Articolo Originale

Determinazione dell'ammonio: valutazione della refrigerazione nel mantenimento della stabilità del campione

D. Giavarina, G. Mezzena, B. Faresin, L. Bedin, E. Pozzo, G. Soffiati

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

Riassunto

***Premesse*. La determinazione dei livelli di ammonio in campioni di plasma o siero è fortemente influenzata dalle condizioni preanalitiche e dal tempo di esecuzione. Il trasporto in ghiaccio è raccomandato in associazione alla tempestività dell'esecuzione del test. Scopo di questo lavoro è verificare se e quanto la refrigerazione sia protettiva delle condizioni preanalitiche per questo test.**
***Metodi*. Sono stati comparati 19 campioni di soggetti adulti volontari sani, raccolti in triplo per NH_4^+, un campione analizzato al tempo zero e due analizzati al tempo 120 minuti, uno dopo conservazione in provetta tappata e refrigerata in frigo a 4°C e uno conservato a temperatura ambiente (25°C). Altri 43 campioni sono stati analizzati nello stesso modo ma dopo 3 ore di conservazione.**
***Risultati*. La differenza media tra t0 e t120 refrigerata è risultata di 10,1 ± 6,3 μmol/L (95%CI: 7,1 a 13,1); p < 0,0001. La differenza tra campione non refrigerato e refrigerato a t120 è stata di 0,4 ± 3,5 μmol/L (95% CI: -1,3 a 2,1); p = n.s. La differenza tra t0 e t180 refrigerata è risultata mediamente di 26,3 ± 10,9 μmol/L (95%CI: 22,9 a 29,6); p < 0,0001. La differenza tra campione non refrigerato e refrigerato dopo 180 minuti è stata -1,4 ± 9,1 μmol/L (95% CI: -4,2 a 1,3); p = n.s.**
***Conclusioni*. La concentrazione di ammonio aumenta nel campione intero in dipendenza del tempo. Le differenze di incremento tra i campioni conservati a 4°C e a 25°C sono risultate nulle. La refrigerazione è ininfluente nell'evitare l'incremento dei livelli di ammonio con il passare del tempo. Una corretta determinazione dell'ammoniemia necessita di una esecuzione tempestiva, indipendentemente dalle temperature di trasporto dei campioni interi.**

Summary

Ammonia measurement: evaluation of the sample integrity by refrigeration

Background. Preanalitical conditions strongly affect the measurement of the ammonia levels in plasma or serum, especially the time from drawing the blood sample to centrifugation.
A refrigerate transport is recommended in association to the timeliness of the execution of the test. Aim of this study is to verify if the refrigeration preserves the blood integrity for the ammonia determination.
Methods. we compared the results obtained from 3 blood samples of 19 healthy subjects, measured at time zero and after 120 min, stored a 4° and 25°C. Further, 3 blood samples from other 43 volunteers were evaluated after 3 hours of storage, at the same conditions.
Results. the mean difference between t0 and t120 kept at 4°C was of 10.1 ± 6.3 μmol/L (95%CI: 7.1 - 13.1); p < 0.0001. The difference between not refrigerated and refrigerated samples, after 120 min, was 0.4 ± 3.5 μmol/L (95% CI: -1.3 - 2.1); p = n.s. The mean difference between t0 and t 180 kept at 4°C was of 26.3 ± 10.9 μmol/L (95%CI: from 22.9 to 29.6); The difference between not refrigerated and refrigerated samples, after 180 min, was -1.4 ± 9.1 μmol/L (95% CI: from -4.2 - 1.3); p = n.s.
Conclusions. The ammonia levels increase in the blood samples related to the time from the drawing. There are no differences in the ammonia concentration afters 120 and 180 min between the samples stored at 4 and 25°C. Refrigeration do not prevent the integrity of the blood samples for this test and a timeliness transfer of the samples to the laboratory is mandatory for an accurate measurement of the ammonia.

