

## **RCR 2020**

### **ISTITUTI VIRTUALI NAZIONALI**

#### **DEMENZE**

**MALATTIA DI PARKINSON E DISORDINI DEL MOVIMENTO  
SCLEROSI MULTIPLA E DISORDINI NEUROIMMUNOLOGICI**

## **WP3**

# **SOP Campionamento e Biobancaggio di Liquor, Plasma e Siero**

**Istituto Virtuale Nazionale  
Malattie Neurologiche Rare**

**SOP adottata da IVN Malattie Neurologiche Rare  
Progetto 2021 - WP5, Task 3 –**

Documento redatto da:

- Federico Verde
- Luisa Benussi

## WP3

### Biochimica – Armonizzazione delle metodiche di analisi dei campioni biologici per studio di biomarcatori SOP per campionamento e biobancaggio di liquor, plasma e siero

#### Indice

- I. Scopo e applicazione
- II. SOP per biobancaggio del liquor
- III. SOP per biobancaggio del plasma
- IV. SOP per biobancaggio del siero
- V. Bibliografia

#### I. SCOPO E APPLICAZIONE

Queste standard operating procedures (SOPs) si riferiscono alla gestione preanalitica (per semplicità, biobancaggio) dei 3 principali liquidi biologici utilizzati in ambito neurologico (liquor, plasma e siero). Le SOPs sono frutto di un lavoro di: 1) iniziale redazione sulla base delle procedure in uso nei diversi IRCCS segnalate dagli stessi nel corso di una indagine preliminare, di modelli costituiti da precedenti analoghi documenti internazionali e di evidenze sperimentali disponibili nella letteratura; 2) successiva revisione da parte dei referenti dei diversi IRCCS coinvolti; 3) sintesi delle osservazioni provenienti dalla fase 2 a produrre la corrente versione. Le SOPs sono intese come valide, in tutti gli IRCCS coinvolti, per il biobancaggio dei liquidi biologici sia a fini diagnostici sia a fini di ricerca. Si raccomanda che ogni IRCCS registri le condizioni di gestione preanalitica dei liquidi biologici, soprattutto relativamente ai punti nei quali si verifichino eventuali scostamenti dalle procedure raccomandate nel presente documento. Nel presente documento si è provveduto a sottolineare alcuni passaggi delle procedure di laboratorio ritenuti particolarmente rilevanti o delicati.

#### II. SOP PER BIOBANCAGGIO DEL LIQUOR

##### II.1. Prelievo del liquor

II. 1. 1. Orario della puntura lombare: preferibilmente al mattino. Registrare orario di esecuzione.

II.1. 2. Condizioni di alimentazione del paziente: preferibilmente a digiuno. Registrare se digiuno o non digiuno.

II. 1. 3. Spazio intervertebrale di esecuzione della puntura lombare: preferibilmente spazio L3-L4 o spazio L4-L5. Registrare quando la puntura lombare viene effettuata in uno spazio diverso.

II. 1. 4. Diametro dell'ago per puntura lombare: tra 18 e 25 G (possibilmente ago atraumatico da 25 G per ridurre la probabilità di cefalea post-puntura lombare).

II.1. 5. Volume di liquor da prelevare: 6-12 mL. Registrare il volume di liquor prelevato.

II. 1. 6. Provette per il prelievo del liquor: provette di polipropilene (se non disponibili provette di polipropilene, sono accettabili le provette di polistirene).

II.1. 7. Liquor da destinare alla analisi chimico-clinica standard: provetta contenente i primi 2 mL di liquor limpido (nel caso di liquor limpido fin dall'inizio: provetta contenente i primi 2 mL di liquor; nel caso di liquor inizialmente ematico per traumatismo microvascolare da puntura con successiva rapida chiarificazione del liquor: provetta contenente i primi 2 mL di liquor limpido dopo la fuoriuscita del liquor ematico, che deve essere scartato).

II. 1. 8. Il restante liquor deve essere unificato in una provetta di polipropilene di dimensioni maggiori e miscelato (mediante ripetute inversioni della provetta e/o mediante ripetute aspirazioni/emissioni di liquido per mezzo di pipetta) a creare un pool omogeneo che andrà poi aliquotato. Registrare il volume del pool.

II.1. 9. Preferibilmente non biobancare campioni di liquor ispettivamente ematici e/o con conta dei globuli rossi > 500/uL. Registrare la conta dei globuli rossi quando > 100/uL.

