVA) 显示, 不同的储存条件对所有研究参数的浓度有显著影响 ($p < 0.05$), 白蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白和 g-球蛋白的百分比也有显著变化。与时间 0 相比, -20°C 下 48 h 后总蛋白浓度明显增加, -20°C 下 48 h 后白蛋白百分比下降, 4°C 下 24 h 后 α_1 -球蛋白百分比增加, 4°C 和 -20°C 下 48 h 后 α_2 -球蛋白百分比增加, -20°C 下 48 h 后 g-球蛋白百分比增加。这些结果应有助于兽医从业者适当地处理和储存马血清样品。在不同的储存时间和温度下的进一步调查可能是有用的。



4. TOTHOVA C, Nagy O, Seidel H, et al. The effect of storage on the protein electrophoretic pattern in bovine serum. [J]. 2010.

摘要

本研究旨在评价不同贮藏条件对牛血清中主要蛋白质组分相对浓度及其比例的影响。血液样本取自六头低地黑斑奶牛及其杂交品种的奶牛。分离的血清被分成等份。一种样品在分离后立即进行分析, 不进行储存。第二种样品在 4°C 下保存 1 天, 其余样品在 -18°C 下冷冻 2 天、7 天和 21 天, 然后分析。用琼脂糖凝胶电泳分析血清的主要蛋白质组分: 白蛋白 (%)、 α -球蛋白 (%)、 β -球蛋白 (%) 和 γ -球蛋白 (%)。随着时间的推移, 在

-18°C 储存期间, 牛血清中白蛋白的相对浓度有显著降低的趋势 ($p < 0.001$)。 α -球蛋白和 γ -球蛋白的百分比则呈相反趋势, 在研究期间均显著升高 ($p < 0.05$)。在冰冻血清样本中, β -球蛋白的相对浓度没有观察到显著的变化。评估未储存样品与 4°C 储存样品之间血清蛋白组分的差异, 冷藏样品中白蛋白的相对浓度无显著降低, 而 γ -球蛋白组分的百分比显著增加 ($p < 0.05$)。结果表明, 血清样品的保存温度和保存时间可能会影响血清蛋白的电泳模式。



5. Christensen EI, Birn H. Effect of storage temperature and time on the stability of serum protein biomarkers. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2011, 71 (7) : 573-579.

摘要

背景: 血清蛋白质生物标志物在临床诊断和治疗中具有广泛的应用。然而, 储存条件的变化可能会影响这些生物标志物的稳定性和准确性, 从而影响临床诊断和治疗的结果。

方法: 本研究使用免疫测定和电泳方法, 对 11 种蛋白质进行了测试, 研究了储存温度和时间对血清蛋白生物标志物稳定性的影响。将血清样品分别储存在 4°C 、 -20°C 和 -80°C 的条件下, 并在不同时间点 (0 h、24 h、48 h、72 h) 进行测试。

结果: 不同的蛋白质对储存条件的敏感程度不同。在 4°C 下储存 24 h, 大部分蛋白质的含量没有显著变化。然而, 在 -20°C 或 -80°C 的低温下长时间储存, 某些蛋白质的含量会显著下降 ($p < 0.01$), 如 RBP、A1AT 和 C3 等。此外, 长时间储存会导致蛋白质降解和聚集, 影响其稳定性。

结论: 对于血清蛋白质生物标志物的储存和分析, 应该选择合适的温度和储存时间, 并尽可能快地进行分析。在临床实践中, 我们需要注意储存条件对生物标志物测量结果的影响, 以确保准确的临床诊断和治疗。

6. Ono T, Kitaguchi K, Takehara M et al. Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. [J]. Clin Chem, 1981, 27: 35-8.

摘要

我们研究了血清与非抗凝血接触的时间和温度对 25 个分析物的影响。测定胆红素、白蛋白、硫酸锌混浊度、百里香酚混浊度、胆碱酯酶 (EC 3.1.1.8)、碱性磷酸酶 (EC 3.1.3.1)、亮氨酸氨基肽酶 (EC 3.4.11.1)、淀粉酶 (EC 3.2.1.2)、总胆固醇、甘油三酯、脂蛋白、尿素氮、肌酐、尿酸。在 4°C、24°C 和 30°C 条件下保存 48 h, 对谷氨酰转氨酶 (EC 2.3.2.2) 的影响不大。与细胞接触 24 h 的血清钾和 4°C 条件下 48 h 后的无机磷含量差异不大, 但在 4°C 条件下 8 h 有所增加, 30°C 条件下略有下降。总蛋白和总钙在 30°C 下 48 h 变化有统计学意义: 天冬氨酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.1) 和丙氨酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.2) 在 23°C 下 8~24 h, 30°C 下最快 6 h; 乳酸脱氢酶 (EC 1.1.1.27) 在 30°C 下放置 8 h, 在 23°C 下放置 8~24 h; 葡萄糖在 4°C、23°C 或 30°C 保存 24 h、4 h 或 2 h, 无机磷在 23°C 放置 48 h 或 30°C 放置 8 h; 钾在 4°C 放置 4 h 或 30°C 放置 24 h; 钠在 4°C 下 48 h 或在 23°C 或 30°C 下 6 h。

7. Boink AB, Buckley BM, Christiansen TF, Covington AK, Maas AHJ, Mullerplathe O, et al. IFCC recommendation on sampling, transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum. Clin Chim Acta 1991; 2021;202: S13-S21.

摘要

分析前血液、血浆或血清中电离钙 $[c(\text{Ca}^{2+})]$ 的物质浓度可能会受到样品的 PH 值变化、肝素对钙的结合以及抗凝血剂溶液的稀释的影响。全血的 PH 值变化可以通过厌氧取样以避免 CO_2 的损失, 尽快测量, 或将样品储存在冰水中以避免乳酸的形成来减少。血浆或血清: 如果在封闭的试管中离心, 并立即测量, 样品的 PH 值将接近原始值。如果在离心和测量之间发生了延迟, 导致 CO_2 大量流失, 建议在测量前用相当于 $p\text{CO}_2 = 5.3 \text{ kPa}$ 的混合气体对样品进行平衡。只有当 PH 值在 7.2~7.6 范围内时, 将测量值转换为 $c(\text{Ca}^{2+})$ (7.4) 才有效。肝素与 Ca^{2+} 的结合可以通过使用以下任何一种来减少:

- (1) 肝素钠或肝素锂的最终浓度为 15 IU/ml 血或更少;
- (2) 钙滴定肝素的最终浓度低于 50 IU/ml 血。在毛细血管

或注射器中使用干肝素可以避免稀释效应。当使用肝素溶液时, 通过使用含有与正常血浆中电离钙平均浓度相对应的游离钙离子的肝素溶液的注射器, 可以减少稀释或钙结合引起的误差。本文介绍了避免分析前误差的采血、储存和运输的条件。



8. Gerald S Zavorsky, Xander M R van Wijk, Samuel Gasparyan, Nicholas S Stollenwerk, Rebecca A Brooks, Stability of Whole Blood Electrolyte Specimens at Room Temperature vs. Slushed Ice Conditions, The Journal of Applied Laboratory Medicine, Volume 7, Issue 2, March 2022, Pages 541-554.

摘要

背景: 关于全血电解质稳定性的数据仅限于小样本量。我们试图确定在室温和切片条件下, 在一家主要医院中心的人类患者的全血电解质的稳定性。

方法: 对 203 例因不同病理生理状况住院的患者进行全血标本采集。在 3 h 内的 5 个不同时间点测量了钠、钾、离子钙和氯化物的电解质浓度。样品在分析前储存在室温 (22~24°C) 或冰冻条件 (0.1~0.2°C) 下。

结果: 在这两种条件下, 钠、离子钙和氯化物在 109 min 时与基线相比没有明显变化, 但在冰冻冰块中储存 138 min 后, 钾离子平均增加了 0.0032 $[0.0021$ (第 5 个百分位数) ~ 0.0047 (95 个百分位数)] mmol/L/min (调整后的 $R^2 \approx 0.62$, $p < 0.001$)。5% 的标本在冰冻保存 67 min 后, 钾离子较基线有 0.3 mmol/L 的变化。相比之下, 在室温下储存的 1% 的标本在相同的时间点显示出相同的变化。

结论: 在室温下, 全血钠、钾、离子钙和氯化物浓度保持稳定至少 109 min。然而, 在冰冻保存不超过 67 min 的全血样本显示, 与基线相比, 钾浓度增加至少 0.3 mmol/L 的可能性为 5%。其他分析物在长达 178 min 的冰冻储存时间内不会不稳定。



9. Divya P D, Jayavardhanan K K. Effect of time and temperature on the storage stability of hepatobiliary enzyme activities in cattle serum. [J]. Indian Journal of Animal Research, 2014, 48(2): 129-133.

摘要

本研究旨在选择一种理想的牛血清样品保存条件，用于测定肝胆酶，即丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）和 γ -谷氨酰转氨酶（GGT）。这项研究是在 2008 年 4 月至 10 月期间对成年健康雌性杂交牛进行的。比较了在室温（22~27℃）、4℃和 -20℃下储存的血清中酶的稳定性，并与新鲜血清样品（第 0 天）在第 1 天、2 天、5 天、8 天、11 天和 14 天的酶活性进行了比较。丙氨酸氨基转移酶在 4℃下稳定到 14 天，而在室温和 -20℃下不稳定，天冬氨酸转氨酶在 4℃和 -20℃下都稳定到 14 天，而在室温下只稳定到 2 天。与其他肝胆酶相比，碱性磷酸酶在储存过程中表现出较大的变化，建议在新鲜血清样品中进行其测定，以获得准确的结果。牛血清在 -20℃时对 GGT 活性表现出较差的稳定性，而在 4℃时，观察到的稳定期分别为 8 天和 11 天，并且在室温下该酶仅稳定一天。因此，在保存血清样品之前，建议分别考虑不同动物血清中各肝胆酶的稳定性，以获得更有效和可靠的结果。

10. Nwosu O K, Aloh G S, Ihedioha J L. Changes in alt, ast and alp values of plasma and serum samples stored at refrigerator (4℃) and room temperature (32℃) for up to five days. [J]. Bio-Research, 2009, 7(2).

摘要

本文研究了在冰箱（2~8℃，平均 4℃）和室温（30~34℃，平均 32℃）中放置 120 h（5 天）的血清和血浆样品丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）和碱性磷酸酶（ALP）值随时间的变化。血液

样本来自尼日利亚阿巴卡利基的埃博尼州立大学教学医院总共 20 名出现肝功能障碍的患者。在样本收集和分离后立即进行酶分析以获得基线值（BV），然后在 120 h 内以指定的时间间隔进行酶分析。结果表明，在不同温度下，在规定的保存时间内，血清和血浆样品的 BV 值无显著差异（ $p > 0.05$ ）：血清 ALT 为 4℃ - 48 h、32℃ - 16 h；血浆 ALT 为 4℃ - 36 h、32℃ - 10 h；血清 AST 为 4℃ - 36 h、32℃ - 10 h；血浆 AST 为 4℃ - 36 h、32℃ - 8 h；血清和血浆 ALP 为 4℃ - 30 h、32℃ - 10 h。所有的酶在冷藏的样品中比在室温下保存的样品更稳定；而且在所有的储存温度下，这些酶在血清中的稳定性比在血浆中的更稳定。结论是，一般情况下，如果在采血和分离后 30 h 内对冷藏样品进行分析，可以获得可靠的血清和血浆 ALT、AST 和 ALP 值（数值与 BV 没有显著差异），而对于室温（32℃）保存的样品，分析应在 8 h 内进行。超过这两个时间点（冷藏 30 h，室温保存 8 h），所研究的血清和血浆酶的值与 BV 有显著差异（ $p < 0.05$ ），因此诊断不可靠。



11. Kachhawa Kamal, Kachhawa Poonam, Varma Meena et al. Study of the Stability of Various Biochemical Analytes in Samples Stored at Different Predefined Storage Conditions at an Accredited Laboratory of India. [J]. J Lab Physicians, 2017, 9: 11-15.

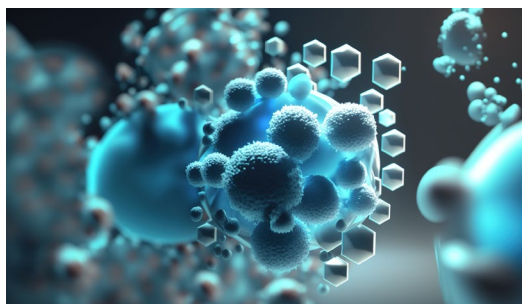
摘要

背景：由于技术问题，实验室通常需要储存血清和其他血液制品，或为后续研究保存样本。本研究的目的是确定生化分析物的稳定性是否受储存条件的影响。

材料和方法：对 10 例患者储存后的血清中 17 种生化指标进行检测。在确定基线测量后，每个患者的血清被等分，并在 -20℃ 下存储 7 天、15 天和 30 天，然后进行稳定性分析。将结果与从新鲜样品获得的初步分析测量结果进行了比较。对与基线（T0）浓度相比的平均变化进行统计学和临床评估。

结果：钠、钾、尿素、肌酐、尿酸、总钙、磷、直接胆红素、总胆红素、天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、总蛋白、白蛋白、胆固醇和甘油三酯在所有条件下都是稳定的。血清淀粉酶是唯一显示长时间储存后不稳定的分析物；淀粉酶水平在 7 天、15 天和 30 天时显著变化 ($p < 0.05$)。

结论：除淀粉酶外，大多数常见生化分析物在 -20℃ 保存 30 天后，血清中淀粉酶表现出足够的稳定性。血清淀粉酶分析应在实验室收到样品的同一天进行。



12. Kolahdoozan S, Sepanlou S G, Sharafkhah M, et al. Effect of storage temperature and time on stability of liver enzymes in blood serum. [J]. Archives of Iranian Medicine, 2020, 23 (5) : 296-301.

摘要

背景：收集和储存标本用于未来的非特定研究是越来越普遍了。然而，长期储存对血清中分析物的稳定性和质量的影响还没有得到很好的研究。我们旨在确定从储存在基线的冷冻生物样本中提取的肝酶的稳定性是否受到储存条件的影响。

方法：对 400 名患者血清中共有的四种肝酶进行了储存后的检测。在确定了基线测量值后，每个病人的血清被抽出，在 -70℃ 下储存 3 个月和 6 个月，以及在收集原始样本后储存 1 年、2 年和 5 年。从统计学和临床上计算出与基线测量值的百分比变化。还使用了线性模型来校正基于样品冷冻时间的结果。

结果：在几乎所有的样本中，肝酶的基线两年后才能被检测到，而在相当大比例的样本中，基线五年后最终也检测不到酶。对酶的对数转换水平的线性回归分析表明，在基线后一年之前，性能是可以接受的。预测模型的性能在基线后两年和五年内大幅下降，但谷氨酰胺除外。

结论：血清样本的长期储存使肝脏酶的浓度与基线相比明显下降，GGT 除外。不建议将样本储存超过两年，因为之后就无法检测到肝酶了。

13. Al Salhen K S, Saad E K, Aznine A J. The effect of storage time and different anticoagulants on fasting blood glucose concentration. [J]. Al-Mukhtar Journal of Sciences, 2018, 33 (2) : 104-111.

摘要

采用分光光度法比较了冷藏保存时间和抗凝剂氟化钠/草酸钾、EDTA、柠檬酸钠、血清对空腹血糖的稳定作用。取 75 名非糖尿病男性空腹血样，每隔 30 min 测定一次血糖水平，最长时间为 3 h。我们的结果表明，血糖随时间变化的速率因特定的抗凝剂而异。从实验结果可以看出，不同的抗凝剂，血糖随时间下降的速率不同。结果表明，冷藏环境下柠檬酸钠、EDTA、氟化钠/草酸钾和血清中的血糖在 3 h 后的平均值分别为 28.4 mg/dL、58 mg/dL、15.4 mg/dL 和 60.2 mg/dL。关于储存前的葡萄糖浓度，这表明使用草酸氟化物作为抗凝剂储存血液往往会在较长时间内更好地保持血糖水平。冰浆转运和 30 min 内快速分离血清可抑制糖酵解，而不添加任何抗凝剂（减少 1.3%）。因此，从我们的发现来看，很明显，无论标本类型、采集时间或抗凝剂类型，血糖浓度在储存过程中都保持不稳定。因此，建议应在采集标本后立即进行血糖分析，或在抗凝剂中储存后尽可能短的时间内进行，以获得可靠的结果。

14. Ahmed M O H M. Effects of Storage Temperature and Duration on Glucose Levels in Serum and Plasma. [D]. Sudan University of Science and Technology, 2018.

