

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Andreja LOČAN

**VPLIV POGOJEV HRANJENJA VZORCEV V
PREDANALITIČNI FAZI NA REZULTATE
MERJENJA SPECIFIČNIH PROTITELES IN
IMUNOGLOBULINOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Andreja LOČAN

**VPLIV POGOJEV HRANJENJA VZORCEV V PREDANALITIČNI
FAZI NA REZULTATE MERJENJA SPECIFIČNIH PROTITELES IN
IMUNOGLOBULINOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF THE SAMPLES PRESERVATION IN THE PRE-
ANALYTICAL PHASE ON MEASUREMENT RESULTS OF SPECIFIC
ANTIBODIES AND IMMUNOGLOBULINS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Miroslav Petrovec, za somentorico znan. svetnica dr. Branka Wraber in za recenzenta prof. dr. Alojz Ihan.

Mentor: prof. dr. Miroslav Petrovec

Somentorica: znan. svetnica dr. Branka Wraber

Recenzent: prof. dr. Alojz Ihan

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Miroslav Petrovec

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: znan. svetnica dr. Branka Wraber

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Alojz Ihan

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Ločan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61:57.083.3+616-097.3(043)=163.6 Imunoglobulini/IgG/IgM/IgE/ELISA/CLIA/nefelometrija/biološki
KG	vzorci/polna kri/predanalitična faza/odvzem krvi/zbiranje vzorca/transport/pogoji hranjenja/stabilnost protiteles/hemoliza
AV	LOČAN, Andreja
SA	PETROVEC, Miroslav (mentor)/ WRABER, Branka (somentorica)/ IHAN, Alojz (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2013
IN	VPLIV POGOJEV HRANJENJA VZORCEV V PREDANALITIČNI FAZI NA REZULTATE MERJENJA SPECIFIČNIH PROTITELES IN IMUNOGLOBULINOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 60 str., 15 pregl., 12 sl., 34 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	

Protitelesa so glikoproteini, ki specifično spoznajo in odstranijo antigene. Visoka specifičnost reakcij antigen-protitelo je omogočila razvoj različnih imunskih preskusov, ki jih lahko uporabimo za določevanje navzočnosti protiteles ali antigena. Taki preskusi so tudi bistvenega pomena za diagnozo bolezni, za spremljanje ravni humoralnega imunskega odziva in istovetenje biološko in medicinsko pomembnih molekul. Da so meritve zanesljive, morajo biti protitelesa v vzorcu stabilna. Kakovost dela v kliničnih laboratorijih zagotovijo z vzpostavitvijo celovitega sistema kakovosti, ki obsega predanalitično, analitično in poanalitično fazo. V predanalitični fazi se zgodi največ napak, ki lahko vplivajo na rezultate merjenja koncentracij protiteles, kar lahko privede do napačne razlage rezultatov. V diplomski nalogi smo želeli določiti stabilnost protiteles v polni krvi, hranjeni v epruvetah z rdečim zamaškom pri temperaturi 26 °C in stabilnost protiteles v serumu, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic in hranjen v isti epruveti z rumenim zamaškom pri temperaturi 4 °C.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.61:57.083.3+616-097.3(043)=163.6
Immunglobulins/IgG/IgM/IgE/ELISA/CLIA/nephelometry/biological
CX samples/whole blood/venipuncture/sample collection/transport/storage
conditions/stability of antibodies/hemolysis
AU LOČAN, Andreja
AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/ WRABER, Branka (co-advisor)/ IHAN,
Alojz (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme
in Microbiology
PY 2013
TI INFLUENCE OF THE SAMPLES PRESERVATION IN THE PRE-
ANALYTICAL PHASE ON MEASUREMENT RESULTS OF SPECIFIC
ANTIBODIES AND IMMUNOGLOBULINS
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 60 p., 15 tab., 12 fig., 34 ref.
LA sl
AL sl/en
AB