Ricevuto: 22-02-2006 Accettato: 07-04-2006 Pubblicato on-line: 01-06-2006

Corrispondenza a: Dott. Davide Giavarina, Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo", Viale Rodolfi n. 37, 36100 Vicenza. Tel. 0444 753372, fax 0444 752501, e-mail: davide.giavarina@ulssvicenza.it

Introduzione

Nell'organismo umano gli ioni ammonio (NH_4^+) si formano dall'ammoniaca (NH_3) e vice versa, in una reazione di equilibrio NH_3 (gas) + $H_2O \leftrightarrow NH_4^+ + OH^-$. A pH 7.3 il 99% è nella forma NH_4^+. Con il termine ammoniemia si intende la somma totale di NH_3 e NH_4 presente nel sangue.

Nelle malattie epatiche, l'indicazione per la determinazione dei livelli di ammoniemia è rappresentata dall'encefalopatia porto-sistemica o dalla presenza di shunt di sangue venoso portale ricco di ammonio, o dalla combinazione di queste due condizioni.

Altre cause meno frequenti di iperammoniemia possono essere l'uremia, le infezioni del tratto urinario con stasi, la sindrome di Reye, alcuni errori congeniti del metabolismo compresi deficit enzimatici del ciclo dell'urea, la sindrome da iperornitinemia-iperammoniemia-ipercitrullinuria, la nutrizione parenterale, l'ureterosigmoidostomia, la terapia con sodio valproato[1].

È noto da molto tempo che le concentrazioni di questa molecola aumentano in vitro, dopo il prelievo. Tale aumento è determinato in via predominante dalle cellule del sangue, anche se un incremento più moderato è presente anche nel plasma[2]. I pazienti con patologie epatiche, cui più spesso viene richiesto questo esame, presentano velocità di incremento maggiori. Ciò può essere spiegato in parte dal fatto che questi pazienti hanno spesso elevati livelli di gamma-glutamintransferasi (γGT) che, per un aumento nell'idrolisi enzimatica della glutamina, determina un aumento dei livelli di ammonio nei campioni conservati a temperatura ambiente[3].

L'ipotesi enzimatica e studi precedenti hanno indicato e sostenuto una relazione inversa tra temperatura di conservazione del campione e l'incremento delle concentrazioni di ammonio. Un intervallo di 30-60 minuti a 4°C è generalmente ritenuto idoneo per la conservazione di campioni da soggetti "sani", un po' meno per i campioni da soggetti epatopatici[4].

Oggi, in realtà, molti laboratori ricevono campioni per la determinazione dell'ammonio anche con alcune ore di ritardo, rispetto al prelievo. Ciò è dovuto ad aspetti organizzativi, alla centralizzazione dei servizi di laboratorio con la decentralizzazione dei punti prelievo, al fatto che alcuni pazienti che necessitano di questo esame sono assistiti a domicilio, ecc. La stabilità del campione mediante refrigerazione risulta quindi un fattore molto importante. A nostra esperienza la refrigerazione è ritenuta dagli operatori sanitari sufficiente a garantire le qualità preanalitica per questo test ben oltre i tempi raccomandati in letteratura.

Scopo di questo lavoro è stato di valutare il mantenimento in vitro delle concentrazioni basali di ammonio per tempi prolungati, mediante refrigerazione.

Materiali e Metodi

I campioni sono stati raccolti tra le ore 7:00 e le 9:00, da soggetti a digiuno in posizione seduta; l'attività fisica prima del prelievo non è stata standardizzata. Il sangue è stato raccolto con ago vacutainer G21 in tre provette da 4,5 mL con anticoagulante litio-eparina (BD Vacutainer® PST™, Franklin Lakes, NJ, USA). Una provetta è stata processata immediatamente (entro 5 minuti dal prelievo); delle altre due una è stata posta immediatamente in frigorifero a 4°C, mentre l'altra è stata mantenuta a temperatura ambiente (25°C), entrambe fino al momento della seconda determinazione.

Sono stati comparati 19 campioni di soggetti adulti volontari, afferenti agli ambulatori del dipartimento, non epatopatici, al tempo zero (t0) e dopo 120 minuti (t120). Altri 43 campioni, raccolti con gli stessi criteri di selezione, sono stati valutati nello stesso modo a t0 e dopo 3 ore di conservazione (t180).