摘要

背景：葡萄糖是人类的主要能量来源。包括大脑在内的神经系统——完全依赖葡萄糖提供能量。血糖在糖尿病等疾病的常规分析和监测中被认为是最重要的参数之一。

目的：探讨不同保存温度和保存时间对血清和血浆血糖水平的影响。

材料和方法：本研究于 2018 年 3 月 ~ 8 月在喀土穆进行。包括 100 名健康志愿者，年龄在 18 岁 ~ 28 岁之间。将血液样本分配到普通容器中用于血清制备，并加入适量的草酸氟化物抗凝剂用于血浆制备。用全自动分

光光度化学法测定血清和血浆中的血糖，并用 SPSS 软件对数据进行统计分析。

结果：常温和 4℃下保存的血清和血浆中的血糖水平均显著降低。

结论：室温下保存的血糖在 4℃保存后，在 2 h 内和 24 h 内失去稳定性。发现血浆在室温下稳定不超过 6 h，在 4℃下储存 48 h。

15. Unalli Ozmen Sevda, Ozarda Yesim, Stability of hematological analytes during 48 hours storage at three temperatures using Cell-Dyn hematology analyzer.[J] J Med Biochem, 2021, 40: 252-260.

摘要

背景：全血细胞计数（CBC）与白细胞差异计数（DLC）是医生最常要求的测试之一。该测试的结果受储存温度和孵化时间的影响。本研究旨在评估血液标本在三种温度下储存 48h 的稳定性。

方法：从 22 名健康成年人身上采集 K₂-EDTA-血液。在 4℃、10℃或 23℃下储存 48 h 后，立即使用血液分析仪进行 CBC 检测；0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 和 48 h。

结果：红细胞、血小板、血红蛋白和平均血红蛋白在 4℃、10℃或 23℃储存 48 h 期间是稳定的。血细胞和平均血管容积增加，而白细胞在 23℃下储存 48 h 后减少。淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞在 23℃储存 12 h 后表现出明显的差异。

结论：红细胞、血小板、血红蛋白和平均血管血红蛋白是 24 h 储存期间唯一不需要冷藏的合适参数。当进行 CBC 和 DLC 时，可推荐 4℃作为 12 h 储存的最合适的储存温度。

16. Gunawardena D, Jayaweera S, Madhubhashini G, Lokumarakkala DD, Senanayake SJ. Reliability of Parameters of Complete Blood Count With Different Storage Conditions. J Clin Lab Anal. 2017;31 (2) : e22042.

摘要

背景：全血细胞计数（CBC）是当今经常进行的实验室检测。本研究评估了温度和样品储存时间对 CBC 参数的影响，这可能会产生具有临床意义的误导性结果。

方法：在一项横断面研究中，对 102 名随机选择的健康个体进行了 CBC 检查，并使用 Sysmex XS 500i 全自动血液分析仪对基线测量值进行了分析。在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $31 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度下，对样品进行 CBC 长达 48 h 的储存。以 6 h、24 h 和 48 h 的时间间隔检查值。

结果：在 CBC 参数中，白细胞、红细胞、血红蛋白、平均细胞血红蛋白（MCH）、中性粒细胞和淋巴细胞在所有三个温度下均稳定长达 48 h。单核细胞、嗜酸性粒细胞、MCH 浓度、血细胞比容（Htc）和红细胞分布宽度变异系数在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $31 \pm 2^\circ\text{C}$ 时显示出具有统计学意义的变化。在长达 48 h 的所有研究温度下都观察到血小板计数（PLT）显著下降以及平均血小板体积和嗜碱性粒细胞计数增加。

结论：本研究表明，CBC 的大多数参数不受所研究的长达 48 h 的储存温度的影响，除了 PLT 应在采集后 6 h 内进行。为避免一些参数（如 HTC）发生变化，如果预计会有任何延迟，最好将样品储存在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 。



17. Kayadibi H, Acar IA, Cam S. Stability of complete blood count parameters depends on the storage temperature, storage time, transport position and selected stability criterion. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 2020: 1-9.

摘要

目的：通过比较不同的稳定性标准，评估 Hema&Tube 品牌排空管中含有 K₂-EDTA 的样本在 4℃和室温下直立、水平和倒置运输位置长达 240 min 的 CBC 参数的稳定性。

方法：共有 450 份门诊样本，每种情况 75 份，储存 240 min。使用 Sysmex VR XT-4000i 血液分析仪在储存时间的基线、第 60 min、120 min 和 240 min 对血样进行分析。根据配对样本 t 检验、一个 CV% 的变化、CVI、BV

DES 2014、RCPA、IQMH、EFLM Biological Variation 2019、ESfEQA 和 CLIA 稳定性标准对 CBC 结果进行了比较。

结果：在所有运输条件下，根据配对样本 t 检验，几乎所有的 CBC 参数都是不稳定的。根据一个 CV% 的变化，RBC、血红蛋白、血细胞比容、RDW-CV、中性粒细胞、血小板、MPV、PDW 在某些运输条件下是不稳定的。然而，除了 MCH、MPV、PDW 和血小板外，大多数参数在所有条件下都是稳定的，而根据较低和较高的 CVI，只有 MPV 和 PDW 在 RT 所有运输条件下是不稳定的。

结论：成对样本 t 检验和一个 CV% 变化的稳定性标准并不适合决策。临床实验室应建立各 CBC 参数的储存时间、储存温度和运输位置的影响，同时根据生物变异数据稳定性标准的较低 CVI 关注抽空管的品种，因为它更关系到分析偏差对临床决策的影响，防止误诊。



18. Cadamuro J, Lippi G, von Meyer A, et al. European survey on preanalytical sample handling - Part 1: How do European laboratories monitor the preanalytical phase? On behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Biochem Med (Zagreb)*.2019;29(2):020704.

摘要

背景：目前还没有关于如何检测或记录血样中溶血、黄疸或脂血（HIL）的指南，也没有关于这些信息后续使用的指南。EFLM WG-PRE 进行了一项调查，以评估欧洲实验室目前在 HIL 监测方面的做法。这两篇文章的第二部分主要是关于 HIL。

材料和方法：在 EFLM 成员国中分发了一份在线调查，其中包含 39 个关于分析前问题的问题。17 个问题专门针对常规血样中 HIL 的评估、管理和后续行动。

结果：总体而言，收到了来自 37 个国家的 1405 份有效答复。总共有 1160 个（86%）回答者表示对血样进行分析——监测 HIL。HIL 主要在临床化学样本中检查，而在那些用于凝血、治疗性药物监测和血清学/传染病检测的样本中检查的频率较低。通过自动 HIL 指数或目视检查来检测 HIL，以及溶血截止值的定义，在答复者中差异很大。四分之一的应答者在进行自动 HIL 检查时使用了内部质量控制。在溶血/黄疸/脂肪血症样品中，大多数响应者（70%）只拒绝 HIL 敏感参数，而大约 20% 的响应者公布了所有的测试结果，并作了一般性评论。其他应答者没有分析，但拒绝了整个样品，而一些人公布了所有的测试结果，没有评论。总的来说，26% 监测 HIL 的回应者使用这一信息来监测抽血或样本运输质量。

结论：在欧洲，监测和处理溶血性、冰冻性或脂血性样本的策略是相当不一致的。欧洲共同体工作组将利用这些见解来制定和提供建议，以协调整个欧洲的战略。

19. Bergmann K, Sypniewska G. The influence of sample freezing at -8°C for 2 - 12 weeks on glycated haemoglobin (HbA_{1c}) concentration assayed by HPLC method on Bio-Rad D-10[®] auto analyzer. *Biochem Med (Zagreb)* 2016;26(3):346-52.

摘要

前言：研究的目的是评估一次冻/融循环对用市售 HPLC 方法测量的 HbA_{1c} 浓度的影响：本研究的目的是评估一次冻/融循环对用市售 HPLC 方法测量的 HbA_{1c} 浓度的影响。

材料和方法：研究包括从糖尿病患者（ $N = 60$ ）和健康志愿者（ $N = 68$ ）收集的 128 份全血样本。

HbA_{1c} 的浓度是在新鲜血液样本中测量的。然后将样品在 -80°C 下冷冻 12 周。 HbA_{1c} 在 Bio-Rad D-10[®] 分析仪上用离子交换 HPLC 方法进行检测。用 Wilcoxon 和方差分析 Kruskal-Wallis 检验来比较变量。计算了在新鲜和冷冻样品中测量的 HbA_{1c} 之间的偏差。 HbA_{1c} 浓度的可比性用 Bland-Altman 图来评估。

结果：新鲜样本的 HbA_{1c} 浓度中位数（IQR）为 45.3（36.6~61.2）mmol/mol，冷冻/解冻样本为 45.3（36.6~60.6）mmol/mol。在全组以及健康和糖尿病受试者中，比较新鲜和冷冻/解冻的样本，没有发现 HbA_{1c} 浓度的明显差异（ $p = 0.070$ ）。在全组和健康受试者中，新鲜和冷冻/解冻样品之间的计算偏差中值为 0%，而在糖尿病

患者中为 1.19%。根据基线 HbA_{1c} 值的不同, 没有发现偏差的明显差异 ($p = 0.150$)。Bland-Altman 图分析显示正偏差为 0.4% (95% CI: - 2.8 ~ 3.7%), 这表明 HbA_{1c} 值之间的符合性很高, 样品冷冻对 HbA_{1c} 测量的临床意义没有相关影响。

结论: 在 - 80°C 下储存长达 12 周, 并进行一次冻/融循环, 不会影响到在 Bio-Rad D-10[®] 分析仪上用 HPLC 方法测量的 HbA_{1c} 浓度。

20. Niazpour F, Bandarian F, Nasli-Esfahani E, Ebrahimi R, Abdollahi M, Razi F. The Effect of Blood Sample Storage Conditions on HbA_{1c} Concentration. Clin Lab. 2019 Jul 1;65(7).

摘要

背景: HbA_{1c} 浓度是糖尿病患者长期并发症发展的指标。不同的样本储存条件可能会影响 HbA_{1c} 值, 从而影响到临床医生的诊断。在本研究中, 我们研究了不同储存温度随时间推移对 HbA_{1c} 结果的影响。

方法: 总共选择了 40 份具有不同 HbA_{1c} 水平的新鲜全血样本, 在随后的几天 (0 天、7 天、14 天、和样品收集后 21 天) 使用 Cobas Integra 400 分析 (Roche Diagnostics, 德国曼海姆)。

结果: 初始测量时的 HbA_{1c} 值 (7.05 ± 1.45) 略高于 - 20°C 和 4°C 的结果, 但与 25°C 温度下的结果相比, ($6.08\% \pm 0.86\%$ 第 7 天, 第 14 天后为 $5.52\% \pm 0.80$, 第 21 天后为 $4.81\% \pm 0.66$) 初始测量值明显更高。

结论: 我们得出结论, 冷藏或冷冻储存温度适用于 Cobas Integra 400 测量 HbA_{1c}, 且不会对随后几天的样品稳定性产生不利影响。

21. Uyuklu M, Cengiz M, Ulker P, et al. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. Clin Hemorheol Microcirc. 2009;41 (4) :269-278.

摘要

血液流变学研究中使用的血液样本可能会被储存一段时间, 但储存的影响还没有被充分探讨。本研究评估了储存温度 (即 4°C 或 25°C) 和时间对健康对照组和败血症患者血液的 RBC 变形性和聚集的影响。我们的结果表

明, 对于正常的血液, 无论储存温度如何, 超过 0.3 ~ 50 Pa 的 RBC 变形性在 6 h 内是稳定的; 在 8 h 内, EI 没有明显差异, 但通过 Lineweaver-Burk 方法计算的 SS1/2 表明变形性受损。储存温度影响了 RBC 聚集的稳定期: 在 25°C 时, 安全时间较短, 而在 4°C 时, 聚集可稳定到 12 h。有趣的是, 来自败血症患者的血液样本受储存的影响较小。因此, 血液在 25°C 下可以储存 6 h 进行变形性研究, 但对于 RBC 聚集应限制在 4 h 内; 在 4°C 下储存可能会使聚集的储存时间延长到 12 h, 但不能进行变形性测量。因此, 采样和测量之间的时间间隔应尽可能短, 并与结果一起报告。



22. Hu, QL., Li, ZJ., Lin, L. et al. Effect of storage temperature and time on erythrocyte sedimentation rate. Eur J Med Res 27, 76 (2022).

摘要

目的: 用魏氏法探讨血样保存温度和时间对红细胞沉降率 (ESR) 的影响。

方法: 采集 80 例患者的全血, 用柠檬酸钠溶液 1: 9 稀释。每个样品被分成两个试管。使用魏氏检测方法, 在采集后 1 h 内测试 ESR, 一个样品放置在 4°C, 另一个放置在室温 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$)。分别于 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 测量血沉。在考虑温度和时间情况下, 对数据进行了统计分析。

结果: 在室温下, 血沉在 6 h 内逐渐降低, 但差异无统计学意义。同样, 在 4°C 条件下, 样品在 8 h 内的 ESR 下降没有显著差异, 但在室温下储存 6 h 或在 4°C 下储存 8 h 后, ESR 结果显著下降, 在 4°C 下储存的样品在相同时间内的 ESR 减少率低于室温储存的样品。

结论: 血样保存温度和保存时间对魏氏法测定血沉有影响。在临床工作中, 血沉检测应在标本采集后 4 h 内完成。



23. Ilardo Claudio, Richerd Christiane, Rostain Vanessa, Impact of preanalytical storage on the measurement of erythrocyte sedimentation rate using an infrared microphotometer system (TEST1). [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2020, 80: 523-524.

摘要

本研究考察了温度和时间对 TEST1 系统上测量的红细胞沉降率 (ESR) 分析前稳定性的影响。第一个实验包括在室温下储存的 102 个样本，第二个实验包括 112 名受试者，并调查了冷藏 (2 ~ 8°C) 储存。我们的研究显示，在室温 (15 ~ 25°C) 下，ESR 的结果稳定到 8 h ($p = 0.512$)。在 2 ~ 8°C 下储存 24h 的样品是稳定的 ($p = 0.280$)。

24. Ib A, Pep B, Ja A, et al. Transportation and handling of blood samples prior to ammonia measurement in the real life of a large university hospital – ScienceDirect. [J]. Clinica Chimica Acta, 2020, 510:522-530.

摘要

背景：高氨血症具有神经毒性，因此可能是医疗急症。分析前因素极大地影响血氨浓度结果。

目的和方法：将气力输送血样后和离心前不同时间段在大型医院的真实环境中测得的氨浓度与根据试剂制造商的指示测得的氨浓度进行比较。在相同的常规环境中，确定了离心样品等待时间或血浆在 - 20°C 和 - 80°C 下储存后的影响。

结果：尽管采用气动传输，但样本到达实验室的前置时间甚至比推荐的在氨测定之前的完整处理时间还要长。氨浓度结果不受血液样本的气动传输和离心前最长 1.75 h 和离心后 1 h 的等待时间的影响。当血浆储存在 - 80 °C 时，氨稳定性更好。

结论：如果等待时间限制在离心前 1.75 h 和离心后 1 h，并且样品保持低温，我们实验室常规实践中的气动传输和样品处理不会影响氨浓度结果。否则，最好将血浆冷冻在 - 80°C。

25. Dukic L, Simundic AM. Short-term and long-term storage stability of heparin plasma ammonia. J Clin Pathol. 2015;68 (4) :288-291.

摘要

目的：氨是一种极不稳定的分析物，在采样、运输和储存过程中需要特别注意。本研究的目的是评估肝素锂血浆中氨在短期 (4°C) 和长期 (- 20°C) 储存期间的稳定性。

方法：使用 20 份血浆样本进行短期稳定性评估。每个样品被分成五个等分试样，并在 4°C 下储存在带塞管中，从初始测试开始分别保存 1 h、2 h、3 h、4 h 和 24 h。十五个血浆样品用于长期稳定性评估。每个样品被分成八份，并在 - 20°C 下储存在带塞管中 3 h、24 h、48 h 以及从初始测试开始的 1 周、2 周、4 周、8 周和 12 周。氨浓度在 Beckman Coulter AU2700 化学分析仪上使用 Randox 氨酶促 UV 法测定。根据每个时间点的初始值计算偏差，并与澳大利亚皇家病理学家学院定义的质量规格进行比较。

结果：样品在 4°C 下储存 1 h，在 - 20°C 下储存 3 h 后，平均偏差超过了总允许误差。

结论：氨在 4°C 和 - 20°C 下储存在肝素锂血浆中并不稳定，因此应立即进行分析。



26. J.L. Gifford, W.N.T. Nguyen, L. de Koning, I. Seiden-Long, Stabilizing specimens for routine ammonia testing in the clinical laboratory, *Clin. Chim. Acta.* 478 (2018) 37–43.

摘要

背景：体外脱氨作用会在新采集的血液样本中产生氨。为防止这种情况，通常将用于氨测试的样品收集在冰上并快速运行（例如，在 1 h 内）。我们开发了一种稳定氨分析标本的方法。

方法：血浆分离后，将 500 $\mu\text{mol/L}$ 环丝氨酸或 2 mmol/L 硼酸钠与 5 mmol/L L-丝氨酸的组合加入到具有正常或增加浓度的 ALT 或 GGT 的样品池中以抑制脱氨作用；和/或残留的血小板通过离心去除。然后将样品池在室温或 4°C 下孵育。未经处理的样品池也在 -80°C 下孵育。在 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、16 h 和 24 h 测量氨。

结果：当在 4°C 下孵育而不处理时，酶在其参考限值内的样品池增加了 0.5 $\mu\text{mol/L/h}$ ，而 ALT 或 GGT 活性高于其参考上限的样品池增加了 3.6 $\mu\text{mol/L/h}$ ($p < 0.001$)。当样品池在 4°C 下与硼酸钠/L-丝氨酸一起孵育时，具有正常 (0.3 $\mu\text{mol/L/h}$ ，与未处理对照相比 $p < 0.001$) 或高酶活性的样品中氨增加的速率显著降低 (0.1 $\mu\text{mol/L/h}$ ， $p < 0.001$ 对比未处理的对照)。独立于 ALT 和/或 GGT 浓度，将样本储存在 -80°C 也保存了用于氨分析的样本 (0.2 $\mu\text{mol/L/h}$ ， $p < 0.001$ 与未处理的对照相比)。

结论：通过将硼酸钠/L-丝氨酸与冷藏相结合，血浆氨标本至少可以稳定 12 h。

27. Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep.* 2014 Jan 27; 4:3868.