Antibodies are glycoproteins, which specifically recognize and eliminate antigens. The high specificity of antigen-antibody reactions has enabled the development of different immunoassays, which can be used for determining the presence of antibody or antigen. Such tests are essential for the diagnosis of disease, monitoring the level of humoral immune response and identification of biologically and medically important molecules. For the reliable measurements, antibodies in the sample have to be stable. The quality of work in clinical laboratories is achieved with establishment of quality assurance system which includes preanalytical, analytical and postanalytical phase. Most errors occur in preanalytical phase which can affect the results of the measurement of antibody concentrations, which may lead to misinterpretation of results. In this thesis, we wanted to determine the stability of antibodies in whole blood stored in tubes with red stopper at a temperature of 26 °C and stability of antibodies in the serum, which was separated by gel from blood cells and stored in the same tube with yellow stopper at 4 °C.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROTITELESA.....	3
2.1.1 Protitelesa IgG	4
2.1.2 Protitelesa IgM.....	5
2.1.3 Protitelesa IgE.....	6
2.2 METODE MERJENJA PROTITELES	6
2.2.1 ELISA	7
2.2.2 CLIA	7
2.2.4 Nefelometrija.....	7
2.3 VPLIV PREDANALITIČNE FAZE NA MERJENJE PROTITELES	8
2.3.1 Priprava bolnika pred odvzemom vzorca	8
2.3.2 Odvzem in zbiranje vzorca	8
2.3.2.1 Epruvete za vakuumski odvzem venske krvi	9
2.3.2.1.1 Epruvete za vakuumski odvzem krvi z gelom za testiranje seruma.....	10
2.3.3 Transport vzorca	11
2.3.4 Sprejem in priprava biološkega materiala za analizo.....	11
2.3.4.1 Sprejem vzorca	11
2.3.4.1 Hemoliziran vzorec.....	12
2.3.4.2 Priprava vzorca za testiranje.....	13
2.3.5 Shranjevanje vzorcev	14
2.4 STABILNOST PROTITELES	14
2.4.1 Stabilnost protiteles v krvnih vzorcih.....	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 EPRUVETE ZA VAKUUMSKI ODVZEM KRVI	17
3.2 VZORCI	18
3.2.2 Priprava serumskih vzorcev za analizo	19
3.2.2.1 Priprava vzorcev, čas hranjenja polne krvi 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h.....	20
3.2 METODE	20
3.2.1 Merjenje specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk s sistemom Liaison	22
3.2.2 Merjenje specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk, proizvajalec Siemens	23
3.2.3 Merjenje specifičnih protiteles IgG proti <i>Candida</i> spp. z analizatorjem	23
ImmunoCAP 100	23
3.2.4 Merjenje spec. protiteles IgE proti <i>Phleum pratense</i> z analizatorjem	24
ImmunoCAP 100	24
3.2.5 Merjenje imunoglobulinov razreda IgG in IgM s sistemom BN ProSpec®.....	25
3.2.6 Merjenje imunoglobulinov razreda IgE s sistemom BN ProSpec®.....	25
3.2.7 Merjenje streptokoknih ADNaza B protiteles	26

3.2.8	Merjenje protiteles IgG usmerjenih proti tetanusnem toksinu	26
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	27
4	REZULTATI.....	28
4.1	VZORCI V EPRUVETAH Z RDEČIM ZAMAŠKOM, HRANJENI PRI TEMPERATURI 26 °C	29
4.2	VZORCI V EPRUVETAH Z RUMENIM ZAMAŠKOM Z GELOM, HRANJENI PRI TEMPERATURI 4 °C.....	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1	VZORCI V EPRUVETAH Z RDEČIM ZAMAŠKOM BREZ GELA, HRANJENI PRI TEMPERATURI 26 °C.....	39
5.2	VZORCI V EPRUVETAH Z RUMENIM ZAMAŠKOM Z GELOM, HRANJENI PRI TEMPERATURI 4 °C.....	41
5.3	SKLEPI.....	43
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI	46
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Navodila za odvzem vzorcev za merjenje protiteles glede na vrsto vzorca(IMI, 2012).....	9
Preglednica 2: Uporaba vakuumskih epruвет glede na vrsto dodatka in s tem povezana barva zamaška (Guder in sod., 2003)	10
Preglednica 3: Stabilnost protiteles v telesu, polni krvi in serumu (WHO, 2002).....	15
Preglednica 4: Stabilnost protiteles v serumu pri sobni temperaturi, 4 °C in 30 °C.....	15
Preglednica 5: Lastnosti in opis epruветe s serijsko številko 367953(BD, 2012).....	17
Preglednica 6: Lastnosti in opis epruветe s serijsko številko 369032 (BD, 2012).....	18
Preglednica 7: Dodatni testi na vzorcih posameznega darovalca polne krvi.....	21
Preglednica 8: Oznaka vzorcev glede na osebo in merjeno protitelo	21
Preglednica 9: Vizualni pregled serumov na hemolizo po ločitvi od krvnih celic glede na čas hranjenja polne krvi v epruветah z rdečim zamaškom.	28
Preglednica 10: Prikaz izmerjenih vrednosti specifičnih in celokupnih protiteles v v polni krvi, hranjeni v epruветah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C in izračuni njihovih indeksov (< 3 h = 1)	30
Preglednica 11: Vrednosti statističnih parametrov indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruветah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C.....	32
Preglednica12: Rezultati T-testa indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruветah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C	33
Preglednica 13: Prikaz izmerjenih vrednosti specifičnih in celokupnih protiteles v polni krvi, hranjeni v epruветah z rumenim zamaškom, pri temperaturi 4 °C in izračuni njihovih indeksov (< 3 h = 1)	35
Preglednica 14: Vrednosti statističnih parametrov indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruветah z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi 4 °C.....	37
Preglednica 15: Rezultati T-testa indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruветah z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi 4 °C	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba imunoglobulina (Racaniello, 2012).....	3
Slika 2: Zgradba imunoglobulina IgM (Vozelj, 2000)	5
Slika 3: Epruvete za vakuumski odvzem (Guder in sod., 2003).....	10
Slika 4: Stopnje hemolize (Guder in sod., 2003)	12
Slika 5: Epruveta s serijsko številko 367953 (BD, 2012).....	17
Slika 6: Epruveta s serijsko številko 369032 (BD, 2012).....	18
Slika 7: Odvzem venske krvi in priprava serumskih vzorcev posameznega darovalca.	19
Slika 8: Princip merjenja specifičnih protiteles IgE s testnim kompletom ImmunoCAP® Specific IgE (Johansson, 2004).	24
Slika 9: Indeksi (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rdečim zamaškom, pri 26 °C. Okvirji z ročaji izrisani s programom SPSS.....	29
Slika 10: Prikaz standardnih napak in vrednosti aritmetičnih sredin indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rdečim zamaškom, brez gela, pri temperaturi 26 °C	32
Slika 11: Indeksi (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rumenim zamaškom z gelom, pri 4 °C. Okvirji z ročaji izrisani s programom SPSS.	34
Slika 12: Prikaz standardnih napak in vrednosti aritmetičnih sredin indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi 4 °C.....	37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo
ADNAza	antideoksiribonukleaza
Ag	antigen
CDR	komplementarnost določujoča regija
C _H	konstantna regija težke verige protiteles
C _L	konstantna regija lahke verige protiteles
CLIA	kemiluminiscenčna encimska metoda
DNAza	deoksiribonukleaza
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	Encimsko imunski test (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
Ig	imunoglobulin
ISO	International Organisation of Standardization
KV %	koeficient variacije
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
RID	radialna imunodifuzija
RNA	ribonukleinska kislina
SD	standardni odklon
SE	standardna napaka
Spp.	podvrsta
S-S	disulfidni mostiček
V _I	variabilna regija lahke verige protiteles
V _H	variabilna regija težke verige protiteles
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organisation)