Le determinazioni di NH_4^+ sono state eseguite su autoanalizzatore ADVIA 1650 (Bayer, Terrytown, USA) con metodo enzimatico diretto (Bayer). Brevemente, l'ammonio si combina con α-chetoglutarato e NADPH che, in presenza di glutammato deidrogenasi (GLDH), produce glutammato e NADP+. La corrispondente diminuzione dell'assorbanza a 340 nm è proporzionale alla concentrazione di ammonio nel plasma.

$$\alpha\text{-chetoglutarato} + NH_3 + NADPH \xrightarrow{GLDH} \text{Glutammato} + NADP^+$$

Risultati

Nei 19 campioni comparati per una conservazione di due ore, a t0 la media delle concentrazioni è risultata di 47,2 μmol/L (intervallo di confidenza al 95%: 42,5 - 51,9; range 33 - 70), mentre a t120 refrigerato a 4°C era di 57,3 μmol/L (95% CI: 53,0 - 61,7; range 41 - 72). La differenza media era 10,1 μmol/L (95%CI: 7,1 - 13,1; range 0 - 21); $p < 0{,}0001$.

La media delle concentrazioni a t120 a 25°C era 57,7 μmol/L (95% CI: 53,9 a 61,6; range 44-77), con una differenza media rispetto a t120 a 4°C uguale a 0,4 μmol/L (95% CI: -1,3 - 2,1; range -6 - 10); p = n.s. (Fig. 1).

Nei 43 campioni comparati per una conservazione di tre ore, a t0 la media delle concentrazioni è risultata di 53,1 μmol/L (95% CI: 50,7 - 55,5; range 36 - 69), mentre a t180 refrigerato a 4°C era di 79,3 μmol/L (95% CI: 75,7 - 83,0; range 56 - 111). La differenza media era 26,3 μmol/L (95%CI: 22,9 - 29,6; range 9 - 62); $p < 0{,}0001$.

La media delle concentrazioni a t180 a 25°C era 77,9 μmol/L (95% CI: 74,3 - 81,6; range 52 - 105), con una differenza media rispetto a t180 a 4°C uguale a -1,4 μmol/L(95% CI: -4,2 - 1,3; range -33 - 21); p = n.s. (Fig. 2).

Discussione

È noto fin dal 1917 che le concentrazioni di ammo-

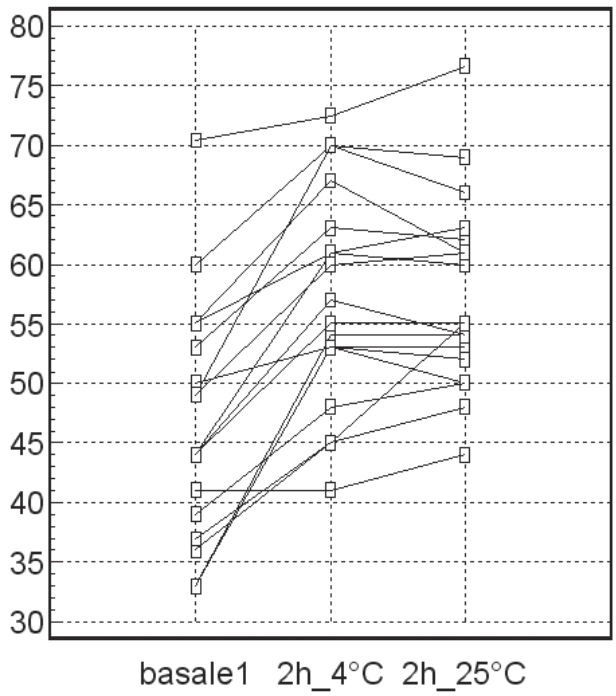

Figura 1: Livelli di ammonio nei 19 pazienti al tempo zero (basale 1) e dopo 2 h, conservati a 4 °C e a 25 °C. I livelli di ammonio sono espressi in μmol/L.