摘要

凝血试验和因子测量已被广泛应用于临床实践中。这里，我们旨在确定储存时间和温度对新鲜血浆中活化部分凝血活酶时间 (APTT)、纤维蛋白原 (Fbg)、凝血酶原时间 (PT)、国际正常化比率 (INR)、凝血酶时间 (TT)、第八因子活性 (FVIII:C) 和第九因子活性 (FIX:C) 的影响。在两个中心的 25°C (室温) 和 4°C

(冷藏) 储存 0 h (基线)、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 24 h 后，对 72 份血样进行了测试。用大于 10% 的平均百分比变化和大于 10% 的百分比变化超过 25% 的样本数来确定临床相关的差异。我们证明，空腹血糖、PT/INR 和 TT 的样本可以安全地保存在 ≤ 24 h；FVIII:C 在 ≤ 2 h；FIX:C 在 4°C 和 25°C 下都可以保存 ≤ 4 h；APTT 在 4°C 和 25°C 下分别保存 ≤ 12 h 和 ≤ 8 h。

28. Toulon P, Metge S, Hangard M et al. Impact of different storage times at room temperature of unspun citrated blood samples on routine coagulation tests results. Results of a bicenter study and review of the literature. *[J]. Int J Lab Hematol*, 2017, 39: 458-468.

摘要

介绍：大多数指南都建议在采血和凝血测试之间最长延迟 4 h。由于有关最佳储存时间的信息有限，我们研究了不同的未纺管储存时间 (即 ≤ 2 h、4 h、6 h 和 8 h) 对常规凝血测试结果的潜在影响。

方法：从 144 名患者中抽取了含有 0.109 mol/L 柠檬酸三钠的四支排空聚合物管，包括 39 名服用维生素 K 拮抗剂的患者。除储存时间外，所有试管都经历了相同的分析前过程。两个中心使用相同的技术条件对凝血酶时间 (PT) / 国际标准化比率 (INR)、活化部分凝血活酶时间 (APTT)、纤维蛋白原、因子 V (FV)、FVIII 和 D-二聚体进行了评估。

结果：延长储存时间后评估的 APTT、纤维蛋白原、FV 和 FVIII 结果与小于 2 h 储存的分析比较显示出显著的差异，而 PT/INR 和 D-二聚体在 8 h 内保持不变。除了储存 6 h 和 8 h 后评估的 FVIII 外，所有研究参数在延长储存时间后获得的测试结果之间的平均偏差仍低于理想值，但只有在 FVIII 超过 100 IU/dL 的患者中。尽管相应的偏差分别为 -5.2% 和 -8.5%，仍在 GEHT 推荐的变异范围内，但其在 8 h 储存后的评估可能导致 FVIII 的显著低估。

结论：这些结果表明，在所研究的技术条件下，PT/INR、APTT、纤维蛋白原、FV 和 D-二聚体可以在采血后在室温下储存 8 h 内可靠地评估。FVIII 的最佳延迟时间应该是 6 h。



——
采血一小步，检验一大步



阳普医疗IMPROVACUTER®真空采血管系列

一如既往的卓越.
ALWAYS EXCELLENCE.



分析前样品处理因素对阿尔茨海默病血浆生物标志物的影响

摘要

在临床实验室环境中，存在对淀粉样蛋白病理的可靠血浆生物标志物的未得到满足的需求，以简化阿尔茨海默病（AD）的诊断。对于常规的临床使用，生物标志物必须在分析前样品处理条件下提供稳健和可靠的结果。我们调查了不同的分析前样本处理程序对 7 个正在开发中的血浆生物标志物水平的影响，这些标志物可能是 AD 的常规使用。使用（1）新鲜（从未冷冻）和（2）预先冷冻的血浆，我们评估了（A）保存时间和温度、（B）冷冻/解冻（F/T）循环、（C）抗凝剂、（D）管转移和（E）塑料管类型的影响。血液样本是从在记忆诊所接受调查的认知障碍患者中前瞻性采集的。用 ELECTYS® 血浆原型免疫分析法检测 β -淀粉样蛋白 1-40（A- β 40）、 β -淀粉样蛋白 1-42（A- β 42）、载脂蛋白 E4、胶质纤维酸性蛋白、神经细丝轻链、磷酸化 tau181 和磷酸化 tau217。计算了每个血浆生物标志物和样品处理参数的恢复信号。对于所有测量的血浆生物标志物，新鲜（从未冷冻）和以前冷冻的样品的分析前效果是相似的。当以全血和乙二胺四乙酸血浆保存时，所测试的所有血浆生物标志物在 4°C 下 ≤ 24 h 内都是稳定的。回收信号可用于最多五个管传输，或两个 F/T 循环，以及在聚丙烯和低密度聚乙烯管中都可以接受。对于除 A- β 42 和 A- β 40 之外的所有血浆生物标志物，EDTA、肝素锂和柠檬酸钠试管之间的分析物水平基本相似。A- β 42 和 A- β 40 对分析前处理最敏感，A- β 42/A- β 40 的比值只能部分补偿这种影响。我们为淀粉样蛋白 AD 的血浆生物标志物分析的最佳样品处理方案提供了建议，以提高未来血浆生物标志物分析的重复性和在常规临床实践中的潜在应用。

1. 前言

阿尔茨海默病（AD）是老年人最常见的痴呆症形式。最近的预测预测，到 2050 年，全球将有超过 1.52 亿人患有痴呆症，其中高达 70% 的病例归因于 AD（Nichols et al, 2022；世界卫生组织，2022 年）。AD 通常以大脑中的 β -淀粉样蛋白（A β ）沉积（淀粉样蛋白病理）和 tau 病理为特征（DeTure & Dickson, 2019）。

直到最近，还没有可用的疾病改善疗法（DMTs）可以减轻与 AD 相关的认知和功能下降，并改善患者的生活质量（Rasmussen & Langerman, 2019）。然而，在 2021 年 6 月，美国食品和药物管理局加速批准了 aducanumab，一种 A β 定向单克隆抗体，用于治疗轻度症状性 AD 患者（Esang & Gupta, 2021），并在 2022 年 9 月，宣布了 lecanemab 用于治疗由 AD

引起的轻度认知障碍和脑中确认存在淀粉样蛋白病理的轻度 AD 的三期临床试验结果（Eisai, 2022）。这种新型的 dmt 可能在 AD 的早期阶段最有效；因此，需要常规临床使用与脑淀粉样蛋白和 tau 病理相关的血浆生物标志物，以早期识别需要进一步评估和开始 DMTs 的患者（Rasmussen & Langerman, 2019；Rózga 等, 2019）。考虑到痴呆症有许多潜在的原因，共同病理在 AD 患者中很常见，因此能够将临床综合征与潜在的病理过程区分开来，以得出 AD 的诊断也很重要（Rabinovici 等人, 2017，斯塔瓦罗尼等人, 2017）。

经验证的脑脊液（CSF）生物标志物 [包括 A β ，总 tau 和磷酸化 tau（磷酸化 - tau）] 和正电子发射断层扫描（PET）生物标志物检测通常用于 AD 的诊断；然而，这些手术费用昂贵，具有侵入性，并且在初级保健环境中可用性有限（Blennow 等人, 2015；格里默等人, 2009；Janelidze 等人, 2020）。目前

尚不满足对可靠的淀粉样蛋白病理和 AD 的血浆生物标志物的需求, 这些标志物可获得、微创且易于使用, 以帮助确定哪些患者将受益于 CSF 和 PET 的确诊性诊断评估, 并排除淀粉样蛋白病理和 AD 的低可能性患者 (Rózga 等人, 2019)。

与腰椎穿刺和 PET 成像收集脑脊液相比, 通过抽血收集血浆的风险更低, 侵入性更小, 成本更低。此外, 在脑脊液和血浆中发现的几种生物标志物之间观察到很强的相关性 (Barthélemy 等人, 2020; Blennow 等人, 2015; Karikari 等人, 2020; Khoury & Ghossoub, 2019 年; Ovod 等人, 2017; Tatebe 等人, 2017; Zetterberg, 2019)。特别是, 血浆 β -淀粉样蛋白 1-42/ β -淀粉样蛋白 1-40 (A- β 42/A- β 40) 和脑脊液磷酸 - tau/A- β 42 比值反映了大脑中的淀粉样蛋白病理, 与 PET 相比, 诊断准确率约为 90%, 取决于所使用的分析平台 (Doecke 等人, 2020; 汉森等人, 2018; ; Nakamura 等人, 2018; Ovod 等人, 2017; Zetterberg, 2019)。

在分析之前, 用于处理血浆和脑脊液样本的程序在不同机构之间存在差异, 这些程序的差异可能导致以往脑脊液生物标志物研究中观察到的实验室间和批次间的显著差异 (Hansson et al, 2021; 斯奈德等人, 2014; 瓦特等人, 2012)。最近的研究评估了常见的分析前参数对淀粉样蛋白病理和 AD 的血浆生物标志物测量的影响, 并提供了标准化样本处理程序和提高这些生物标志物分析可靠性的建议 (Rózga 等人, 2019; Verberk 等人, 2021)。为了在常规实验室实践和临床试验中对淀粉样蛋白病理和 AD 的血浆生物标志物进行可靠分析, 需要对新鲜 (从未冷冻) 样本中广泛的血浆生物标志物进行适当的分析前样本处理程序的进一步研究, 使用全自动平台。

这项探索性研究旨在评估新鲜 (从未冷冻) 和先前冷冻血浆的存储时间和温度的影响; 这些评估是使用从应激全血 (WB) 分离的血浆, 以及从 WB 分离后的应激血浆进行的。此外, 研究了冷冻/解冻 (F/T) 循环在新鲜 (从未冷冻) 血浆中的影响, 抗凝剂和导管转移在先前冷冻血浆中的影响, 以及塑料管类型在新鲜 (从未冷冻) 和先前冷冻血浆中的影响 (表 1; 图 S1)。

2. 方法

2.1 研究设计

这项前瞻性、非介入性研究于 2020 年 12 月至 2021 年 10 月在德国进行 (样本收集于德国慕尼黑 LMU 慕尼黑大学医院; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)。这项研究是根据赫尔辛基宣言和国际协调理事会良好临床实践指南的

原则进行的。所有参与者都提供了书面知情同意, 参与 PsyCourse 生物样本库项目, 包括样本的收集、存储、分析、科学利用和分发。血液样本匿名, 没有临床数据共享。心理课程由慕尼黑大学精神病学和心理治疗系进行, 并获得了慕尼黑大学伦理委员会的批准 (项目编号 18 - 716)。

血浆 A- β 40、A- β 42、载脂蛋白 E4、胶质纤维酸性蛋白、神经细丝轻链、磷酸化 tau-181 和磷酸化 tau-217 的血浆水平在 Cobas®e601 分析仪 (All Roche Diagnostics International Ltd.) 上用全自动 ELEXSYS®血浆原型免疫分析仪检测。Electrsys A- β 40、A- β 42、载脂蛋白 E4、GFAP、NFL、磷酸-tau-181 和磷酸-tau-217 血浆原型免疫分析用于调查/研究目的, 目前未被批准用于临床或商业用途。根据来自欧洲药品管理局的生物分析方法验证指南 EMEA/CHMP/EWP/192217/2009Rev.1 Corr.2 改编的内部程序对原型免疫分析进行验证。批内、批间和仪器间精密度的变异系数汇总于表 S1。根据在每个分析评估过程中获得的 A- β 40 和 A- β 42 测量结果计算 A- β 42/A- β 40 比率。

2.2 参与者和样本收集/处理

符合条件的参与者是根据国家老龄 - 阿尔茨海默氏症协会标准 (McKhann 等, 2011) 可能或可能的 AD 导致的认知障碍患者, 在慕尼黑 LMU 大学医院进行常规临床访问。接受血浆生物标志物测量样本的实验室地点没有进一步的患者信息。因此, 在这项研究中, 没有进行随机分配个体, 没有必要进行盲法, 也没有采用预先确定的样本量计算。我们没有为这项分析进行功率计算, 因为结果是基于信号恢复率与参考样本的比较, 并且没有产生 p 值。尽管样本量很小, 但对患者的影响是一致的, 这让我们相信所看到的变化是强大的影响。没有样品被排除在分析之外。

除第 2.3 节另有规定外, 所有样本均在三次独立献血活动中采集, 并按前述方式处理 (Rózga 等人, 2019 年)。按标准操作程序进行静脉穿刺术, 保证血液畅通, 轻度抽吸, 避免溶血。WB 样品收集在三钾 (K_3) 乙二胺四乙酸 (EDTA) S-Monovette 试管 (Sarstedt Inc.)。在样品采集后立即将试管倒置五次, 以确保 WB 与试管中存在的抗凝剂充分混合。为了达到正确的 WB 与抗凝血剂的比例, 根据制造商的说明, 每种管型都被填充到标称体积。除非另有说明, WB 样本在室温 (RT) 下储存在收集管中, 并在收集后 1 h 内在 $2000 \times g$ 的 RT 下在摇桶离心机中离心 10 min。然后, 分离的血浆在离心后 1 h 内转移到聚丙烯 (PP) 管中, 多次倒置以确保样品充分混合, 并立即将其等分到 PP 管中。表 2 提供了所用管子的更多细节。

表 1. 本研究中评估的分析前样品处理参数和测定方法及其结果的总结

Assay	Sample handling parameter										Anticoagulant				Tube type		
	Storage time and temperature																
	RT				4°C				Number of F/T cycles (-20°C or -80°C)	EDTA plasma (reference)	LiHep	NaCit	Number of tube transfers	PP (reference)	PE-LD		
	WB (h)		EDTA plasma (h)		WB (h)		EDTA plasma (h)										
FNF	PF	FNF	PF	FNF	PF	FNF	PF	FNF	PF								
Aβ40	2	6	2	2	24	24	24	24	2	✓	X	✓	5	✓	✓		
Aβ42	2	2	2	2	24	24	24	24	2	✓	X	✓	5	✓	✓		
Aβ42/ Aβ40	2	6	6	2	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓		
Apolipoprotein E4	-	-	6	2	-	-	24	24	4	✓	-	-	5	✓	✓		
GFAP	24	24	24	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓		
NFL	24	24	24	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓		
phospho-tau-181	24	-	24	-	24	-	24	-	4	✓	-	-	-	✓	✓		
phospho-tau-217	24	24	6	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓		

注：小时表示血浆生物标志物水平在预先定义在接受标准内的时间。勾号 (✓) 表示血浆生物标志物水平在预先规定的接受标准内的参数；交叉 (X) 表示血浆生物标志物水平不符合预先规定的接受标准的参数。横线 (-) 表示没有收集数据的参数。

缩略语：A- β 40, β -淀粉样蛋白 (1-40)；A- β 42, β -淀粉样蛋白 (1-42)；EDTA, 乙二胺四乙酸；FNF, 新鲜 (从未冷冻)；F/T, 冷冻/解冻；GFAP, 胶质纤维酸性蛋白；h, 小时；LiHep, 肝素锂；NaCit, 柠檬酸钠；NFL, 神经丝轻链；PE-LD, 低密度聚乙烯；phospho-tau-181, 磷酸化 tau-181；phospho-tau-217, 磷酸化 tau-217；PF, 先前冷冻；PP, 聚丙烯；RT, 室温；WB, 全血。

2.3 分析前样品处理参数评估

评估了以下分析前样品处理参数对血浆生物标志物水平的影响：

- (A) 储存时间和温度
- (B) F/T 循环
- (C) 抗凝剂类型
- (D) 管转移
- (E) 塑料管类型。

2.3.1 储存时间和温度评估

为了评估储存时间和温度对血浆分离前 WB 稳定性的影响，在离心和血浆采集之前，将一组 WB 样品保持在 4°C 以下不到 6 h。由于后勤条件的原因，这种长达 6 h 的延误是不可避免的。在本实验时，已经收集了关于分析物在 4°C 下的稳定性的足够信息，并认为在 4°C 下储存 6 h 内是可以接受的。

因此，新鲜的 (从未冷冻的) 基线血浆样品在制备前在 4°C 下保存 6 h，之前冻结的基线血浆样品在制备前在 RT 下保存 30 min，在分析之前在 -20°C 下冷冻。血浆样本用 A- β 40、A- β 42、载脂蛋白 E4、胶质纤维酸性蛋白、NFL、磷酸-tau-181 和磷酸-tau-217 血浆原型免疫分析法进行评估，以确定每个被测生物标志物的基线测量值。