1 UVOD

Imunski sistem obsega specializirane celice in molekule, njihovo skupno in usklajeno delovanje ob vdoru tujka pa imenujemo imunski odziv. Gostiteljev imunski sistem se deli na naravno imunost in pridobljeno imunost. Naravna imunost vključje genetske dejavnike, anatomske in mehanske ovire, nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin, fagocitozo in znotrajcelično uničenje mikroorganizmov, različne efektorske mehanizme kot sta npr. komplementni sistem in interferon. Ker mehanizmi naravne odpornosti velikokrat niso bili dovolj učinkoviti proti nekaterim patogenim mikroorganizmom, so vretenčarji v evoluciji razvili še pridobljene ali specifične imunske mehanizme. Zanje je značilno specifično spoznanje mikroba ali tuje snovi, nastanek protiteles, efektorskih celic in imunski spomin. Na podlagi sestavin imunskega sistema, ki posredujejo odziv, razdelimo specifične imunske odzive v dve obliki in sicer na humoralno imunost in celično posredovano imunost. Celično posredovano imunost posredujejo limfociti T, humoralno imunost pa protitelesa, ki specifično spoznajo in odstranijo antigen (Vozelj, 2000).

Visoka specifičnost reakcij antigen-protitelo je omogočila razvoj različnih imunskih preskusov, ki jih lahko uporabimo za določevanje navzočnosti protiteles ali antigena. Taki preskusi so tudi bistvenega pomena za diagnozo bolezni, za spremljanje ravni humoralnega imunskega odziva in istovetenje biološko in medicinsko pomembnih molekul. Ti preskusi se razlikujejo po hitrosti izvedbe in po občutljivosti. Nekateri so samo kvalitativni, drugi pa kvantitativni.

Klinični laboratoriji, ki izvajajo serološke teste z namenom pridobiti podatke za postavitve diagnoze, zdravljenje ali oceno zdravstvenega stanja preiskovanca, morajo v čim večji meri zagotoviti pristnost rezultatov laboratorijskih testov. Kakovost dela v kliničnih laboratorijih zagotovijo z vzpostavitvijo celovitega sistema kakovosti, ki obsega predanalitično, analitično in poanalitično fazo. V predanalitični fazi se zgodi največ napak, do 70 % vseh laboratorijskih napak (Llopis in sod., 2011). V to fazo spadajo vsi postopki, od same zahteve zdravnika po laboratorijskem testu, do končne priprave vzorca na testiranje. Glavni procesi, ki jih vključujemo v predanalitično fazo so: izbor testa, priprava

pacienta na testiranje, zbiranje vzorca, transport vzorca, obdelava vzorca in shranjevanje vzorca (LLopis in sod., 2011).

1.1 NAMEN DELA

Standard NCCLS H18-A3 priporoča, da je potrebno serum ali plazmo ločiti od krvnih celic najhitreje, kolikor je to mogoče, razen v primerih, kadar so študije pokazale, da podaljšan stik seruma ali plazme s krvnimi celicami nima vpliva na rezultate merjenja analita. Ker o stabilnosti protiteles v polni krvi ni bilo narejenih veliko študij, smo se odločili, da preverimo, v kolikšem času je stik seruma s krvnim strdkom pri temperaturi 26 °C še primeren za merjenje protiteles. Preverili smo tudi stabilnost protiteles v serumu, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic in hranjen v isti epruveti pri temperaturi 4 °C. Te dve študiji smo naredili z namenom, da ne bi po nepotrebnem zavrnili še primernih vzorcev polne krvi za testiranje protiteles, katerih transport do laboratorija je daljši kot dve uri (NCCLS H18-A3, 2004).