II. 1. 10. Prelevare i campioni di sangue (per siero/plasma) possibilmente in stretta vicinanza temporale e nelle medesime condizioni (per es. digiuno) rispetto al prelievo di liquor. Registrare quando il sangue (siero/plasma) viene prelevato con altre tempistiche (per es. il giorno seguente) o in altre condizioni rispetto al prelievo di liquor.

## **II. 2. Gestione del liquor tra il prelievo e lo stoccaggio**

II. 2. 1. Conservare il liquor (pool) preferibilmente a temperatura ambiente (alternativamente in ghiaccio) fino alla centrifugazione. Registrare la temperatura di conservazione.

II. 2. 2. È fortemente raccomandato che il liquor arrivi alla centrifugazione entro 2 ore dal prelievo. Registrare quando questo tempo è superiore a 2 ore.

II. 2. 3. Condizioni di centrifugazione: preferibilmente temperatura ambiente (alternativamente 4°C), velocità 2000 x g (400 x g in caso di necessità di preservare cellule), tempo 10 minuti. Registrare le condizioni di centrifugazione.

II. 2. 4. Aliquotazione e stoccaggio devono avvenire subito dopo la centrifugazione.

## **II. 3. Aliquotazione e conservazione**

II. 3. 1. Tipo di provette da utilizzare: provette di polipropilene, preferibilmente con tappo avvitabile.

II. 3. 2. Volume delle provette: preferibilmente 0,25 mL (250 uL), 0,5 mL (500 uL) o 1 mL (1000 uL)

II. 3. 3. Volume delle aliquote: preferibilmente 500 uL (minimo 100 uL, massimo 2 mL). Riempire preferibilmente le provette al 75% per evitare il fenomeno del freeze-drying.

II. 3. 4. Contrassegnare le aliquote possibilmente con etichette resistenti all'acqua e al gelo e recanti codici a barre anonimi e centro-specifici.

II. 3. 5. Temperatura di conservazione: -80°C. Alternativamente: azoto liquido.

### **III. SOP PER BIOBANCAGGIO DEL PLASMA**

#### **III. 1. Prelievo di sangue**

III. 1. 1. Orario del prelievo: preferibilmente al mattino. Registrare orario di esecuzione.

III. 1. 2. Condizioni di alimentazione del paziente: preferibilmente a digiuno. Registrare se digiuno o non digiuno.

III. 1. 3. Sito del prelievo venoso: preferibilmente vena antecubitale.

III. 1. 4. Diametro dell'ago per prelievo: preferibilmente 21 G (range: 19-23 G).

III. 1. 5. Tipo di provette: provette per plasma con EDTA (preferibile rispetto a citrato). Registrare se utilizzate provette con o senza separatore. Registrare se utilizzate provette con citrato invece di EDTA.

III. 1. 6. Se viene effettuato prelievo di liquor, prelevare i campioni di sangue possibilmente in stretta vicinanza temporale e nelle medesime condizioni (per es. digiuno) rispetto al prelievo di liquor. Registrare quando il sangue viene prelevato con altre tempistiche (per es. il giorno seguente) o in altre condizioni rispetto al prelievo di liquor.

#### **III. 2. Gestione del campione di sangue tra il prelievo e lo stoccaggio**

III. 2. 1. Invertire delicatamente le provette 5-10 volte a temperatura ambiente.

III. 2. 2. Tempo tra prelievo e centrifugazione: la centrifugazione deve essere effettuata idealmente entro 1 ora dal prelievo (possibilmente immediatamente dopo la inversione ripetuta successiva al prelievo), e comunque entro 4 ore dal prelievo. Registrare il tempo intercorso tra prelievo e centrifugazione.

III. 2. 3. Temperatura di mantenimento dei campioni fino alla processazione (centrifugazione): temperatura ambiente. Conservare invece a 4°C in caso di tempo di attesa superiore a 4 ore tra prelievo e processazione (tempo di attesa comunque sconsigliato). Registrare la temperatura di mantenimento dei campioni.

III. 2. 4. Condizioni di centrifugazione: temperatura ambiente, velocità 2000 x g, tempo 10 minuti. Registrare le condizioni di centrifugazione.