额外的 WB 样本集在离心和血浆分离之前，通过将它们保

持在 RT 或 4°C 额外的 2 h、6 h 或 24 h 来进行“压力”。这些“压力”程序旨在模拟实验室的情况，在这种情况下，样品在处理之前或之后可能无人看管，从而导致处理延迟。然后立即测量样品 (以下称为“来自压力 WB 的新鲜 (从未冻结的) 血浆”) 或在分析前在 -20°C 下冷冻的样品 (以下称为“来自压力 WB 的先前冻结的血浆”)。

为了评估储存时间和温度对血浆稳定性的影响，对 WB 样品进行如上所述的处理。然后将分离的血浆混合并分成等份。立即检测或冷冻液化血浆样本以建立基线测量，或通过将其保持在 RT 或 4°C 额外的 2 h、6 h 或 24 h 来进行“应激”，然后在延迟后立即进行分析 [“新鲜 (从未冻结) 的压力血浆”样本] 或在 -20°C 下冷冻并在解冻后立即进行分析 (“先前冻结的应激血浆”样本)。

对于之前冻结的血浆样本，研究了三种可能的处理方案，即在血浆分离后的不同时间进行“应力”模拟。在这些情况下，(1) 在冷冻前将血浆转移到测量管中并施加压力；(2) 在原始血液采集管中施加压力然后转移到测量管中进行冷冻；(3) 在解冻后转移到测量管中进行冻结和压力。注意，没有在以前冻结的样品中测量到的磷酸-tau-181 的数据。

2.3.2 F/T 周期评估

进行 F/T 循环分析的样品在离心前在 4°C 保存 6 h。为评价 F/T 循环对血浆生物标志物水平的影响，分别在新鲜 (从未冷冻) 或 F/T 循环 1 次、2 次、3 次或 4 次后立即测定血浆中各生物标志物的基线水平。在每个 F/T 循环中，样品在 RT 解冻

前在 -20°C 或 -80°C 下冷冻 8 h。

2.3.3 抗凝剂评估

除了 K3 EDTA 管外，还在 S-Monovette 肝素锂 (LiHep) 和 S-Monovette 柠檬酸钠 (NaCit) 管 (均为 Sarstedt 公司) 中收集 WB，以评估抗凝剂对血浆生物标志物水平的影响。采集后，WB 样品按照 2.2 节所述进行处理，并在 -20°C 下冷冻。解冻后，按上述方法评估血浆生物标志物水平。注意，目前还没有抗凝血剂样品中磷-tau-181 的测量数据。

2.3.4 管子转移评估

为了确定试管转移对血浆生物标志物稳定性的影响，先前冷冻的血浆样品 [按 2.2 节所述处理；0 号试管 (基线水平)，PP 试管] 在 RT 下解冻，然后转移到下一个 PP 试管 (1 号试管)。这个过程完成了一次、三次和五次。每次转移都使用一个新的移液器吸头。然后测定 0 管、1 管、3 管和 5 管中每个血浆样本的血浆生物标志物水平。

2.3.5 塑料管类型评估

为了评估塑料管类型对血浆生物标志物水平的影响，收集 WB 样本，然后按照第 2.2 节所述进行处理，或者在离心之前将 WB 在 4°C 下延长储存时间小于 6 h。分离的血浆被转移到 PP 或低密度聚乙烯 (PE-LD) 测量管中 (分别为 Sarstedt 公司和罗氏诊断国际有限公司)，并在转移后立即进行检测 [“新鲜 (从未冷冻)”] 或在测量前冷冻 (“先前冷冻”) 。

2.4 数据分析

本分析中包括的大多数血浆生物标志物都是一次性测定的。在有重复测量的情况下，计算了平均值。对于所有测试的样品处理参数，报告了与参考样品相比，A-β40、A-β42、脂蛋白 E4、GFAP、NFL、磷脂酰 tau-181 和磷脂酰 tau-217 的恢复信号。对于每个参与者和样本，以及所有测量的血浆生物标志物，接受标准是与参考样本相比信号恢复率的 $\pm 10\%$ 。根据分析物浓度计算 A-β40/A-β42 比率，并报告与参考样本相比的比率的恢复信号。表 S3 中提供了用于比较所测试的每个样品处理参数的信号恢复的参考值摘要。检测血浆脂蛋白 E4 是为了确定携带者 APOE ε4 状态；但是，它不能确定同质性与异质性。对于脂蛋白 E4 的分析，分析结果被分为脂蛋白 E4 阳性 (即至少存在一个 APOE ε4 等位基因) 和阴性 (即没有 APOE ε4 等位基因)。使用 JMP 15.2.0 版 (SAS Institute Inc.) 生成分析物水平的箱形图。由于样本量小，对数据的正态性评估被省略了。此外，由于假定数据分布不正常，分析中没有包括对异常值的参数检验。

3. 结果

在三次独立的献血活动中，共收集了 N=16 名患者的 WB 样本。表 1 提供了本研究中的分析和获得的结果的概述。

3.1 储存时间和温度对 WB 和血浆的影响

所有被测试的血浆生物标志物在以 WB 和 EDTA 血浆形式储存时，在 4°C 下最多可稳定 24 h (图 1)。A-β42、A-β40 和 A-β42/A-β40 比率如果以 WB 和 EDTA 血浆在 RT 下储存超过 2 h 则不稳定。Phospho-tau-181、GFAP 和 NFL 在 WB 和 EDTA 血浆中在 RT 下最多稳定 24 h；Phospho-tau-217 在 WB 中在 RT 下最多稳定 24 h，在血浆中稳定 6 h。对于所有测量的血浆生物标志物和分析前效应，新鲜 (从未冷冻) 和先前冷冻的血浆样本之间的中位恢复信号没有明显的差异。此外，对先前冷冻的血浆采用的三种处理方案之间没有明显的差异 (图 S2)。

3.2 F/T 循环对新鲜 (未冷冻) 血浆的影响

除 A-β42 和 A-β40 外，所有血浆生物标志物的恢复信号在最多四个 F/T 周期内都是可接受的 (图 2a)。对于 A-β42 和 A-β40，最多两个 F/T 周期是可以接受的，而 A-β42/A-β40 比率对于最多四个 F/T 周期是可以接受的。所有测定的血浆生物标志物的恢复信号在冰冻在 -20°C 的样品和冰冻在 -80°C 的样品之间具有可比性。

3.3 抗凝剂类型的影响

除 A-β42 和 A-β40 外，所有血浆生物标志物的分析物水平在 EDTA、LiHep 和 NaCit 管之间基本相当 (EDTA 被用作参考；图 3a)。将 LiHep 管与 EDTA 管相比，LiHep 管的 A-β42 和 A-β40 的中位回收信号分别增加了 10% 和 9%。与 EDTA 管相比，使用 NaCit 管时，A-β42 和 A-β40 的中位恢复信号分别下降了 6% 和 4%。此外，与 EDTA 和 LiHep 管相比，使用 NaCit 管，GFAP 和 NFL 有下降趋势。没有来自脂蛋白 E4 阳性供体的样本可用于该分析。

3.4 管子转移的影响

在先前冷冻的 EDTA 血浆中，所有被评估的血浆生物标志物在五次试管转移中都很稳定 (图 3b)。A-β42 和 A-β40 的中位恢复信号在一次、三次和五次试管转移之间逐渐减少；然而，这种减少是在预定的接受标准之内，即中位恢复信号的 $\pm 10\%$ 。

3.5 塑料管类型的影响

在新鲜（从未冷冻）血浆中测量的任何血浆生物标志物，在 PP 管和 PE-LD 管之间没有观察到明显的恢复信号变化（图

2b）。新鲜（从未冷冻）和先前冷冻的血浆样本之间，所有测量的血浆生物标志物的中位恢复信号是可比的（图 2b；图 S3）。

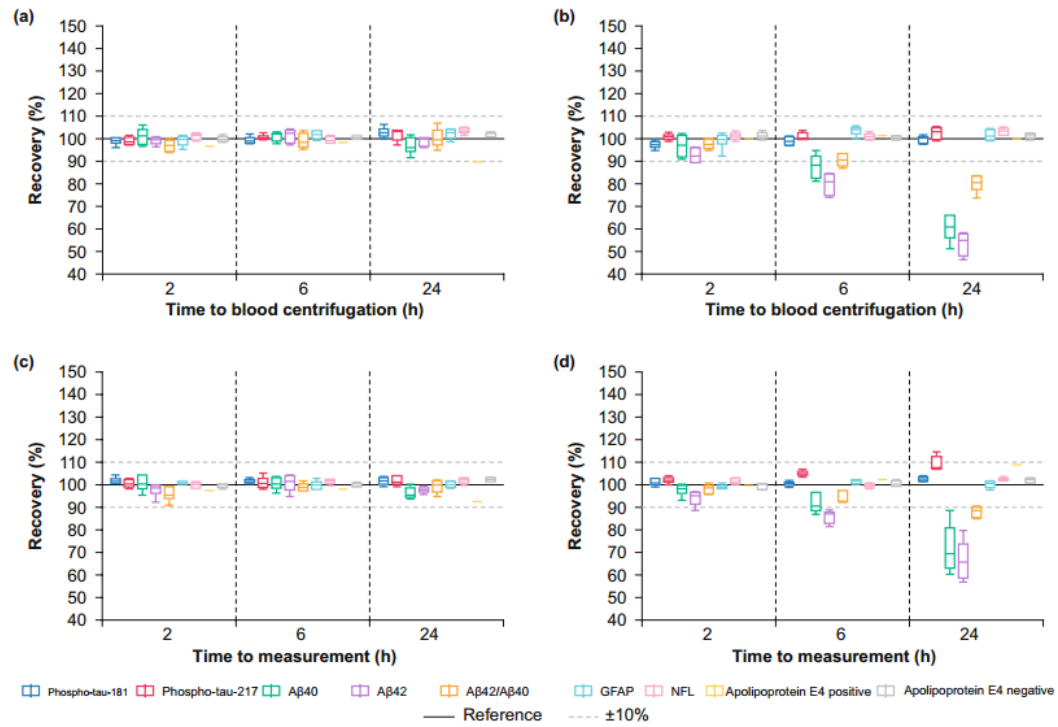


图 1. 储存时间和温度对 (A) 4°C 和 (B) RT 储存的 WB 以及 (C) 4°C 和 (D) RT 储存的血浆 [在新鲜（从未冷冻的）血浆中测量] 中血浆生物标志物水平的影响。除载脂蛋白 E4 阳性和阴性外，所有血浆标志物 $n = 6$ ，其中 $n = 1$ 和 $n = 5$ 。显示的框图包括来自 $n = x$ 个的个人捐赠者数据和每个捐赠者的一个数据点。方框表示中位数和四分位数范围；胡须越低，表示最小值和第 25 个百分位数 (Q1) 到 $1.5 \times \text{IQR}$ 中的较高者；胡须越高，表示最大值和第 75 个百分位数 (Q3) 到 $1.5 \times \text{IQR}$ 中的较低者。A- β 40， β -淀粉样蛋白 1-40；A- β 42， β -淀粉样蛋白 1-42；GFAP，胶质纤维酸性蛋白；iqr，四分位数范围；nfl，神经丝轻链；磷酸-tau-181，磷酸化-tau-181；磷酸-tau-217，磷酸化-tau-217；q，四分位数；RT，室温；WB，全血。

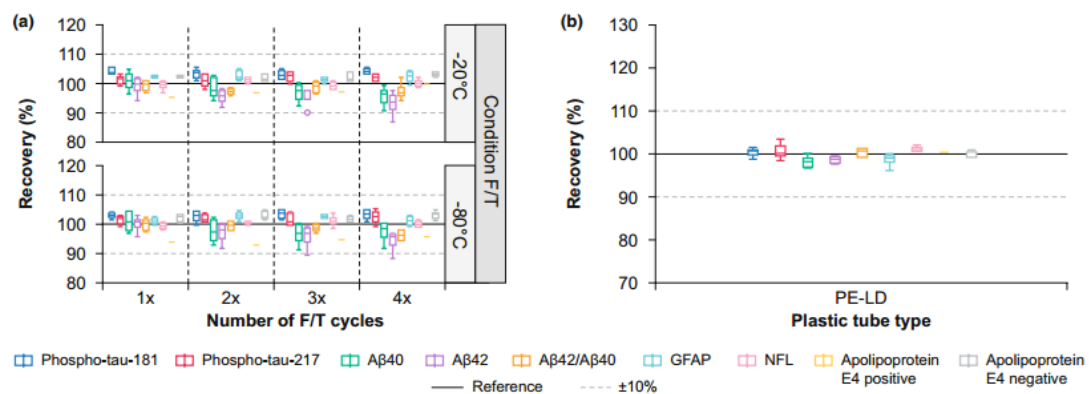


图 2. (A) F/T 循环和 (B) 塑料管类型对新鲜（从未冷冻）血浆中血浆生物标志物水平的影响。除载脂蛋白 E4 阳性和阴性外，所有血浆标志物 $n = 6$ ，其中 $n = 1$ 和 $n = 5$ 。显示的框图包括来自 $n = x$ 个个人捐赠者的数据和每个捐赠者的一个数据点。对于 B 板，使用 PP 管作为参照物。方框表示中位数和四分位数范围；胡须越低，表示最小值和第 25 个百分位数 (Q1) 到 $1.5 \times \text{IQR}$ 中的较高者；胡须越高，表示最大值和第 75 个百分位数 (Q3) 到 $1.5 \times \text{IQR}$ 中的较低者。A- β 40， β -淀粉样蛋白 1-40；A- β 42， β -淀粉样蛋白 1-42；F/T，冷冻/解冻；GFAP，胶质纤维酸性蛋白；IQR，四分位范围；nfl，神经丝轻链；磷酸化-tau-181，磷酸化-tau-181；磷酸化-tau-217，磷酸化-tau-217；q，四分位。

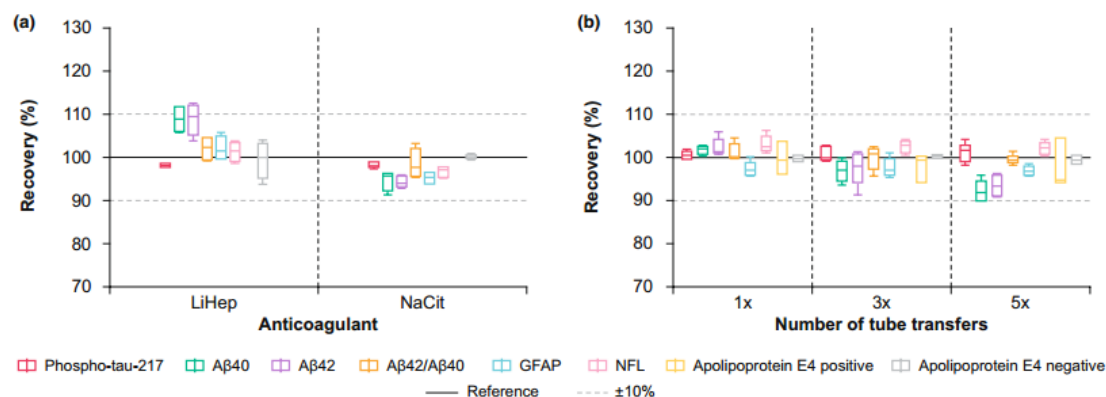


图 3. (a) 抗凝剂和 (b) 试管转移对先前冷冻血浆中血浆生物标志物水平的影响。对于 A 组，所有测量的血浆生物标志物 $n = 4$ ，除了脂蛋白 E4 阳性和阴性， $n = 0$ 和 $n = 4$ ，分别。对于 B 组，所有测量的血浆生物标志物 $n = 5$ ，除了脂蛋白 E4 阳性和阴性，其中 $n = 3$ 和 $n = 2$ ，分别。箱形图包括来自 $n = x$ 个捐赠者的数据，每个捐赠者一个数据点。框内代表中位数和四分位数范围；下须代表最小值和第 25 百分位数 (Q1) 至 $1.5 \times \text{IQR}$ 的较高值；上须代表最大值和第 75 百分位数 (Q3) 至 $1.5 \times \text{IQR}$ 的较低值。A- $\beta 40$ ， β -淀粉样蛋白 1-40；A- $\beta 42$ ， β -淀粉样蛋白 1-42；GFAP，胶质纤维酸性蛋白；IQR，四分位数范围；LiHep，肝素锂；NaCit，柠檬酸钠；NFL，神经丝轻链；phospho-tau-217，磷酸化-tau-217；Q，四分之一。

4. 讨论

本研究评估了储存时间和温度对新鲜（从未冷冻）和预先冷冻的血浆中 A- $\beta 40$ 、A- $\beta 42$ 、A- $\beta 42/\text{A-}\beta 40$ 比率、脂蛋白 E4、GFAP、NFL、磷酸-tau-181 和磷酸-tau-217，以及从应激 WB 分离的血浆与分离后应激的血浆相比，保存时间和温度的影响。此外，还研究了新鲜（从未冷冻）血浆中 F/T 循环的影响，预先冷冻血浆中抗凝剂和管子转移的影响，以及塑料管类型在新鲜（从未冷冻）和预先冷冻血浆中的影响。