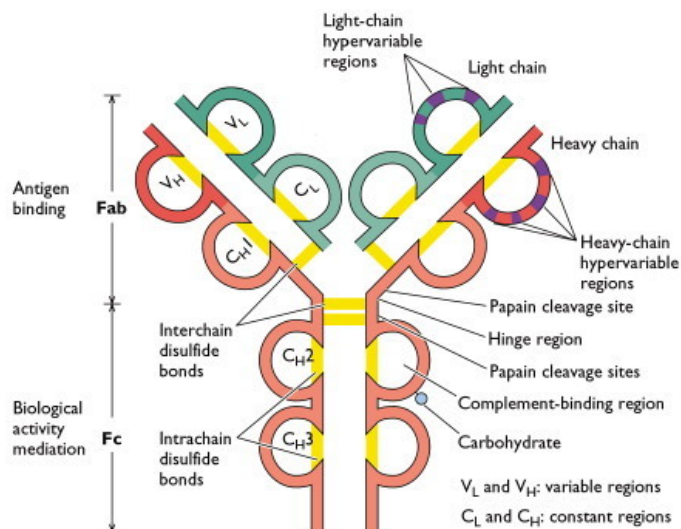
1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 120 ur, pri temperaturi 26 °C, je še primeren za zanesljivo merjenje protiteles.
- Serum, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic 168 ur in hranjen v isti epruveti pri temperaturi 4 °C, je še primeren za zanesljivo merjenje protiteles.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTITELESA

Humoralno imunost posredujejo glikoproteini, ki specifično spoznajo in odstranijo antigene. Imenujemo jih protitelesa (okr. Ab od *angl. antibody*) ali imunoglobulini (okr. Ig), kar pomeni nosilec imunosti v globulinski frakciji seruma (Vozelj, 2000). Prisotni so na površini limfocitov B, kjer so receptorji za specifične antigene in kot prosta protitelesa, ki jih izločajo plazmatke. Imunoglobuline najdemo v krvi, v limfni tekočini in drugih telesnih tekočinah. Predel molekule Fab se veže z antigenom, medtem ko ima drugi del molekule efektorsko funkcijo (Fc regija). Učinkujejo lahko na več načinov: nevtralizirajo bakterijske toksine, preprečujejo prehajanje virusov v celice, aktivirajo komplement, vežejo se na različne celice imunskega sistema in fagocite (Roitt in sod.,1998).



Slika 1: Zgradba imunoglobulina (Racaniello, 2012)

Imunoglobulini se sintetizirajo v limfocitih B. Sestavljeni so iz štirih polipeptidnih verig; dveh identičnih težkih in dveh identičnih lahkih verig. Verige so razporejene v obliki črke Y in so med seboj kovalentno povezane z disulfidnimi mostički in nekovalentnimi vezmi (slika 1). Molekulska masa lahkih verig je približno 23.000 Da in ne vsebujejo nobenih oligosaharidov (Kabat, 1976), medtem ko je molekulska masa težkih verig približno 50.000–70.000 Da. Vse protitelesne lahke verige so ali izotipa lambda – λ ali kapa – κ . Pri težkih verigah poznamo pet izotipov (alfa – α , delta – δ , epsilon – ϵ , gama – γ in mi – μ).

Izotip težke verige določa razred (podrazred) imunoglobulinov. Poznamo protitelesa razreda α – imunoglobulini A, δ – imunoglobulini D, ϵ – imunoglobulini E, γ – imunoglobulini G, μ – imunoglobulini M. Med seboj se razlikujejo po velikosti, deloma tudi po zgradbi in po vlogi, ki jo imajo v imunskem sistemu. Vsaka veriga (lahka in težka) je sestavljena iz linearno ponavljajočih se podobnih (homolognih, vendar ne istovetnih) globularno kompaktnih segmentov iz približno 110 aminokislin (domen). V vsakem segmentu je prisotna ena S-S vez. Aminoterminalni segmenti lahke in težke verige so zelo variabilni, če jih primerjamo z veliko bolj ohranjenimi konstantnimi. Variabilne segmente označimo z V in konstantne s C. Tako imajo lahke verige en variabilen segment (V_L) in en konstantni segment (C_L). Največja variabilnost lahkih verig je v treh kratkih odsekih in jo označujemo s hipervariabilno regijo ali komplementarnost določujočo regijo (CDR). Težke verige imajo en variabilen segment (V_H) in tri konstantne segmente (C_H). Tudi težke verige imajo CDR regijo v treh kratkih odsekih (Vozelj, 2000). Zvitje V_L in V_H poteka tako, da se deli CDR izpostavijo in zblížajo ter predstavljajo vezišče za antigene (Roitt in sod., 1998). Protitelesa se z antigenom vežejo preko nekovalentnih vezi (vodikove vezi, ionske vezi, hidrofobne interakcije in van der Waalsove sile). Ker je jakost teh interakcij šibka (v primerjavi s kovalentnimi vezmi), so potrebne številne interakcije in tesen stik, da nastane močna vez antigen-protitelo (Ag-Ab). Jakost vezi med veziščem na antigenu (epitop) in hipervariabilno regijo protitesne molekule (paratop) imenujemo afiniteta protiteles. Paratopi prepoznajo celotno trodimenzionalno strukturo epitopov. Razlikujejo že majhne spremembe v aminokislinskih zaporedjih antigenov, naboj, optične konfiguracije in sterične konformacije. Posledica tega je, da se protitelesa vežejo le na tiste antigene, s katerimi se najbolj skladajo. To je razlog za visoko specifičnost protiteles (Roitt in sod., 1998). Torej so specifična zaradi tega, ker so usmerjena proti točno določeni snovi.