III. 2. 5. È possibile, analogamente a quanto raccomandato per il liquor, unire il plasma (surnatante della centrifugazione), contenuto nelle provette di sangue prelevate, in una unica provetta di polipropilene di dimensioni maggiori, miscelando poi il plasma ivi trasferito (mediante ripetute inversioni della provetta e/o mediante ripetute aspirazioni/emissioni di liquido per mezzo di pipetta), a creare un pool omogeneo che andrà poi aliquotato. Nel caso di prelievo di > 1 provette di sangue/plasma, segnare se esse sono state processate in maniera separata e parallela o sono state unite a formare un pool.

III. 2. 6. Aliquotazione e stoccaggio devono avvenire subito dopo la centrifugazione.

### **III. 3. Aliquotazione e conservazione**

III. 3. 1. Tipo di provette da utilizzare: provette di polipropilene, preferibilmente con tappo avvitabile.

III. 3. 2. Volume delle provette: preferibilmente 0,25 mL (250 uL), 0,5 mL (500 uL) o 1 mL (1000 uL).

III. 3. 3. Volume delle aliquote: preferibilmente 500 uL (minimo 100 uL, massimo 2 mL). Riempire preferibilmente le provette al 75% per evitare il fenomeno del freeze-drying.

III. 3. 4. Contrassegnare le aliquote possibilmente con etichette resistenti all'acqua e al gelo e recanti codici a barre anonimi e centro-specifici.

III. 3. 5. Temperatura di conservazione: -80°C. Alternativamente: azoto liquido.

## **IV. SOP PER BIOBANCAGGIO DEL SIERO**

### **IV. 1. Prelievo di sangue**

IV. 1. 1. Orario del prelievo: preferibilmente al mattino. Registrare orario di esecuzione.

IV. 1. 2. Condizioni di alimentazione del paziente: preferibilmente a digiuno. Registrare se digiuno o non digiuno.

IV. 1. 3. Sito del prelievo venoso: preferibilmente vena antecubitale.

IV. 1. 4. Diametro dell'ago per prelievo: preferibilmente 21 G (range: 19-23 G).

IV. 1. 5. Tipo di provette: provette per siero (nessun anticoagulante). Registrare se utilizzate provette con o senza gel separatore.

IV. 1. 6. Se viene effettuato prelievo di liquor, prelevare i campioni di sangue possibilmente in stretta vicinanza temporale e nelle medesime condizioni (per es. digiuno) rispetto al prelievo di liquor. Registrare quando il sangue viene prelevato con altre tempistiche (per es. il giorno seguente) o in altre condizioni rispetto al prelievo di liquor.

#### **IV. 2. Gestione del campione di sangue tra il prelievo e lo stoccaggio**

IV. 2. 1. Le provette di sangue devono essere mantenute in posizione verticale a temperatura ambiente per 30-60 minuti per consentire la coagulazione.

IV. 2. 2. Tempo tra prelievo e processazione (centrifugazione): minimo 30 minuti (per consentire la coagulazione), ottimale 30-60 minuti, massimo 4 ore. Registrare il tempo intercorso tra prelievo e centrifugazione.

IV. 2. 3. Temperatura di mantenimento dei campioni fino alla processazione (centrifugazione): temperatura ambiente. Conservare invece a 4°C in caso di tempo di attesa superiore a 4 ore tra prelievo e processazione (tempo di attesa comunque sconsigliato). Registrare la temperatura di mantenimento dei campioni.

IV. 2. 4. Condizioni di centrifugazione: temperatura ambiente, velocità 2000 x g, tempo 10 minuti. Registrare le condizioni di centrifugazione.

IV. 2. 5. È possibile, analogamente a quanto raccomandato per il liquor, unire il siero (surnatante della centrifugazione), contenuto nelle provette di sangue prelevate, in una unica provetta di polipropilene di dimensioni maggiori, miscelando poi il siero ivi trasferito (mediante ripetute inversioni della provetta e/o mediante ripetute aspirazioni/emissioni di liquido per mezzo di pipetta), a creare un pool omogeneo che andrà poi aliquotato. Nel caso di prelievo di > 1 provette di sangue/siero, segnare se esse sono state processate in maniera separata e parallela o sono state unite a formare un pool.

IV. 2. 6. Aliquotazione e stoccaggio devono avvenire subito dopo la centrifugazione.

#### **IV. 3. Aliquotazione e conservazione**

IV. 3. 1. Tipo di provette da utilizzare: provette di polipropilene, preferibilmente con tappo avvitabile.

IV. 3. 2. Volume delle provette: preferibilmente 0,25 mL (250 uL), 0,5 mL (500 uL) o 1 mL (1000 uL).

IV. 3. 3. Volume delle aliquote: preferibilmente 500 uL (minimo 100 uL, massimo 2 mL). Riempire preferibilmente le provette al 75% per evitare il fenomeno del freeze-drying.