所有被测试的血浆生物标志物在 4°C 时在 WB 和 EDTA 血浆中的稳定性可达 24 h。这意味着 WB 可以直接储存在冰箱的采血管中，不需要立即处理。此外，EDTA 血浆可以在离心后储存在原来的采血管中，温度为 4°C （模拟样本被错误地留在离心机中的情况）。除 A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 外，所有血浆生物标志物的测量水平在四个 F/T 周期内都是可以接受的；对于 A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 来说，最多可以达到两个 F/T 周期是可以接受的。对于所有测试的血浆生物标志物，新鲜（从未冷冻）和先前冷冻的样本之间的预分析效果是可比的，尽管由于只有一个样本可用于新鲜（从未冷冻）的血浆分析，对脂蛋白 E4-阳性的数据更难解释。我们还证明了血浆“应激”（即在 $\text{RT}/4^\circ\text{C}$ 储存）的时间可以发生在冷冻周期之前或之后。同样，这一发现将使样品的处理和加工更加简单，因为样品不需要立即测量，而是可以进行冷冻。综合来看，这些发现使分析前的血样处理和加工具有更大的灵活性，这意味着测试可以在例如初级保健中心进行，这反过来又使大规模的淀粉样病理和 AD 评估更加可行。

先前在罗氏诊断公司（德国彭斯堡）使用早期版本的 Electrsys A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 血浆原型免疫分析方法进行的一项研究报告称，先前冷冻的血浆样本中的 A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 水平在测量前保持在 4°C 时最多稳定 6 h；如果报告了 A- $\beta 42/\text{A-}\beta 40$ 比率，则这些分析物在 RT 和 4°C 下保持稳定长达 24 h (Rózga 等人, 2019 年)。相反，目前的发现表明，A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 在 4°C 解冻的 EDTA 血浆中保持稳定长达 24 h，但如果报告 A- $\beta 42/\text{A-}\beta 40$ 的比率，则仅在 RT 下保持稳定长达 2 h。我们的结果显示，与 A- $\beta 40$ 相比，A- $\beta 42$ 水平随着时间的推移下降得更快，从而降低了 A- $\beta 42/\text{A-}\beta 40$ 比率对这种影响的补偿能力。

我们的数据与之前的一份报告 (Liu 等人, 2020 年) 大体一致，报告中指出，随着 F/T β 周期的增加，A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 的水平呈下降趋势，与这里观察到的情况类似。尽管先前的报告没有发现新鲜（从未冷冻）血浆中 A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 的水平与经历五个 F/T 周期的血浆相比在统计学上没有显著差异 [（而我们发现新鲜（从未冷冻）血浆中 A- $\beta 42$ 和 A- $\beta 40$ 最多两个 F/T 周期是可以接受的）]，但我们认为这种差异可能是由于数据解释的刚性不同所致。

目前的研究结果表明，载脂蛋白 E4、GFAP、NFL、磷酸化-tau-181 和磷酸化-tau-217 的水平在 EDTA、LiHep 和 NaCit 管之间是相似的。这是令人鼓舞的，因为磷酸-tau 是目前正在研究的最有前途的血浆生物标志物之一；这种分析物在 EDTA、LiHep 和 NaCit 管之间的类似稳定性有利于未来的大规模研究。然而，我们没有测试这些样本矩阵的稳定性，因此我们的结果应该在这种情况下解释。与目前的研究结果相反，先前的研究发现，与 EDTA 管相比，NaCIT 管中

的磷酸-tau-181、GFAP 和 NFL 的水平较低（中位回收率范围：74%~103%），而 LiHep 管中的磷酸-tau-181、GFAP 和 NFL 的水平较高（Ashton 等人，2021 年；Verberk 等人，2021 年）。本文中观察到的 LiHep 和 Nacit 管中 A- β 42 和 A- β 40 恢复信号的增加和减少与先前研究的结果一致（Ashton 等人，2021 年；Rózga 等人，2019 年；Verberk 等人，2021 年）。使用 NaCit 试管时观察到分析物水平下降的一种解释可能是试管中的柠檬酸盐溶液稀释了样品。我们的研究提供了进一步的证据，表明 LiHEP 和 NaCIT 管的使用会影响血浆中 A- β 42 和 A- β 40 的测定，并表明如果 A- β 42 和 A- β 40 是感兴趣的分析物，那么 EDTA 管可能是更可取的。

先前的一项研究发现，脑脊液样本在管道之间的连续转移显著影响 A- β 42 和 A- β 40 的测量水平（Toombs 等人，2014 年）。相反，另一份报告表明，试管转移对血浆中的 A- β 42 和 A- β 40 没有影响，这支持了本研究结果（Rózga 等人，2019 年）。其中，随着试管转移数量的增加，A- β 42 和 A- β 40 水平呈下降趋势；然而，这在预先定义的接受标准范围内，很可能

可以用 A- β 42 的疏水性导致聚集和附着在管子表面来解释（Willemse 等人，2017 年）。

以前的研究表明，AD 生物标志物的测量水平，特别是 A- β 42 和 A- β 40，与使用不同的塑料管处理脑脊液样本有关（Lehmann 等人，2014 年；Perret-Liaudet 等人，2012 年）。在这项研究中，我们使用两个通常用于电子分析的试管对数据进行评估，发现血浆生物标志物恢复信号的中位数没有明显变化。

根据这项研究的结果，我们根据新鲜（从未冷冻）样本的测量结果，为分析淀粉样变性和 AD 的血浆生物标志物的血液采集和样本处理提供了最佳处理方案（图 4）。我们的建议与阿尔茨海默病血液生物标志物标准化工作组的最新发现基本一致，包括使用 EDTA 抗凝管进行血液采样，最多五管转移，以及最多两次 F/T 循环（-20°C 或 -80°C），以保持血浆样本中生物标志物的稳定性（Verberk 等人，2021 年）。A- β 42 和 A- β 40 是对分析前样品处理最敏感的分析物，其影响只能通过使用 A- β 42/A- β 40 的比率来部分补偿。

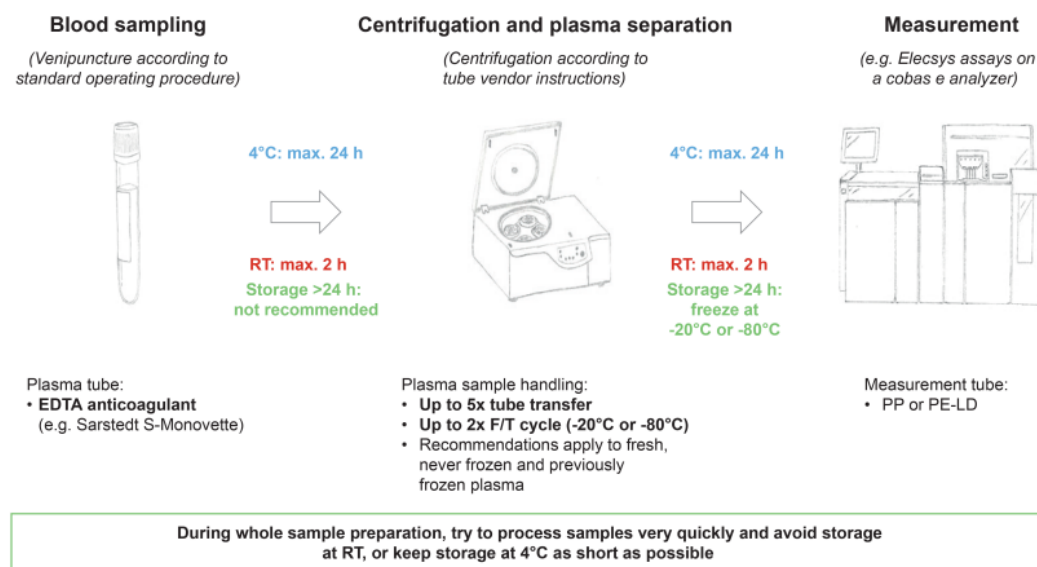


图 4. 淀粉样病理学和 AD 的血浆生物标志物分析的采血和分析前样品处理建议摘要。AD，阿尔茨海默氏病；EDTA，乙二胺四乙酸；F/T，冷冻/解冻；h，小时；max.，最大；PE-LD，低密度聚乙烯；PP，聚丙烯；RT，室温。

这项研究的一个关键发现是，WB 和 EDTA 血浆可以在 4°C 下存储长达 24 h，而在 RT 下存储应避免或限制为最多 2 h。这些发现可以（1）提高进行 AD 测试的可行性，这意味着这种评估可以在例如初级保健机构进行；（2）简化实验室对样本的处理。

这项研究的优势包括测量新鲜（从未冷冻）血浆样本中的一大组血浆生物标志物，以及使用全自动和高精度的 Elecsys

血浆原型免疫分析，这允许全球可扩展；与以前的研究相比，这显示出新颖性（Rózga 等人，2019 年；Verberk 等人，2021 年）。这项研究的其他创新方面包括将生物标志物的分析扩展到 A- β 42 和 A- β 40 之外，在进一步处理之前评估存储在 4°C 的样本，以及使用来自可能或可能的 AD 认知障碍患者的临床样本，而不是来自健康患者的样本。我们的结果证实了先前研究的发现，因此可能是可靠的（Rózga 等人，2019；Verberk 等，2021）；然而，未来涉及其他制造商的血浆生物标志物免疫分

析的研究需要允许平台之间的比较。

我们承认，这项研究也有一些局限性。样本来自相对较少的患者（每项实验 4 ~ 6 例，来自总共 16 名捐赠者），很少是载脂蛋白 E ϵ 4 携带者。尽管样本量很小，但在患者中观察到的效果是一致的，这让我们相信结果是稳健的。此外，研究人群反映了 ELELESYS A- β 40、A- β 42、载脂蛋白 E4、GFAP、

NFL、磷酸-tau-181 和磷酸-tau-217 血浆原型免疫分析的真实使用情况（即，在认知障碍患者中）。

这里提出的用于分析淀粉样蛋白病理学和 AD 的血浆生物标志物的最佳采血和样品处理方案的建议将提高未来血浆生物标志物检测研究的可重复性，并可能支持将这些检测方法应用于常规临床实践。

This is a repository copy of *Impact of pre-analytical sample handling factors on plasma biomarkers of Alzheimer's disease*.

White Rose Research Online URL for this paper:

<https://eprints.whiterose.ac.uk/195775/>

Version: Published Version

Article:

Kurz, C., Stöckl, L., Schrurs, I. et al. (5 more authors) (2023) Impact of pre-analytical sample handling factors on plasma biomarkers of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. ISSN 0022-3042

<https://doi.org/10.1111/jnc.15757>

Reuse

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) licence. This licence allows you to distribute, remix, tweak, and build upon the work, even commercially, as long as you credit the authors for the original work. More information and the full terms of the licence here:

<https://creativecommons.org/licenses/>

Takedown

If you consider content in White Rose Research Online to be in breach of UK law, please notify us by emailing eprints@whiterose.ac.uk including the URL of the record and the reason for the withdrawal request.

Impact of pre-analytical sample handling factors on plasma biomarkers of Alzheimer's disease

Carolin Kurz¹ | Laura Stöckl² | Isabelle Schürs³ | Ivonne Suridjan³ |
Selim Üstün Gürsel¹ | Tobias Bittner⁴ | Alexander Jethwa² | Robert Perneczky^{1,5,6,7,8} 

¹Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany

²Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

³Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Switzerland

⁴F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland

⁵German Center for Neurodegenerative Disorders (DZNE), Munich, Germany

⁶Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany

⁷Ageing Epidemiology (AGE) Research Unit, School of Public Health, Imperial College London, London, UK

⁸Sheffield Institute for Translational Neuroscience (SITraN), University of Sheffield, Sheffield, UK

Correspondence

Robert Perneczky, Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Hospital, LMU Munich, Nussbaumstr. 7, 80336 Munich, Germany.
Email: robert.perneczky@med.uni-muenchen.de

Funding information

Roche Diagnostics International Ltd (Rotkreuz, Switzerland)

Abstract

An unmet need exists for reliable plasma biomarkers of amyloid pathology, in the clinical laboratory setting, to streamline diagnosis of Alzheimer's disease (AD). For routine clinical use, a biomarker must provide robust and reliable results under pre-analytical sample handling conditions. We investigated the impact of different pre-analytical sample handling procedures on the levels of seven plasma biomarkers in development for potential routine use in AD. Using (1) fresh (never frozen) and (2) previously frozen plasma, we evaluated the effects of (A) storage time and temperature, (B) freeze/thaw (F/T) cycles, (C) anticoagulants, (D) tube transfer, and (E) plastic tube types. Blood samples were prospectively collected from patients with cognitive impairment undergoing investigation in a memory clinic. β -amyloid 1–40 (A β 40), β -amyloid 1–42 (A β 42), apolipoprotein E4, glial fibrillary acidic protein, neurofilament light chain, phosphorylated-tau (phospho-tau) 181, and phospho-tau-217 were measured using Elecsys[®] plasma prototype immunoassays. Recovery signals for each plasma biomarker and sample handling parameter were calculated. For all plasma biomarkers measured, pre-analytical effects were comparable between fresh (never frozen) and previously frozen samples. All plasma biomarkers tested were stable for ≤ 24 h at 4°C when stored as whole blood and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) plasma. Recovery signals were acceptable for up to five tube transfers, or two F/T cycles, and in both polypropylene and low-density polyethylene tubes. For all plasma biomarkers except A β 42 and A β 40, analyte levels were largely comparable between EDTA, lithium heparin, and sodium citrate tubes. A β 42 and A β 40 were most sensitive to pre-analytical handling, and the effects could only be partially compensated by the A β 42/A β 40 ratio. We provide recommendations for an optimal sample handling protocol for analysis of plasma biomarkers for amyloid pathology AD, to improve the reproducibility of future studies on plasma biomarkers assays and for potential use in routine clinical practice.

Abbreviations: 9NC, trisodium citrate; AD, Alzheimer's disease; A β , β -amyloid; CSF, cerebrospinal fluid; CV, coefficient of variation; DMT, disease-modifying therapy; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; F/T, freeze/thaw; FNF, fresh (never frozen); GFAP, glial fibrillary acidic protein; IQR, interquartile range; K3, tripotassium; K3E, tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid; LiHep, lithium heparin; NA, not available; NaCit, sodium citrate; NFL, neurofilament light chain; PE-LD, low-density polyethylene; PET, positron emission tomography; PF, previously frozen; phospho-tau, phosphorylated-tau; PP, polypropylene; Q, quartile; RT, room temperature; WB, whole blood.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Neurochemistry* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society for Neurochemistry.

1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. Recent forecasts predict that by 2050, there will be more than 152 million people living with dementia worldwide, with up to 70% of cases being attributed to AD (Nichols et al., 2022; World Health Organisation, 2022). AD is commonly characterized by β -amyloid ($A\beta$) deposition (amyloid pathology) and tau pathology in the brain (DeTure & Dickson, 2019).

Until recently, there were no disease-modifying therapies (DMTs) available that could attenuate the cognitive and functional decline associated with AD and improve the patient's quality of life (Rasmussen & Langerman, 2019). However, in June 2021, the United States Food and Drug Administration granted accelerated approval for aducanumab, an $A\beta$ -directed monoclonal antibody for the treatment of patients with mild symptomatic AD (Esang & Gupta, 2021) and in September 2022, phase three clinical trial results for lecanemab for the treatment of mild cognitive impairment due to AD and mild AD with confirmed presence of amyloid pathology in the brain were announced (Eisai, 2022). Such novel DMTs will likely be most effective during the early stages of AD; as such, routine clinical use of plasma biomarkers that correlate with cerebral amyloid and tau pathologies are required to enable early identification of patients requiring further evaluation and initiation of DMTs (Rasmussen & Langerman, 2019; Rózga et al., 2019). Given that there are many underlying causes of dementia, and co-pathology is common in individuals with AD, it is also important to be able to differentiate the clinical syndrome from the underlying pathological process to arrive at a diagnosis of AD (Rabinovici et al., 2017; Staffaroni et al., 2017).

Validated cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers (including $A\beta$, total-tau and phosphorylated-tau [phospho-tau]) and positron emission tomography (PET) biomarker testing are routinely used for the diagnosis of AD; however, these procedures are expensive, invasive, and have limited availability in the primary care setting (Blennow et al., 2015; Grimmer et al., 2009; Janelidze et al., 2020). There exists an unmet need for reliable plasma biomarkers of amyloid pathology and AD that are accessible, minimally invasive and easy to use, to aid identification of patients who would benefit from confirmatory diagnostic evaluation using CSF and PET, and rule out patients with a low likelihood of amyloid pathology and AD (Rózga et al., 2019). Collection of plasma via blood draw is associated with less risks, is less invasive, and inexpensive compared with CSF collection via lumbar puncture and PET imaging. Furthermore, a strong correlation has been observed between several of the biomarkers found in CSF and plasma (Barthélemy et al., 2020; Blennow et al., 2015; Karikari et al., 2020; Khoury & Ghossoub, 2019; Ovod et al., 2017; Tatebe et al., 2017; Zetterberg, 2019). In particular, the plasma β -amyloid 1–42/ β -amyloid 1–40 ($A\beta_{42}/A\beta_{40}$) and CSF phospho-tau/ $A\beta_{42}$

ratios are reflective of amyloid pathology in the brain, with a diagnostic accuracy of approximately 90% versus PET, dependent on the analytical platform used (Doecke et al., 2020; Hansson et al., 2018; Nakamura et al., 2018; Ovod et al., 2017; Zetterberg, 2019).