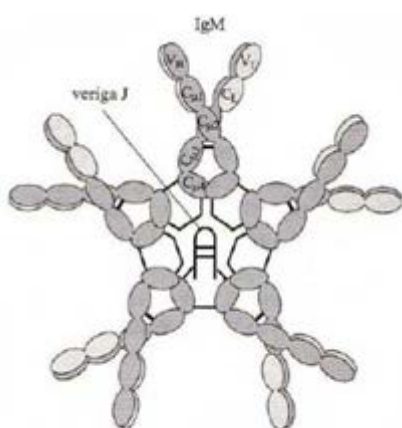
2.1.1 Protitelesa IgG

Imunoglobulini IgG so monomerne molekule, sestavljene iz dveh lahkih verig in dveh težkih verig γ . Vsaka molekula ima dve vezišči, ki sta gibljivo pritrjeni na Fc del molekule, tako da lahko molekula zavzame obliko črke T ali Y. V tem razredu so štiri podrazredi IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4. Med seboj se razlikujejo po številu S-S vezi v gibljivem delu molekule. Protitelesa IgG nastanejo pri naravni okužbi ali pri cepljenju z virusi,

bakterijami ali njihovimi produkti. Zavzemajo približno 75 % vseh serumskih imunoglobulinov (Kabat, 1976). Ta protitelesa so približno enakomerno porazdeljena v krvi in krvnih tekočinah. Imajo enkratno lastnost, da lahko prehajajo skozi placento in dajejo otroku zaščito pred okužbo v prvih tednih življenja, dokler ne začne izdelovati lastnih protiteles. To omogoči vezanje Fc regije na specifični receptor za Fc γ na humani placentalni sincicijski trofoblast. Po vezavi z antigenom lahko protitelesa IgG aktivirajo komplement. Podrazredi IgG imajo različne zmožnosti aktiviranja komplementa. Lahko nevtralizirajo toksine ali pospešijo postopek fagocitoze. Na tak način imunski sistem ubija številne gramnegativne bakterije in nekatere viruse, ne pa grampozitivnih bakterij (Vozelj, 2000).

2.1.2 Protitelesa IgM

Imunoglobulin IgM je sestavljen iz petih osnovnih monomernih enot protiteles (dve lahki in dve težki verigi) in dodatne J (*joining*) verige. Enote so med seboj povezane z S-S vezmi med cisteinskimi radikali blizu gibljivega mesta v težki verigi. Molekulska masa celotnega proteina je približno 900 kDa. Ker je IgM pentamer, ima 10 vezišč za antigene. Pri antigenih z veliko molekulsko maso pride do prostorske stiske, zato zasledimo nekoliko nižjo valenco.



Slika 2: Zgradba imunoglobulina IgM (Vozelj, 2000)

Protitelesa IgM nastanejo pri skoraj vseh imunskih odzivih ter imajo glavno vlogo pri primarnem imunskem odzivu (prvi stik posameznika z eksogenim antigenom). Pri primarnem imunskem odzivu jih odkrijemo prej in več kot protiteles IgG. Spadajo med naravna protitelesa, saj so navzoča v serumu zdravih ljudi, ki so nastala brez znane imunizacije. Študije so pokazale, da so naravna protitelesa IgM polireaktivna, torej se lahko vežejo z dvema ali več različnimi antigeni. Ob stiku z antigenom lahko že ena pritrjena molekula aktivira komplement. Pospešujejo tudi opsonizacijo in fagocitozo (Vozelj, 2000).

2.1.3 Protitelesa IgE

Imunoglobulin IgE je sestavljen iz dveh lahkih in dveh težkih verig ϵ . Njegova molekulska masa je 190 kDa in vsebuje veliko ogljikovih hidratov. Zavzema samo 0,004 % vseh serumskih proteinov (Ishizaka in sod., 1970). Je občutljiv na toploto in se inaktivira pri 50 °C. Mastociti in bazofilci imajo na svoji površini receptorje IgE_{RI}, ki imajo močno afiniteto do vezave Fc dela molekule IgE. Zaradi njihove močne afinitete so receptorji IgE_{RI} zasedeni z monomernimi IgE tudi v odsotnosti antigena. Vnos specifičnega antigena povzroči agregacijo molekule IgE in receptorja. Nastanek take gruče povzroči sprostitve vnetnih in vazoaktivnih mediatorjev iz mastocitov in bazofilcev. Posledica teh mediatorjev (histamina in drugih primarnih mediatorjev z IgE posredovane alergijske reakcije) je odziv žilja in vnetje, kar imenujemo z IgE posredovana alergijska preobčutljivost oz. preobčutljivost tipa I po Gellu in Coombsu. Raven IgE se v serumu močno poviša tudi pri okužbah s paraziti (posebno s helminti), kar kaže na zaščitno vlogo IgE *in vivo* pred paraziti (Vozelj, 2000).

2.2 METODE MERJENJA PROTITELES

Razvoj različnih imunskih preskusov, ki jih lahko uporabimo za določevanje navzočnosti protiteles ali antigenov, je omogočila izvrstna specifičnost vezave med protitelesom in antigenom.