IV. 3. 4. Contrassegnare le aliquote possibilmente con etichette resistenti all'acqua e al gelo e recanti codici a barre anonimi e centro-specifici.

IV. 3. 5. Temperatura di conservazione: -80°C. Alternativamente: azoto liquido.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Andrezza AC, Laksono I, Fernandes BS, et al. *World J Biol Psychiatry* 2019;20:340–351. doi: 10.1080/15622975.2019.1574024.
- Ashworth M, Small B, Oldfield L, et al. The holding temperature of blood during a delay to processing can affect serum and plasma protein measurements. *Sci Rep* 2021;11:6487. doi: 10.1038/s41598-021-85052-5.
- Engelborghs S, Niemantsverdriet E, Struyfs H, et al. Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. *Alzheimers Dement (Amst)* 2017;8:111-126. doi: 10.1016/j.dadm.2017.04.007.
- Fourier A, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Quadrio I, Perret-Liaudet A. Pre-analytical and analytical factors influencing Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarker variability. *Clin Chim Acta* 2015;449:9-15. doi: 10.1016/j.cca.2015.05.024.
- Hansson O, Mikulskis A, Fagan AM, et al. The impact of preanalytical variables on measuring cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: A review. *Alzheimers Dement* 2018;14:1313-1333. doi: 10.1016/j.jalz.2018.05.008.
- Hansson O, Batrla R, Brix B, et al. The Alzheimer's Association international guidelines for handling of cerebrospinal fluid for routine clinical measurements of amyloid  $\beta$  and tau. *Alzheimers Dement* 2021;17:1575-1582. doi: 10.1002/alz.12316.
- Hok-A-Hin YS, Willemsse EAJ, Teunissen CE, Del Campo M. Guidelines for CSF Processing and Biobanking: Impact on the Identification and Development of Optimal CSF Protein Biomarkers. *Methods Mol Biol* 2019;2044:27-50. doi: 10.1007/978-1-4939-9706-0\_2.
- Jiang CY, Niu Z, Green MD, et al. It's not 'just a tube of blood': principles of protocol development, sample collection, staffing and budget considerations for blood-based biomarkers in immunotherapy studies. *J Immunother Cancer* 2021;9:e003212. doi: 10.1136/jitc-2021-003212.
- O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, et al. Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement* 2015;11:549-60. doi: 10.1016/j.jalz.2014.08.099.
- Rai AJ, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: Implications for clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2006;3:409–426. doi: 10.1586/14789450.3.4.409.
- Rózga M, Bittner T, Batrla R, Karl J. Preanalytical sample handling recommendations for Alzheimer's disease plasma biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)* 2019;11:291-300. doi: 10.1016/j.dadm.2019.02.002.
- Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Non-homogeneous separation of triglycerides, gamma-glutamyltransferase, C-reactive protein and lactate dehydrogenase after centrifugation of lithium-heparin tubes. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1180-1182. doi: 10.1515/CCLM.2008.237.
- Tashjian RS, Vinters HV, Yong WH. Biobanking of Cerebrospinal Fluid. *Methods Mol Biol* 2019;1897:107-114. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_11.
- Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009;73:1914-1922. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2.
- Teunissen CE, Tumani H, Engelborghs S, Mollenhauer B. Biobanking of CSF: international standardization to optimize biomarker development. *Clin Biochem* 2014;47:288-292. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.024.

- Tuck MK, Chan DW, Chia D, et al. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res* 2009;8:113-117. doi: 10.1021/pr800545q.
- Verberk IMW, Misdorp EO, Koelewijn J, et al. 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. *Alzheimers Dement* 2021. doi: 10.1002/alz.12510. Online ahead of print.
- Willemse EAJ, Teunissen CE. Biobanking of Cerebrospinal Fluid for Biomarker Analysis in Neurological Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2015;864:79-93. doi: 10.1007/978-3-319-20579-3\_7.
- Willemse EAJ, Teunissen CE. Importance of Pre-analytical Stability for CSF Biomarker Testing. In: Deisenhammer F, Sennebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. Springer International Publishing Switzerland 2015.