Variability exists between institutions in the procedures used to process plasma and CSF samples prior to analysis, and differences in these procedures may contribute to the significant inter-laboratory and batch-to-batch variability observed in previous studies on CSF biomarkers (Hansson et al., 2021; Snyder et al., 2014; Watt et al., 2012). Recent studies have evaluated the impact of common pre-analytical parameters on the measurement of plasma biomarkers for amyloid pathology and AD, and provide recommendations to standardize sample handling procedures and improve the reliability of analyses on these biomarkers (Rózga et al., 2019; Verberk et al., 2021). Further investigation into appropriate pre-analytical sample handling procedures across a wide range of plasma biomarkers, in fresh (never frozen) samples, using fully automated platforms is required to aid the reliable analysis of plasma biomarkers for amyloid pathology and AD in routine laboratory practice and in clinical trials.

This exploratory study aimed to evaluate the effects of storage time and temperature in fresh (never frozen) and previously frozen plasma; these evaluations were conducted using plasma separated from stressed whole blood (WB), and plasma stressed following separation from WB. In addition, the effects of freeze/thaw (F/T) cycles were studied in fresh (never frozen) plasma, the effects of anticoagulants and tube transfer in previously frozen plasma, and the effects of plastic tube type in both in fresh (never frozen) and previously frozen plasma (Table 1; Figure S1).

2 | METHODS

2.1 | Study design

This prospective, non-interventional study was conducted between December 2020 and October 2021 in Germany (sample collection at University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany; measurement at Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and the International Council for Harmonisation Good Clinical Practice guidelines. All participants provided written informed consent to participate in the *PsyCourse* biobank project, including the collection, storage, analysis, scientific utilization, and distribution of samples. Blood samples were anonymized, and no clinical data was shared. *PsyCourse* was conducted by the Department of Psychiatry and Psychotherapy, LMU Munich, and received approval from the ethics committee of LMU Munich (project number 18-716).

TABLE 1 Summary of pre-analytical sample handling parameters and assays evaluated in this study and their results

Sample handling parameter																	
Storage time and temperature																	
Assay	RT						4°C						Anticoagulant		Tube type		
	WB (h)			EDTA plasma (h)			WB (h)			EDTA plasma (h)							
	FNF	PF		FNF	PF		FNF	PF		FNF	PF						
	Number of F/T cycles (-20°C or -80°C)																
	EDTA plasma (reference)																
Aβ40	2	6	2	2	2	24	24	24	24	24	2	✓	X	✓	5	✓	✓
Aβ42	2	2	2	2	2	24	24	24	24	24	2	✓	X	✓	5	✓	✓
Aβ42/ Aβ40	2	6	6	2	2	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓
Apolipoprotein E4	-	-	6	2	2	-	-	24	24	24	4	✓	-	-	5	✓	✓
GFAP	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓
NFL	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓
phospho-tau-181	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	4	✓	-	-	-	✓	✓
phospho-tau-217	24	24	6	24	24	24	24	24	24	24	4	✓	✓	✓	5	✓	✓

Note: Hours indicate the time for which the plasma biomarker levels were within pre-defined acceptance criteria. Tick marks (✓) indicate parameters for which plasma biomarker levels were within pre-defined acceptance criteria; crosses (X) indicate parameters for which plasma biomarker levels did not meet pre-defined acceptance criteria. En dashes (-) indicate parameters for which no data were collected.

Abbreviations: A β 40, β -amyloid(1-40); A β 42, β -amyloid(1-42); EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FNF, fresh (never frozen); F/T, freeze/thaw; GFAP, glial fibrillary acidic protein; h, hours; LIHep, lithium heparin; NaCit, sodium citrate; NFL, neurofilament light chain; PE-LD, low-density polyethylene; phospho-tau-181, phosphorylated-tau 181; phospho-tau-217, phosphorylated-tau 217; PF, previously frozen; PP, polypropylene; RT, room temperature; WB, whole blood.

The plasma levels of A β 40, A β 42, apolipoprotein E4, glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament light chain (NFL), phospho-tau-181, and phospho-tau-217 were measured using fully automated Elecsys[®] plasma prototype immunoassays on the cobas[®] e 601 analyzer (all Roche Diagnostics International Ltd). The Elecsys A β 40, A β 42, apolipoprotein E4, GFAP, NFL, phospho-tau-181, and phospho-tau-217 plasma prototype immunoassays are intended for investigational/research purposes and are not currently approved for clinical use or commercially available. The prototype immunoassays were validated according to internal procedures adapted from the bioanalytical method validation guideline EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2 from the European Medicines Agency. The coefficients of variation for intra-assay, inter-assay and inter-instrument precision are summarized in [Table S1](#). The A β 42/A β 40 ratio was calculated from the A β 40 and A β 42 measurements obtained in each analytical assessment procedure.

2.2 | Participants and sample collection/handling

Eligible participants were patients with cognitive impairment due to possible or probable AD according to the National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria (McKhann et al., 2011), presenting for routine clinical visits at the University Hospital, LMU Munich. The laboratory site that received the samples for plasma biomarker measurement had no further patient information. Thus, no randomization was performed to allocate individuals in this study, no blinding was necessary, and no pre-determined sample size calculations were employed. We did not conduct power calculations for this analysis, as the results were based on signal recovery rates versus the reference sample, and no p-values were produced. Despite the small sample size, the effects were consistent across patients, which gives us confidence that the changes seen are robust effects. No samples were excluded from the analyses.

All samples were collected at three independent blood donation events and processed as previously described (Rózga et al., 2019), unless otherwise specified in Section 2.3. Venepuncture was performed according to a standard operating procedure and free flow of blood with mild aspiration was ensured to avoid hemolysis. WB samples were collected in tripotassium (K3) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) S-Monovette tubes (Sarstedt Inc.) and the tubes were immediately inverted five times after sample collection to ensure sufficient mixing of the WB with the anticoagulant present in the tube. To achieve the correct WB to anticoagulant ratio, each tube type was filled to a nominal volume according to the manufacturer's instructions. Unless otherwise stated, WB samples were stored in the collection tube at room temperature (RT) and centrifuged within 1 h of collection for 10 min at 2000xg at RT in a swing bucket centrifuge. Separated plasma was then transferred within 1 h of centrifugation into a polypropylene (PP) tube, inverted several times to ensure sufficient mixing of the sample, and immediately aliquoted into PP tubes. Further details of the tubes used are provided in [Table S2](#).

2.3 | Pre-analytical sample handling parameter assessments

The effects of the following pre-analytical sample handling parameters on plasma biomarker levels were assessed: (A) storage time and temperature, (B) F/T cycles, (C) anticoagulant type, (D) tube transfer, and (E) plastic tube type.

2.3.1 | Storage time and temperature assessment

To assess the effects of storage time and temperature on the stability of WB prior to plasma separation, one 'baseline' WB sample set was kept at 4°C for <6 h prior to centrifugation and plasma collection. This delay of up to 6 h was unavoidable due to logistical circumstances. At the time of this experiment, sufficient information had already been collected on the stability of the analytes at 4°C and storage of <6 h at 4°C was considered acceptable. Thus, fresh (never frozen) baseline plasma samples were stored for <6 h at 4°C prior to preparation, and previously frozen baseline plasma samples were stored for 30 min at RT prior to preparation and frozen at -20°C prior to analysis. Plasma samples were assessed using the Elecsys A β 40, A β 42, apolipoprotein E4, GFAP, NFL, phospho-tau-181, and phospho-tau-217 plasma prototype immunoassays to determine a baseline measurement for each of the biomarkers tested.

Additional WB sample sets were 'stressed' by keeping them at RT or 4°C for an additional 2, 6, or 24 h before centrifugation and plasma separation. These 'stress' procedures were intended to simulate laboratory situations in which samples may be left unattended prior to, or after, processing, causing a delay in handling. The samples were then either measured immediately (hereafter referred to as 'fresh (never frozen) plasma from stressed WB') or frozen at -20°C prior to analysis (hereafter referred to as 'previously frozen plasma from stressed WB').

To evaluate the effects of storage time and temperature on the stability of plasma, WB samples were processed as described above. Separated plasma was then pooled and split into aliquots. Aliquoted plasma samples were assayed or frozen immediately to establish a baseline measurement, or 'stressed' by keeping them at RT or 4°C for an additional 2, 6, or 24 h, and either assayed immediately after the delay ('fresh (never frozen) stressed plasma' samples) or frozen at -20°C and assayed immediately after thawing ('previously frozen stressed plasma' samples).

For previously frozen plasma samples, three possible handling scenarios were investigated, whereby 'stress' simulation occurred at different times after plasma separation. In these scenarios, plasma was (1) transferred to a measuring tube and stressed prior to freezing, (2) stressed in the original blood collection tube and then transferred to measuring tubes for freezing, or (3) transferred to a measuring tube, frozen and stressed after thawing. Note, there are no data available for phospho-tau-181 measured in previously frozen samples.

2.3.2 | F/T cycle assessment

Samples undergoing a F/T cycle analysis were kept at 4°C for <6 h prior to centrifugation. To evaluate the effects of F/T cycles on plasma biomarker levels, aliquoted plasma was assayed immediately to determine the baseline level of each plasma biomarker in fresh (never frozen) plasma, or after one, two, three, or four F/T cycles. During each F/T cycle, samples were frozen at either -20°C or -80°C for ≥8 h before thawing at RT.

2.3.3 | Anticoagulant assessment

In addition to K3 EDTA tubes, WB was also collected in S-Monovette lithium heparin (LiHep) and S-Monovette sodium citrate (NaCit) tubes (both Sarstedt Inc.) to assess the effects of anticoagulants on plasma biomarker levels. After collection, WB samples were processed as described in Section 2.2 and frozen at -20°C. After thawing, the level of plasma biomarkers were assessed as described above. Note, there are no data available for phospho-tau-181 measured in anticoagulant samples.

2.3.4 | Tube transfer assessment

To determine the effects of tube transfer on the stability of plasma biomarkers, previously frozen plasma samples (processed as described in section 2.2; tube 0 [baseline level], PP tube) were thawed at RT, before being transferred into the next PP tube (tube 1). This process was completed one, three, and five times. For every transfer, a new pipette tip was used. Plasma biomarker levels were then determined for each plasma sample in tubes 0, 1, 3, and 5.

2.3.5 | Plastic tube type assessment

To assess the effect of plastic tube type on plasma biomarker levels, WB samples were collected and then processed either as described in Section 2.2, or with prolonged storage of WB for <6 h at 4°C prior to centrifugation. Separated plasma was transferred into a PP or low-density polyethylene (PE-LD) measuring tube (Sarstedt Inc. and Roche Diagnostics International Ltd, respectively), and assayed immediately after transfer ('fresh [never frozen]') or frozen before measurement ('previously frozen').

2.4 | Statistical analysis

Most of the plasma biomarkers included in the present analysis were measured in single determination. Where duplicate measurements were available, mean values were calculated. For all sample handling parameters tested, recovery signals for Aβ40, Aβ42, apolipoprotein E4, GFAP, NFL, phospho-tau-181, and phospho-tau-217 compared

with the reference sample were reported. For each participant and sample, and for all of the plasma biomarkers measured, the acceptance criteria were ±10% of the signal recovery rate compared with the reference sample. The Aβ40/Aβ42 ratio was calculated based on analyte concentrations, and the recovery signal of the ratio compared with the reference sample was reported. A summary of the reference values used to compare the signal recovery for each sample handling parameter tested is provided in Table S3. The detection of plasma apolipoprotein E4 is intended to determine carrier APOE ε4 status; however, it does not establish homozygosity versus heterozygosity. For apolipoprotein E4 analysis, analyte results were separated into apolipoprotein E4 positive (i.e., presence of at least one APOE ε4 allele) and negative (i.e., no APOE ε4 alleles). Box plots of the analyte levels were generated using JMP version 15.2.0 (SAS Institute Inc.). Assessment of the normality of the data was omitted due to the small sample size. In addition, no parametric tests for outliers were included in the analyses as an abnormal distribution of the data was assumed.

3 | RESULTS

WB samples were collected from a total of $N = 16$ patients across three independent blood donation events. An overview of the analyses performed in this study and results obtained is provided in Table 1.

3.1 | Effect of storage time and temperature on WB and plasma

All of the plasma biomarkers tested were stable for up to 24 h at 4°C when stored as WB and EDTA plasma (Figure 1). Aβ42, Aβ40, and the Aβ42/Aβ40 ratio were unstable if stored for more than 2 h at RT in WB and EDTA plasma. Phospho-tau-181, GFAP, and NFL were stable for up to 24 h at RT in WB and EDTA plasma; phospho-tau-217 was stable at RT for up to 24 h in WB and 6 h in plasma. For all of the plasma biomarkers and pre-analytical effects measured, there was no marked difference in the median recovery signal between fresh (never frozen) and previously frozen plasma samples. Furthermore, there were no marked differences between the three handling scenarios employed for previously frozen plasma (Figure S2).

3.2 | Effect of F/T cycles on fresh (never frozen) plasma

Recovery signals for all plasma biomarkers except Aβ42 and Aβ40 were acceptable for up to four F/T cycles (Figure 2a). For Aβ42 and Aβ40, up to two F/T cycles were acceptable, whereas the Aβ42/Aβ40 ratio was acceptable for up to four F/T cycles. Recovery signals for all plasma biomarkers measured were comparable between samples frozen at -20°C and samples frozen at -80°C.

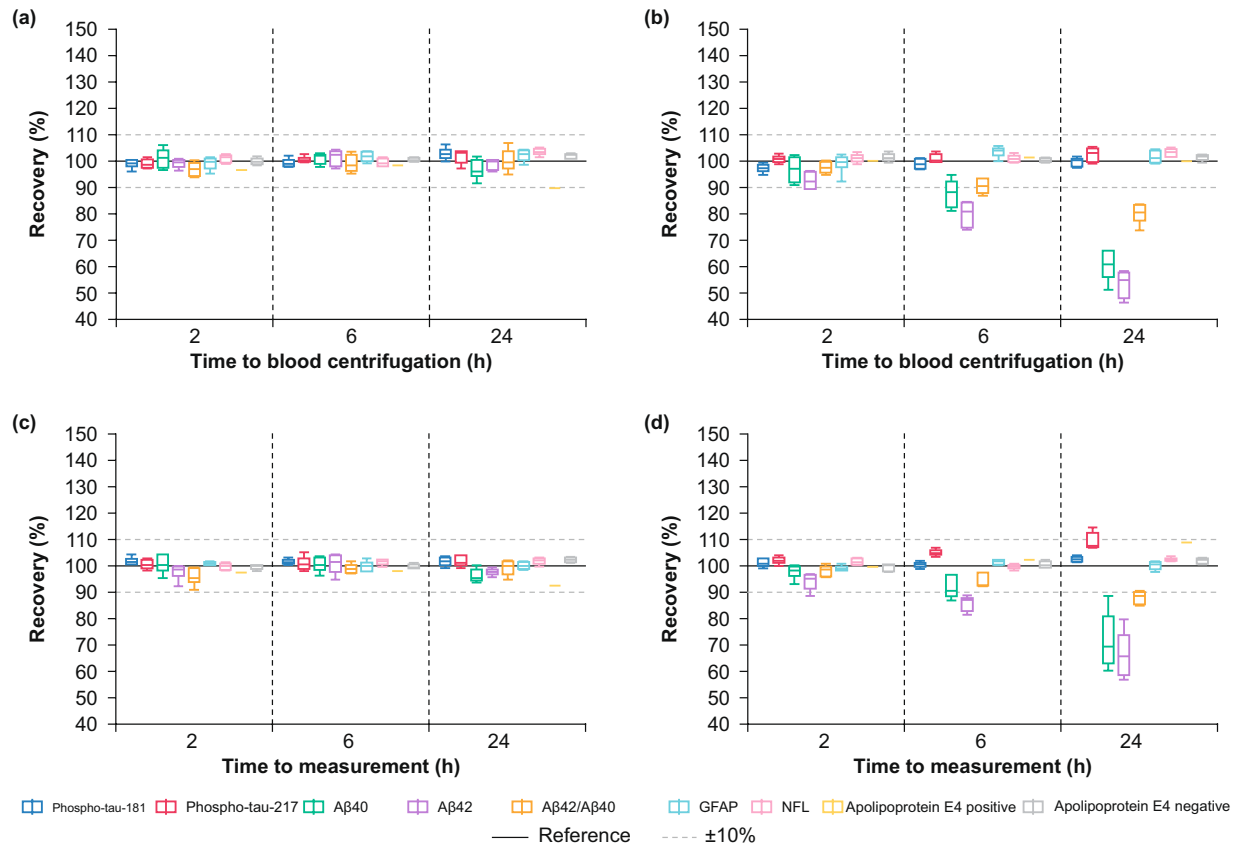


FIGURE 1 Effect of storage time and temperature on plasma biomarker levels in WB stored at (a) 4°C and (b) RT, and plasma stored at (c) 4°C and (d) RT (measured in fresh (never frozen) plasma). For all plasma biomarkers measured $n = 6$, except for apolipoprotein E4 positive and negative, where $n = 1$ and $n = 5$, respectively. Box plots shown comprise data from $n = x$ individual donors and one data point per donor. Boxes represent the median and interquartile range; the lower whisker represents the higher of the minimum values and the 25th percentile (Q1) to $1.5 \times \text{IQR}$; the higher whisker represents the lower of the maximum values and the 75th percentile (Q3) to $1.5 \times \text{IQR}$. Aβ40, β-amyloid 1–40; Aβ42, β-amyloid 1–42; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IQR, interquartile range; NFL, neurofilament light chain; phospho-tau-181, phosphorylated-tau 181; phospho-tau-217, phosphorylated-tau 217; Q, quartile; RT, room temperature; WB, whole blood.