2.2.1 ELISA

Encimsko imunski test (okr. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) je test, s katerim lahko kvalitativno ali kvantitativno določimo protitelesa ali antigene. Princip metode je, da encim, konjugiran s protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Pri ELISA uporabljamo različne encime, npr. peroksidazo, alkalno fosfatazo in p-nitrofenil fosfatazo, ki s substratom dajo obarvan produkt, katerega intenziteto lahko merimo. Za kvantitativno določitev protiteles/antigenov potrebujemo umeritveno krivuljo znanih koncentracij protiteles/antigenov. Protitelesa v serumu ali kakem drugem vzorcu določamo z indirektnim ELISA testom, kjer je antigen vezan na trdni nosilec. Nanj se specifično veže primarno protitelo. Na primarno protitelo pa se veže sekundarno protitelo, ki je označeno z encimom. Po dodatku substrata se pojavi obarvanje, katerega merimo (Vozelj, 2000).

2.2.2 CLIA

Kemiluminiscenčna imunska metoda (okr. chemiluminescence immunoassay, CLIA) je metoda, ki je v osnovi zelo podobna encimsko imunskemu testu (ELISA). Protitelo se veže na antigen, ki je vezan na magnetne kroglice. Vezana protitelesa dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, ki so konjugirana z izoluminolnim derivatom, in so usmerjena proti človeškim protitelesom. Izoluminol iz osnovnega energijskega stanja spravimo v stanje povečane energije z dodajanjem peroksidaze, ki pretvori peroksid v vodo in posledično povzroči oksidacijo izoluminola. Vzpodbujevalni reagent torej vsebuje encim peroksidazo in peroksid. Preko intermedijatorjev prehaja izoluminol v osnovno obliko, pri čemer pa oddaja svetlobo v obliki kemiluminiscence, katero merimo. Poleg izoluminola je lahko označevalec še luciferin (DiaSorin, 2008).

2.2.4 Nefelometrija

Nefelometrija je postopek, pri katerem določimo koncentracijo antigena v suspenziji s spuščanjem snopov žarkov usmerjenih skozi suspenzijo. Merimo intenzivnost sipane svetlobe pod kotom 70 °C glede na vpadno svetlobo. S specifičnim antiserumom (očiščen

in optično čist) proti točno določenim antigenom povzročimo tvorbo precipitata (značilnost reakcije med Ab in Ag). Posledica je sipanje svetlobe vpadnega žarka, ki ga merimo. Meritev je natančna samo takrat, kadar je razmerje med koncentracijo antigena in optično gostoto linearno, zato je potrebno raztopine z veliko koncentracijo antigena primerno razredčiti (Vozelj, 2000).

2.3 VPLIV PREDANALITIČNE FAZE NA MERJENJE PROTITELES

Predanalitična faza vključuje vrsto postopkov, ki jih je težko opredeliti, saj poteka na različnih krajih in ob različnih časovnih intervalih. Splošno je predanalitična faza definirana kot faza, v katero spadajo vsi postopki, od same zahteve zdravnika po laboratorijskem testu, do končne priprave vzorca na testiranje. Glavni procesi, ki jih vključujemo v predanalitično fazo so: izbor testa, priprava pacienta na testiranje, zbiranje vzorca, transport vzorca, obdelava vzorca, shranjevanje vzorca. V to fazo uvrščamo tudi študijo značilnosti in bioloških sprememb posameznih bolnikov za vsak laboratorijski test posebej (LLopis in sod., 2011).

2.3.1 Priprava bolnika pred odvzemom vzorca

Priprava bolnika na odvzem vzorca je odvisna od izbire testa in testiranega analita. Za odvzem krvnih vzorcev veljajo splošna priporočila, da naj pacient dan pred odvzemom vzorca uživa normalno hrano, omeji količine alkohola, kave in cigaret. Zaželeno je, da pacient 12 ur pred odvzemom uživa samo vodo (Guder in sod., 2003).

Za merjenje protiteles v serumu ni podanih posebnih navodil, kako se bolnik pripravi na odvzem vzorca.

2.3.2 Odvzem in zbiranje vzorca

Biološki material odvzame za to usposobljena oseba v skladu s priporočenimi postopki. Med najpogostejši biološki material spadajo krvni vzorci. Sem štejemo vensko, arterijsko in kapilarno kri. Kadar je za odvzem venske krvi potrebnih več različnih vrst vakuumskih epruvet, je priporočljivo upoštevati naslednji vrstni red odvzema: najprej epruveta brez

odatkov, potem z dodatkom citrata, z dodatkom heparina, z EDTA in na koncu z glikolitičnimi inhibitorji (Guder in sod., 2003).

Standard ISO 15189 (2007) predpisuje, da mora imeti vsak medicinsko diagnostični laboratorij protokol za primarno zbiranje vzorcev. Protokol mora biti del dokumentacije kontrole kakovosti in mora vsebovati navodila za identifikacijo in sledljivost bolnikovega vzorca, postopke za zbiranje primarnih vzorcev, opis ustreznih zbiralnih posod, potrebnih dodatkov, tip in volumen primarnega vzorca, ki bo odvzet, čas v dnevu, primeren za odvzem vzorca, položaj bolnika ter navodila za varno odstranjevanje materialov, ki so bili uporabljeni med odvzemom vzorca.