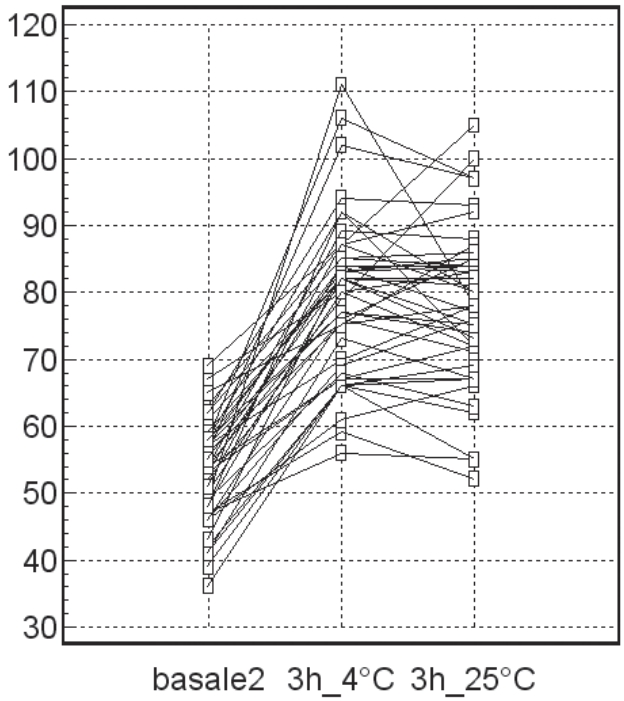

Figura 2: Livelli di ammonio e nei 43 pazienti al tempo zero (basale 1) e dopo 3 h, conservati a 4 °C e a 25 °C. I livelli di ammonio sono espressi in μmol/L.

nio nei campioni di sangue tendono ad aumentare in vitro dopo la raccolta del campione[5]. Dopo l'introduzione del sistema di dosaggio enzimatico specifico per l'ammoniemia, con NADPH come coenzima[6,7], sono stati pubblicati ulteriori dati sulla stabilità del campione in vitro[8]. In particolare, da Fonseca-Wollheim studiò gli aspetti preanalitici di questo test relativamente a tempo (fino a 90 minuti) e temperatura di conservazione (-38, 0, 20, 37°C)[9]. Le conclusioni di questo autore furono, in sintesi: le concentrazioni di ammonio aumentano in vitro sia in ragione del tempo che della temperatura; l'incremento della concentrazione di ammonio è funzione lineare rispetto al tempo; la refrigerazione rallenta, ma non blocca, questo incremento (salvo il congelamento del campione). Sebbene la sintesi conclusiva di questo lavoro fosse che poteva essere tollerato un intervallo di 15 minuti tra il prelievo e la centrifugazione, diveniva fondamentale mantenere il campione a 0°C per rallentare il fenomeno.

Una review del 1994 sulla determinazione dell'ammonio nei fluidi biologici recita: «Dopo la raccolta, le siringhe o le provette debbono essere messe immediatamente in un bagno di ghiaccio e trasportate al laboratorio per l'analisi; dopo l'arrivo in laboratorio i campioni debbono essere centrifugati immediatamente a 5-10°C per evitare l'emolisi»[4].

Lavori precedenti, che hanno affrontato le problematiche della fase preanalitica per questo test, hanno dimostrato come la refrigerazione potesse solamente rallentare il fenomeno dell'incremento in vitro, ma non bloccarlo; le raccomandazioni sono in genere molto stringenti, con un intervallo massimo di 30-60 minuti a 4°C per la conservazione di campioni da soggetti "sani", e di soli 15 minuti nei pazienti epatopatici, a causa della probabile iperattività della γGT[4].

Questi limiti sono molto ristretti e spesso non rispettabili in alcun modo: i reparti possono essere molto lontani dai laboratori; i sistemi di trasporto possono essere lenti e non prontamente disponibili; i laboratori a volte sono dislocati in altre aree geografiche, anche a chilometri di distanza; molti dei pazienti interessati a questo test sono in assistenza domiciliare. Anche i tempi di lavoro all'interno del laboratorio possono non garantire il processo dei campioni nei tempi richiesti.