3.3 | Impact of anticoagulant type

For all plasma biomarkers, except Aβ42 and Aβ40, analyte levels were largely comparable between EDTA, LiHep, and NaCit tubes (EDTA was used as a reference; [Figure 3a](#)). Comparing LiHep tubes with EDTA tubes, the median recovery signals for Aβ42 and Aβ40 increased by 10% and 9%, respectively, with LiHep tubes. In NaCit tubes compared with EDTA tubes, the median recovery signals for Aβ42 and Aβ40 decreased by 6% and 4%, respectively, when using NaCit tubes. Furthermore, with NaCit tubes, a downward trend was observed for GFAP and NFL when compared with both EDTA and LiHep tubes. There were no samples from apolipoprotein E4 positive donors available for this analysis.

3.4 | Effect of tube transfer

All plasma biomarkers assessed were stable for up to five tube transfers in previously frozen EDTA plasma ([Figure 3b](#)). The median recovery

signals for Aβ42 and Aβ40 decreased progressively between one, three, and five tube transfers; however, this decrease was within the pre-defined acceptance criteria of $\pm 10\%$ of the median recovery signal.

3.5 | Effect of plastic tube type

There was no marked change observed in the median recovery signal between PP and PE-LD tubes for any of the plasma biomarkers measured in fresh (never frozen) plasma ([Figure 2b](#)). Median recovery signals for all plasma biomarkers measured were comparable between fresh (never frozen) and previously frozen plasma samples ([Figure 2b](#); [Figure S3](#)).

4 | DISCUSSION

The present study evaluated the impact of storage time and temperature on Aβ40, Aβ42, the Aβ42/Aβ40 ratio, apolipoprotein E4,

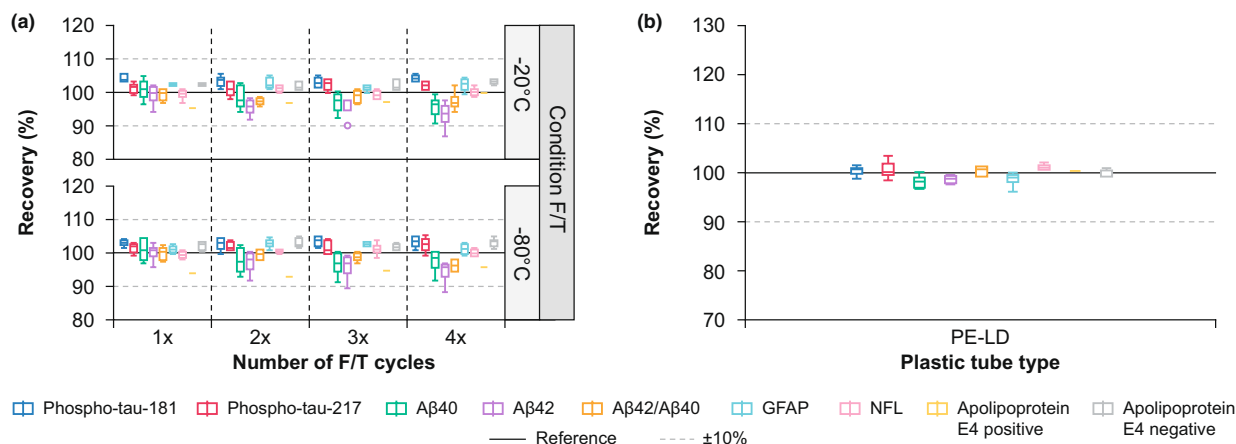


FIGURE 2 Effect of (a) F/T cycles and (b) plastic tube type on plasma biomarker levels in fresh (never frozen) plasma. For all plasma biomarkers measured $n = 6$, except for apolipoprotein E4 positive and negative, where $n = 1$ and $n = 5$, respectively. Box plots shown comprise data from $n = x$ individual donors and one data point per donor. For panel B, a PP tube was used as the reference. Boxes represent the median and interquartile range; the lower whisker represents the higher of the minimum values and the 25th percentile (Q1) to $1.5 \times \text{IQR}$; the higher whisker represents the lower of the maximum values and the 75th percentile (Q3) to $1.5 \times \text{IQR}$. Values above or below the whiskers are plotted as dots. Aβ40, β-amyloid 1–40; Aβ42, β-amyloid 1–42; F/T, freeze/thaw; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IQR, interquartile range; NFL, neurofilament light chain; phospho-tau-181, phosphorylated-tau 181; phospho-tau-217, phosphorylated-tau 217; Q, quartile.

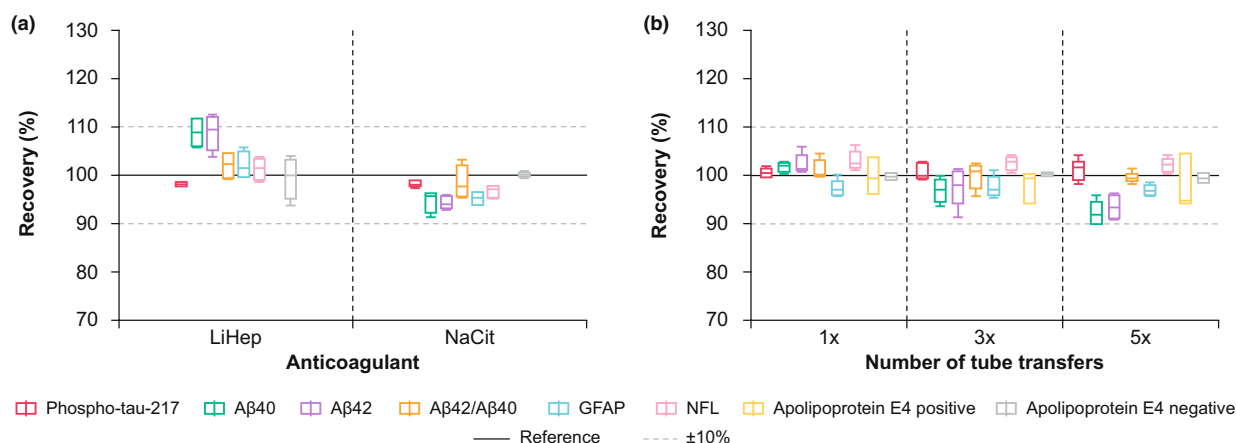


FIGURE 3 Effect of (a) anticoagulants and (b) tube transfer on plasma biomarker levels in previously frozen plasma. For panel A, for all plasma biomarkers measured $n = 4$, except for apolipoprotein E4 positive and negative, where $n = 0$ and $n = 4$, respectively. For panel B, for all plasma biomarkers measured $n = 5$, except for apolipoprotein E4 positive and negative, where $n = 3$ and $n = 2$, respectively. Box plots shown comprise data from $n = x$ individual donors and one data point per donor. Boxes represent the median and interquartile range; the lower whisker represents the higher of the minimum values and the 25th percentile (Q1) to $1.5 \times \text{IQR}$; the higher whisker represents the lower of the maximum values and the 75th percentile (Q3) to $1.5 \times \text{IQR}$. Aβ40, β-amyloid 1–40; Aβ42, β-amyloid 1–42; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IQR, interquartile range; LiHep, lithium heparin; NaCit, sodium citrate; NFL, neurofilament light chain; phospho-tau-217, phosphorylated-tau 217; Q, quartile.

GFAP, NFL, phospho-tau-181, and phospho-tau-217 in fresh (never frozen) and previously frozen plasma, and the effects of storage time and temperature in plasma separated from stressed WB compared with plasma stressed following separation. In addition, the effects of F/T cycles in fresh (never frozen) plasma, the effects of anticoagulants and tube transfer in previously frozen plasma, and the effects of plastic tube types in both in fresh (never frozen) and previously frozen plasma were studied.

All plasma biomarkers tested were stable for up to 24 h at 4°C in WB and EDTA plasma. This means that WB can be stored directly in the collection tube in the fridge with no immediate processing needed. Moreover, EDTA plasma can be stored in the original blood collection tube at 4°C after centrifugation (mimicking a scenario when the sample is mistakenly left in the centrifuge). Measured levels of all plasma biomarkers except Aβ42 and Aβ40 were acceptable for up to four F/T cycles; for Aβ42 and Aβ40, a maximum of

two F/T cycles were acceptable. For all plasma biomarkers tested, pre-analytical effects were comparable between fresh (never frozen) and previously frozen samples, although the data for apolipoprotein E4-positive were more difficult to interpret due to having only a single sample available for fresh (never frozen) plasma analysis. We also demonstrated that the timing of plasma 'stressing' (i.e., storage at RT/4°C) can occur either before, or after, the freezing cycle. Again, this finding will make sample handling and processing more straightforward as samples will not need to be measured immediately and can instead be frozen. In combination, these findings allow for greater flexibility in pre-analytical blood sample handling and processing meaning that testing could take place at e.g., primary care centers, which in turn, would make large scale assessment for amyloid pathology and AD more feasible.

A previous study, conducted using earlier versions of the Elecsys A β 42 and A β 40 plasma prototype immunoassays at Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Germany), reported that A β 42 and A β 40 levels in previously frozen plasma samples were stable for up to 6 h when kept at 4°C prior to measurement; if the A β 42/A β 40 ratio was reported, these analytes remained stable for up to 24 h at RT and 4°C (Rózga et al., 2019). Conversely, the present findings indicate that A β 42 and A β 40 remain stable for up to 24 h at 4°C thawed EDTA plasma but were only stable for up to 2 h at RT if reporting the A β 42/A β 40 ratio. Our results show that A β 42 levels decreased faster over time compared with A β 40, reducing the ability of the A β 42/A β 40 ratio to compensate for this effect.

Our data are broadly in line with a previous report (Liu et al., 2020), in which a downwards trend in the levels of A β 42 and A β 40 with increasing number of F/T cycles was noted, similar to that observed here. Although the prior report did not find a statistically significant difference in the levels of A β 42 and A β 40 in fresh (never frozen) plasma compared with plasma experiencing five F/T cycles (whereas we found maximum of two F/T cycles were acceptable for A β 42 and A β 40 in fresh [never frozen] plasma), we consider that this discrepancy is likely due to differences in the rigidity of data interpretation.

Present findings indicate that apolipoprotein E4, GFAP, NFL, phospho-tau-181, and phospho-tau-217 levels were comparable between EDTA, LiHep, and NaCit tubes. This is encouraging given that phospho-tau is one of the most promising plasma biomarkers currently being investigated; the comparable stability of this analyte between EDTA, LiHep and NaCit tubes is beneficial for future large-scale studies. However, we did not test stability in these sample matrices, and so our results should be interpreted in that context. In contrast with present findings, previous studies found that levels of phospho-tau-181, GFAP, and NFL were lower in NaCit tubes (range of median recovery: 74%–103%) and higher in LiHep tubes (103%–206%) compared with EDTA tubes (Ashton et al., 2021; Verberk et al., 2021). The increase and decrease in recovery signal observed herein for A β 42 and A β 40 in LiHep and NaCit tubes, respectively, is in accordance with findings from previous studies (Ashton et al., 2021; Rózga et al., 2019; Verberk et al., 2021). One explanation for the decrease in analyte levels observed when using NaCit tubes

may be that the citrate solution in the tubes dilutes the sample. Our study provides further evidence that use of LiHep and NaCit tubes can impact the measurement of A β 42 and A β 40 in plasma and indicate that EDTA tubes may be preferable if A β 42 and A β 40 are the analytes of interest.

A previous study found that consecutive transfer of CSF samples between tubes significantly affected measured levels of A β 42 and A β 40 (Toombs et al., 2014). Conversely, another report demonstrated that tube transfers had no effect on A β 42 and A β 40 in plasma, which supports the present findings (Rózga et al., 2019). Herein, a downwards trend in A β 42 and A β 40 levels was observed with increasing numbers of tube transfers; however, this was within the pre-defined acceptance criteria and can most likely be explained by the hydrophobicity of A β 42, which leads to aggregation and adherence to tube surfaces (Willemse et al., 2017).

Previous studies have indicated a sensitivity in measured levels of AD biomarkers, especially A β 42 and A β 40, related to the use of different plastic tubes used to process CSF samples (Lehmann et al., 2014; Perret-Liaudet et al., 2012). In this study, we evaluated data using two tubes commonly utilized for Elecsys assays and found no noticeable change in median plasma biomarker recovery signals.

Based on the results of this study, we provide recommendations for an optimal handling protocol for blood collection and sample handling for analysis of plasma biomarkers for amyloid pathology and AD based on measurement in fresh (never frozen) samples (Figure 4). Our recommendations are largely in line with recent findings from the Standardization of Alzheimer's Blood Biomarkers working group and include the use of EDTA anticoagulant tubes for blood sampling, a maximum of five tube transfers, and a maximum of two F/T cycles at –20°C or –80°C to maintain biomarker stability in plasma samples (Verberk et al., 2021). A β 42 and A β 40 were the analytes most sensitive to pre-analytical sample handling and the effects could only be partially compensated by using the A β 42/A β 40 ratio.

One key finding from the study is that WB and EDTA plasma can be stored at 4°C for up to 24 h, while storage at RT should be avoided or limited to 2 h maximum. These findings could (1) improve the feasibility of conducting AD testing meaning that such assessments could be carried out at, for example, primary care facilities, and (2) simplify the handling of the samples in laboratories.

Strengths of this study include the measurement of a large set of plasma biomarkers in fresh (never frozen) plasma samples and the use of the fully automated and highly precise Elecsys plasma prototype immunoassays, which allow for global scalability; this demonstrates novelty in comparison to previous studies (Rózga et al., 2019; Verberk et al., 2021). Other novel aspects of this study include expanding the analysis of biomarkers beyond that of A β 42 and A β 40, evaluating samples stored at 4°C before further processing, and using clinical samples from patients with cognitive impairment due to possible or probable AD, as opposed to samples from healthy patients. Our results confirm findings from previous studies and are therefore likely to be reliable (Rózga et al., 2019; Verberk

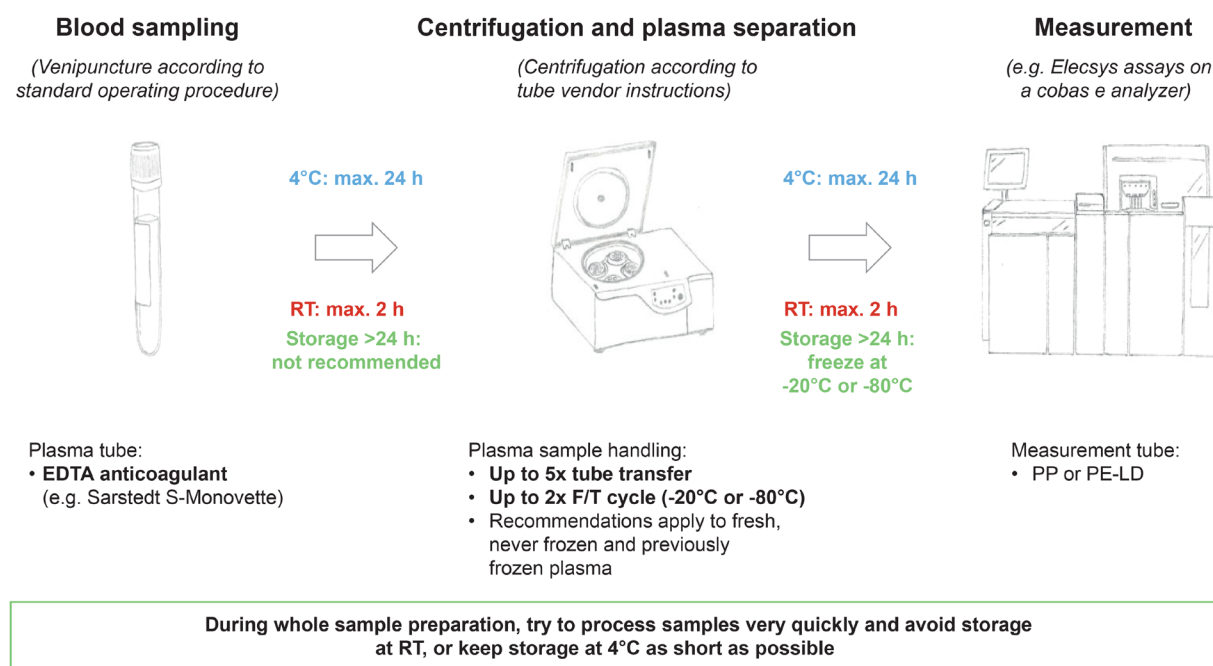


FIGURE 4 Summary of recommendations for blood collection and pre-analytical sample handling for the analysis of plasma biomarkers for amyloid pathology and AD. AD, Alzheimer's disease; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; F/T, freeze/thaw; h, hours; max., maximum; PE-LD, low-density polyethylene; PP, polypropylene; RT, room temperature.

et al., 2021); however, future studies involving plasma biomarker immunoassays from other manufacturers are required to allow for comparison between platforms.