Navodila za odvzem in zbiranje vzorcev za meritve protiteles Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so navedena v preglednici 1.

Preglednica 1: Navodila za odvzem vzorcev za merjenje protiteles glede na vrsto vzorca (IMI, 2012)

vrsta vzorca	navodila za odvzem	količina vzorca
kri brez antikoagulanta	Odvzem iz periferne vene v epruveto za vakuumski odvzem brez antikoagulanta.	3–5 ml
kri, venska z EDTA	Odvzem iz periferne vene v epruveto za vakuumski odvzem z EDTA.	3–5 ml
serum	Odvzem iz periferne vene v epruveto za vakuumski odvzem brez antikoagulanta, koagulacija 1 h pri ST, centrifugiranje 5 min pri 3000 obr./min, serum odpipetiramo v novo sterilno epruveto z navojem.	≥ 1 ml
plazma	Odvzem iz periferne vene v epruveto za vakuumski odvzem z EDTA, epruveto 3-krat obrnemo, centrifugiranje 5 min. pri 3000 obr./min, plazmo odpipetiramo v novo sterilno epruveto z navojem.	≥ 1 ml

2.3.2.1 Epruvete za vakuumski odvzem venske krvi

Epruvete za vakuumski odvzem krvi so sterilne, iz steklenega ali plastičnega materiala in pokrite z vakuumskim zamaškom. Vakuum znotraj epruvete omogoči odtekanje krvi v njeno notranjost (BD, 2012). Epruvete lahko vsebujejo antikoagulantna sredstva ali aktivatorje koagulacije. Glede na vrsto dodatka je predpisana barva zamaška, kar omogoča

lažjo in hitrejšo prepoznavo primerne epruvete za odvzem krvi. Ta sistem kodiranja je še posebej uporaben, kadar je za odvzem venske krvi potrebnih več različnih vrst vakuumskih epruvet. Sistem kodiranja epruvet z zamaški natančno opisuje ISO 6710 (Guder in sod. 2003), in so opisani v preglednici 2. Epruvete za vakuumski odvzem se uporabljajo za odvzem krvi, transport in pripravo vzorca, za testiranje seruma, plazme ali polne krvi.



Slika 3: Epruvete za vakuumski odvzem (Guder in sod., 2003)

Preglednica 2: Uporaba vakuumskih epruvet glede na vrsto dodatka in s tem povezana barva zamaška (Guder in sod., 2003)

epruveta	uporaba	barva zamaška /črkovna koda
brez dodatkov ali s pospeševalci strjevanja krvi	klinična kemija in serologija	rdeča /Z
heparin	kemijske preiskave plazme	zelena/LH ali NH
K2- ali K3-EDTA	hematološke preiskave	vijolična /K2E ali K3E
Na-citrat	koagulacijski testi	svetlo modra/9NC
Na-flourid	merjenje krvnega sladkorja	siva/ FX

2.3.2.1.1 Epruvete za vakuumski odvzem krvi z gelom za testiranje seruma

Epruveta za vakuumski odvzem venske krvi z gelom je tako kot epruveta za vakuumski odvzem z rdečim zamaškom brez dodatkov proti strjevanju krvi. Vsebuje pa lahko pospeševalce strjevanja krvi. Zamašek epruvete je rumene barve.

Funkcija gela je zagotoviti fizično in kemično pregrado med serumom in celicami. Gel ima toksotropne lastnosti, kar omogoča, da je ob normalnih pogojih viskozen, kadar pa nanj pri centrifugiranju deluje centrifugalna sila, se njegova viskoznost zmanjša, gel se premika ali pretaka. Po končanem centrifugiranju gel spet postane nepremična ovira med serumom in celicami. Gel je ponavadi sestavljen iz več kot ene sestavine. Lahko je sestavljen iz primarne organske faze (smole), anorganske faze in mrežnega stabilizatorja. Anorganska

faza je potrebna za prilagoditev gostote gela, tako da je gel med gostoto seruma in gostoto celic. Za združitev organske in anorganske faze so potrebni še kemični stabilizatorji. Zaradi narave gela je potrebno upoštevati rok trajanja epruvete (Bush in Cohen, 2009).

2.3.3 Transport vzorca

Vzorec lahko do laboratorija prispe na različne načine: preko kurirja, po pošti in preko pnevmatsko iztrelitvenih cevni sistemov. Čas transporta je ponavadi kratek, kadar je laboratorij blizu ali v kliniki. Priporočljivo je, da od odvzema krvi do centrifugiranja ne preteče več kot ena ura. Kadar mora vzorec prepotovati daljšo razdaljo (po pošti ali preko kurirja), je priporočljivo, da tip vzorca ni polna kri (Guder in sod., 2003).