Nella nostra esperienza, molti campioni per la determinazione dell'ammonio arrivano anche con 2 o 3 ore di ritardo rispetto al prelievo. Questo fatto è particolarmente evidente per i pazienti in assistenza domiciliare oppure per i pazienti che accedono ai servizi di prelievo presso i distretti sanitari. Questo lavoro si è quindi indirizzato a valutare l'idoneità di questi campioni rispetto ai tempi previsti. I risultati ottenuti dimostrano una completa inefficacia della refrigerazione nell'impedire l'aumento dei livelli di ammonio. I campioni conservati a 4 °C presentavano livelli talvolta anche superiori rispetto ai campioni conservati a 25 °C. La diversità di concentrazione tra campioni conservati a 4 e a 25 °C è inoltre indipendente dalla velocità di incremento rispetto al t0. L'incremento della concentrazione con il passare del tempo risulta essere abbastanza omogeneo tra diversi campioni, con alcune eccezioni, probabilmente dovute alle concentrazioni di γGT.

Ci si può chiedere come un test con tali problemi preanalitici mantenga un ruolo, anche decisionale, nel monitoraggio in pazienti "critici". Un'ipotesi possibile è che il test non venga utilizzato in termini assoluti, ma in comparazione a risultati precedenti. E' probabile infatti che il tempo intercorrente tra il prelievo e la consegna in laboratorio, per ciascun paziente, sia abbastanza costante. Si deve presupporre che la variabilità biologica dell'ammonio sia abbastanza ristretta (alto indice di individualità dell'analita)[10]. In realtà, non sono noti in letteratura dati relativi alla variabilità biologica dell'ammonio nel siero, mentre vi è un unico riferimento per l'ammonio nelle urine[11]. Per questo, i laboratori oggi non sono in grado di dare indicazioni in termini di differenza critica.

Una corretta determinazione dell'ammoniemia necessita di una esecuzione tempestiva, indipendentemente dalle temperature di trasporto dei campioni interi. Dove non sia possibile trasportare rapidamente il campione presso il laboratorio devono essere attivati sistemi alternativi di analisi e di valutazione clinica; dovrebbe anche essere valutata la possibilità di esecuzione del test al letto del paziente.

Bibliografia

1. Green A. When and how should we measure plasma ammonia? Ann Clin Biochem 1988; 25:199-209.
2. Forman DT, Garvin JT. Rapid determination of lead in urine by ion exchange. Clin Chem 1965; 11:1-9.
3. da Fonseca-Wollheim F. Deamidation of glutamine by increased plasma gamma-glutamyltransferase is a source of rapid ammonia formation in blood and plasma specimens. Clin Chem 1990; 36:1479-82.
4. Huizenga JR, Tangerman A, Gips CH. Determination of ammonia in biological fluids. Ann Clin Biochem 1994; 31:529-43.
5. Barnett GD. The microtitration of ammonia, with some observations on normal human blood. J Biol Chem 1917; 29:459-62.
6. da Fonseca-Wollheim F. Direct determination of plasma ammonia without deproteinisation. An improved enzymatic determination of plasma ammonia, II. Clin Chem Clin Biochem 1973; 11:426-31.
7. Rattliff CR, Hall FF. Ammonia in plasma, enzymatic procedure. Selected Methods Clin Chem 1982; 9:85-90.
8. Howanitz JH, Howanitz PJ, Skrodzki CA, Iwanski JA. Influences of specimen processing and storage conditions on results for plasma ammonia. Clin Chem 1984; 30:906-8.
9. da Fonseca-Wollheim F. Preanalytical increase of ammonia in blood specimens from healthy subjects. Clin Chem 1990; 36:1483-7.
10. Fraser CG. Biological Variation. From principles to practice. Washington: AACC Press; 2001.
11. Bingham SA, Williams R, Cole TJ, Price CP, Cummings JH. Reference values for analytes of 24-hour urine collections. Ann Clin Biochem 1988; 25:610-9.