We acknowledge that this study also has some limitations. Samples were included from a relatively small number of patients ($n = 4-6$ per experiment, from a total of 16 donors), and very few were APOE $\epsilon 4$ carriers. Despite the small sample size, the effects observed were consistent across patients, which gives us confidence that the results are robust. Additionally, the study population is reflective of real-world use of the Elecsys A β 40, A β 42, apolipoprotein E4, GFAP, NFL, phospho-tau-181, and phospho-tau-217 plasma prototype immunoassays (i.e., in patients with cognitive impairment).

The recommendations for an optimal handling protocol for blood collection and sample handling for analysis of plasma biomarkers for amyloid pathology and AD presented here will improve the reproducibility of future research into plasma biomarker assays and may support the adoption of these assays into routine clinical practice.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Carolin Kurz, Laura Stöckl, Tobias Bittner, Alexander Jethwa, and Robert Perneczky: study conception/design. Carolin Kurz, Laura Stöckl, Selim Üstün Gürsel, and Robert Perneczky: data acquisition. Carolin Kurz, Laura Stöckl, Isabelle Schrurs, Ivonne Suridjan, Tobias Bittner, Alexander Jethwa, and Robert Perneczky: data analysis/

interpretation. All authors provided critical review of the manuscript and approved the final version for submission.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was sponsored by Roche Diagnostics International Ltd (Rotkreuz, Switzerland). The authors would like to thank the patients and their relatives for their contribution to this research. Third-party medical writing assistance, under the direction of the authors, was provided by Chloe Fletcher, MSc, of Ashfield MedComms (Macclesfield, UK), an Inizio company, and was funded by Roche Diagnostics International Ltd (Rotkreuz, Switzerland). COBAS and ELECSYS are trademarks of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owners. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

FUNDING INFORMATION

This study was sponsored by Roche Diagnostics International Ltd (Rotkreuz, Switzerland).

CONFLICT OF INTEREST

CK and SUG declare no conflicts of interest. LS and AJ are full-time employees of Roche Diagnostics GmbH. ISc and ISu are full-time employees of Roche Diagnostics International Ltd. TB is a full-time employee of F. Hoffmann-La Roche and Genentech and a shareholder in F. Hoffmann-La Roche.

RP has received consultancy fees and speaker honoraria from Roche.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The anonymized data that support the findings of this study are available to qualified investigators on request from the corresponding author, Professor Robert Perneczky (email: robert.perneczky@med.uni-muenchen.de).

PERMISSION TO REPRODUCE MATERIAL FROM OTHER SOURCES

Not applicable.

CLINICAL TRIAL REGISTRATION

This study was not pre-registered as a clinical trial.

ORCID

Robert Perneczky  <https://orcid.org/0000-0003-1981-7435>

REFERENCES

- Ashton, N. J., Suárez-Calvet, M., Karikari, T. K., Lantero-Rodriguez, J., Snellman, A., Sauer, M., Simrén, J., Minguillon, C., Fauria, K., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2021). Effects of pre-analytical procedures on blood biomarkers for Alzheimer's pathophysiology, glial activation, and neurodegeneration. *Alzheimer's & Dementia (Amsterdam, Netherlands)*, 13, e12168. <https://doi.org/10.1002/dad2.12168>
- Barthélemy, N. R., Horie, K., Sato, C., & Bateman, R. J. (2020). Blood plasma phosphorylated-tau isoforms track CNS change in Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 217, e20200861. <https://doi.org/10.1084/jem.20200861>
- Blennow, K., Dubois, B., Fagan, A. M., Lewczuk, P., de Leon, M. J., & Hampel, H. (2015). Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 11, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.004>
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14, 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>
- Doecke, J. D., Ward, L., Burnham, S. C., Villemagne, V. L., Li, Q. X., Collins, S., Fowler, C. J., Manuilova, E., Widmann, M., Rainey-Smith, S. R., Martins, R. N., Masters, C. L., & Aibl Research Group. (2020). Elecsys CSF biomarker immunoassays demonstrate concordance with amyloid-PET imaging. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12, 36. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00595-5>
- Eisai. (2022). Lecanemab Confirmatory Phase 3 clarity AD study met primary endpoint, showing highly statistically significant reduction of clinical decline in large global clinical study of 1,795 participants with early Alzheimer's disease. 28 September 2022. <https://www.eisai.com/news/2022/news202271.html>
- Esang, M., & Gupta, M. (2021). Aducanumab as a novel treatment for Alzheimer's disease: A decade of hope, controversies, and the future. *Cureus*, 13, e17591. <https://doi.org/10.7759/cureus.17591>
- Grimmer, T., Riemenschneider, M., Förstl, H., Henriksen, G., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Shiga, T., Wester, H. J., Kurz, A., & Drzezga, A. (2009). Beta amyloid in Alzheimer's disease: Increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biological Psychiatry*, 65, 927–934. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.01.027>
- Hansson, O., Batrla, R., Brix, B., Carrillo, M. C., Corradini, V., Edelmayer, R. M., Esquivel, R. N., Hall, C., Lawson, J., Bastard, N. L., Molinuevo, J. L., Nisenbaum, L. K., Rutz, S., Salamone, S. J., Teunissen, C. E., Traynham, C., Umek, R. M., Vanderstichele, H., Vandijck, M., ... Blennow, K. (2021). The Alzheimer's Association international guidelines for handling of cerebrospinal fluid for routine clinical measurements of amyloid β and tau. *Alzheimer's & Dementia*, 17, 1575–1582. <https://doi.org/10.1002/alz.12316>
- Hansson, O., Seibyl, J., Stomrud, E., Zetterberg, H., Trojanowski, J. Q., Bittner, T., Lifke, V., Corradini, V., Eichenlaub, U., Batrla, R., Buck, K., Zink, K., Rabe, C., Blennow, K., Shaw, L. M., Swedish BioFINDER Study Group, & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2018). CSF biomarkers of Alzheimer's disease concord with amyloid- β PET and predict clinical progression: A study of fully automated immunoassays in BioFINDER and ADNI cohorts. *Alzheimer's & Dementia*, 14, 1470–1481. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.01.010>
- Janelidze, S., Mattsson, N., Palmqvist, S., Smith, R., Beach, T. G., Serrano, G. E., Chai, X., Proctor, N. K., Eichenlaub, U., Zetterberg, H., Blennow, K., Reiman, E. M., Stomrud, E., Dage, J. L., & Hansson, O. (2020). Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: Relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature Medicine*, 26, 379–386. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0755-1>
- Karikari, T. K., Pascoal, T. A., Ashton, N. J., Janelidze, S., Benedet, A. L., Rodriguez, J. L., Chamoun, M., Savard, M., Kang, M. S., Theriault, J., Schöll, M., Massarweh, G., Soucy, J. P., Höglund, K., Brinkmalm, G., Mattsson, N., Palmqvist, S., Gauthier, S., Stomrud, E., ... Blennow, K. (2020). Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: A diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *The Lancet Neurology*, 19, 422–433. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30071-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30071-5)
- Khoury, R., & Ghossoub, E. (2019). Diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease: A state-of-the-art review. *Biomarkers in Neuropsychiatry*, 1, 100005. <https://doi.org/10.1016/j.bionps.2019.100005>
- Lehmann, S., Schraen, S., Quadrio, I., Paquet, C., Bombois, S., Delaby, C., Dorey, A., Dumurgier, J., Hirtz, C., Krolak-Salmon, P., Laplanche, J. L., Moreaud, O., Peoc'h, K., Rouaud, O., Sablonnière, B., Thouvenot, E., Touchon, J., Vercruysse, O., Hugon, J., ... Perret-Liaudet, A. (2014). Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer's disease diagnosis. *Alzheimer's & Dementia*, 10, S390–S394.e392. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.06.008>
- Liu, H. C., Chiu, M. J., Lin, C. H., & Yang, S. Y. (2020). Stability of plasma amyloid- β 1-40, amyloid- β 1-42, and total tau protein over repeated freeze/thaw cycles. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 10, 46–55. <https://doi.org/10.1159/000506278>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., Fowler, C., Li, Q. X., Martins, R., Rowe, C., Tomita, T., Matsuzaki, K., Ishii, K., Ishii, K., Arahata, Y., Iwamoto, S., Ito, K., Tanaka, K., Masters, C. L., & Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 554, 249–254. <https://doi.org/10.1038/nature25456>
- Nichols, E., Steinmetz, J. D., Vollset, S. E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T. T., Al Hamad, H., Alahdab, F., Alanezi, F. M., Alipour, V., Almustanyir, S., Amu, H., Ansari, I., Arabloo, J., Ashraf, T., ... Vos, T. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: An analysis for the Global Burden of

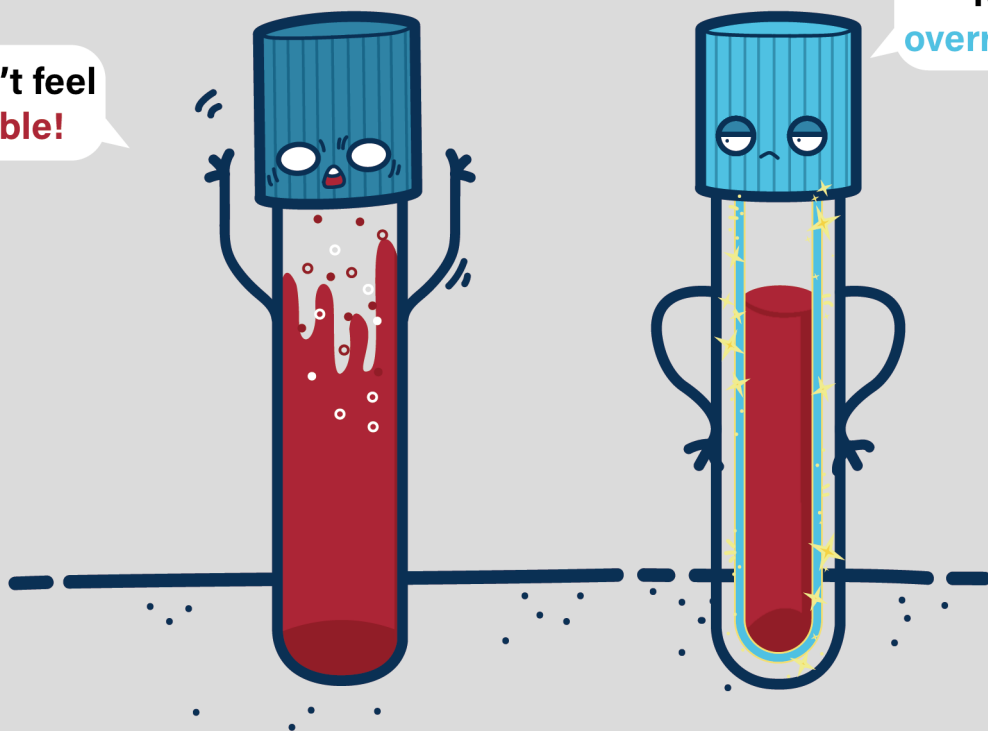
- Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7, e105–e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)
- Ovod, V., Ramsey, K. N., Mawuenyega, K. G., Bollinger, J. G., Hicks, T., Schneider, T., Sullivan, M., Paumier, K., Holtzman, D. M., Morris, J. C., Benzinger, T., Fagan, A. M., Patterson, B. W., & Bateman, R. J. (2017). Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimer's & Dementia*, 13, 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.06.2266>
- Perret-Liaudet, A., Pelpel, M., Tholance, Y., Dumont, B., Vanderstichele, H., Zorzi, W., ElMoualij, B., Schraen, S., Moreaud, O., & Gabelle, A. (2012). Risk of Alzheimer's disease biological misdiagnosis linked to cerebrospinal collection tubes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31, 13–20.
- Rabinovici, G. D., Carrillo, M. C., Forman, M., DeSanti, S., Miller, D. S., Kozauer, N., Petersen, R. C., Randolph, C., Knopman, D. S., Smith, E. E., Isaac, M., Mattsson, N., Bain, L. J., Hendrix, J. A., & Sims, J. R. (2017). Multiple comorbid neuropathologies in the setting of Alzheimer's disease neuropathology and implications for drug development. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)*, 3, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2016.09.002>
- Rasmussen, J., & Langerman, H. (2019). Alzheimer's disease—Why we need early diagnosis. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 9, 123–130. <https://doi.org/10.2147/DNND.S228939>
- Rózga, M., Bittner, T., Batrla, R., & Karl, J. (2019). Preanalytical sample handling recommendations for Alzheimer's disease plasma biomarkers. *Alzheimer's & Dementia (Amsterdam, Netherlands)*, 11, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.02.002>
- Snyder, H. M., Carrillo, M. C., Grodstein, F., Henriksen, K., Jeromin, A., Lovestone, S., Mielke, M. M., O'Bryant, S., Sarasa, M., Sjögren, M., Soares, H., Teeling, J., Trushina, E., Ward, M., West, T., Bain, L. J., Shineman, D. W., Weiner, M., & Fillit, H. M. (2014). Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 10, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.10.007>
- Staffaroni, A. M., Elahi, F. M., McDermott, D., Marton, K., Karageorgiou, E., Sacco, S., Paoletti, M., Caverzasi, E., Hess, C. P., Rosen, H. J., & Geschwind, M. D. (2017). Neuroimaging in dementia. *Seminars in Neurology*, 37, 510–537. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1608808>
- Tatebe, H., Kasai, T., Ohmichi, T., Kishi, Y., Kakeya, T., Waragai, M., Kondo, M., Allsop, D., & Tokuda, T. (2017). Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: Pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Molecular Neurodegeneration*, 12, 63. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0206-8>
- Toombs, J., Paterson, R. W., Schott, J. M., & Zetterberg, H. (2014). Amyloid-beta 42 adsorption following serial tube transfer. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6, 5. <https://doi.org/10.1186/alzrt236>
- Verberk, I. M. W., Misdorp, E. O., Koelewijn, J., Ball, A. J., Blennow, K., Dage, J. L., Fandos, N., Hansson, O., Hirtz, C., Janelidze, S., Kang, S., Kirmess, K., Kindermans, J., Lee, R., Meyer, M. R., Shan, D., Shaw, L. M., Waligorska, T., West, T., ... Teunissen, C. E. (2021). Characterization of pre-analytical sample handling effects on a panel of Alzheimer's disease-related blood-based biomarkers: Results from the Standardization of Alzheimer's Blood Biomarkers (SABB) working group. *Alzheimer's & Dementia*, 18, 1484–1497. <https://doi.org/10.1002/alz.12510>
- Watt, A. D., Perez, K. A., Rembach, A. R., Masters, C. L., Villemagne, V. L., & Barnham, K. J. (2012). Variability in blood-based amyloid-beta assays: The need for consensus on pre-analytical processing. *Journal of Alzheimer's Disease*, 30, 323–336. <https://doi.org/10.3233/jad-2012-120058>
- Willemse, E., van Uffelen, K., Brix, B., Engelborghs, S., Vanderstichele, H., & Teunissen, C. (2017). How to handle adsorption of cerebrospinal fluid amyloid β (1–42) in laboratory practice? Identifying problematic handlings and resolving the issue by use of the A β 42/A β 40 ratio. *Alzheimer's & Dementia*, 13, 885–892. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.01.010>
- World Health Organisation. (2022). Dementia - key facts. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Zetterberg, H. (2019). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease—An update. *Journal of Neuroscience Methods*, 319, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.10.025>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Kurz, C., Stöckl, L., Schürs, I., Suridjan, I., Gürsel, S. Ü., Bittner, T., Jethwa, A., & Perneczky, R. (2023). Impact of pre-analytical sample handling factors on plasma biomarkers of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jnc.15757>

I don't feel
stable!



You're
overreacting!

阳普医疗IMPROVACUTER®PT管

血小板激活最小化



阳普医疗IMPROVACUTER®PT管

阳普医疗科技股份有限公司出版
仅供阳普医疗内部使用。
本刊所选载及翻译文章, 版权属原作者及
阳普医疗所有, 请勿用于其他用途!

MKDAPC-B158:202305

医学
拾萃

IMPROVE REVIEW



地址：珠海市横琴新区环岛东路3000号ICC大厦南塔23层

服务热线：4001-300030

电话：+86 20-3231-2666

传真：+86 20-3231-2667

网站：www.improve-medical.com

邮编：510530