Prevoz vzorca iz mesta odvzema do kliničnega laboratorija mora izpolnjevati določene zahteve, ki zagotavljajo stabilnost vzorca. Pogoji in zahteve morajo biti zapisani v laboratorijskem protokolu za transport vzorcev. Glavne spremenljivke, ki jih je potrebno upoštevati med prevozom so agitacija, izpostavljenost svetlobi, temperatura, čas transporta, namestitvev vzorca v prenosnem zabojniku, vrsta prenosne embalaže in primerna označitev. Poleg protokola bi laboratorij moral imeti zapisana še navodila, v katerih primerih se vzorca ne sprejme, če pogoji transporta niso bili primerni. Najmanj na kar mora biti laboratorij pozoren pri transportu vzorcev so temperatura, embalaža in čas, ki preteče od odvzema vzorca do prihoda v laboratorij. Trenutni problem pri kontroli transporta vzorcev je postavitvev jasno določenih mej stabilnosti vzorca in spremljanje nihanja temperature med transportom (LLopis in sod., 2011).

2.3.4 Sprejem in priprava biološkega materiala za analizo

2.3.4.1 Sprejem vzorca

Osebjem ob sprejemu primarnega vzorca v laboratorij le-tega vizualno pregleda, zabeleži in pripravi na analizo. Če je vzorec neustrezen, ga mora laboratorij zavrniti. Vzorec, ki je na robu meje veljavnosti, je potrebno zabeležiti in naravo problema opisati v končnem poročilu. Potrebna je tudi previdnost pri razlagi rezultatov.

2.3.4.1 Hemoliziran vzorec

Druga najpogostejša napaka v predanalitični fazi je sprejem hemoliziranega vzorca (Rioja in sod., 2009). Hemoliza je definirana kot sproščanje hemoglobina in znotrajceličnih komponent iz eritrocitov v serum ali plazmo (Lippi in sod., 2008). Pojavi se takrat, ko je koncentracija prostega hemoglobina v serumu ali plazmi več kot 0,3g/l. Od koncentracije hemoglobina v serumu ali plazmi je odvisna tudi intenziteta barve. Najpogosteje stopnjo hemolize vzorca opredelimo vizualno in sicer kot rahla, srednja in močna hemoliza. Na sliki 4 vidimo, da v prvi epruveti hemoliza ni prisotna, sledi ji rahla, srednja in močna hemoliza.



Slika 4: Stopnje hemolize (Guder in sod., 2003)

Hemoliziran vzorec vpliva na različne načine na rezultate laboratorijskih testov, odvisno od analitične metode in analita (Lippi in sod., 2008), zato mora imeti vsak laboratorij napisan protokol, kako ravna s hemoliziranimi vzorci.

Glavni razlogi za nastanek hemoliziranih vzorcev so navedeni od najbolj do najmanj pogostega dejavnika (Rioja in sod., 2009):

- Debelina igle za odvzem. Ožja igla za odvzem krvi poveča hitrost pretoka, kar vodi do trenja, ki povzroča hemolizo. Stopnja hemolize je obratno sorazmerna s premerom igle.
- Vakuumski odvzem krvi. Hemoliza lahko nastane zaradi trenja v igli zaradi prekomernega vleka na bat brizge, v času pridobivanja krvi.

- Mesto vboda. Sprednja komolčna kotanja je mesto odvzema z najmanj hemolize (Hawkins, 2010).
- Antiseptična sredstva. Nepopolno izhlapelo razkužilo lahko povzroči hemolizo
- Uporaba preveze za odvzem krvi, ki traja več kot eno minut, so povezane z večjim tveganjem za hemolizo (Saleem in sod., 2007).
- Travmatičen odvzem krvi. Hematom lahko kontaminira kri s sprostitvijo hemoglobina iz tkiva. Težave pri iskanju vene z večkratnim vbodom ali njenim natrganjem.
- Tip epruвет. Epruvete z večjim volumnom povzročajo večjo hemolizo.
- Nezdostno napolnjene vakuumske epruvete so bolj izpostavljene hemolizi, še posebej med transportom in centrifugiranjem.
- Pretirano ali nezadostno mešanje (dodatki za ali proti strjevanju krvi).
- Izkušnost osebja, ki opravlja odvzem krvi.

Laboratorij mora pri analizi hemoliziranih vzorcev upoštevati, da je približno 3 % *in vitro* vzorcev hemoliziranih (Carraro in sod., 2000). Za vsako metodo mora biti napisan protokol, kako hemoliza vpliva na rezultate merjenja. Kljub temu pa mora laboratorij zavrniti tiste hemolizirane vzorce, ki bi lahko privedli do napačnih rezultatov .

2.3.4.2 Priprava vzorca za testiranje

V nekaterih primerih primarnega vzorca ni mogoče neposredno uporabiti v analitični fazi, zato ga je potrebno obdelati. Med obdelavo vzorca uvrščamo centrifugiranje, alikvotiranje in zamrzitev vzorca pred analizo (LLopis in sod., 2011).

Kadar testiramo protitelesa v serumu, je potrebno epruveto s polno krvjo pustiti v pokončnem položaju eno uro pri sobni temperaturi, da poteče spontana koagulacija. Primarni vzorec se nato centrifugira 5 minut pri 3000 obr./min, serum se odpipetira v novo sterilno epruveto z navojem (IMI, 2012).

2.3.5 Shranjevanje vzorcev

V nekaterih primerih analite testirajo v serijah. Takrat se vzorci hranijo do zapolnitve serije. Ta čas morajo biti vzorci primerno shranjeni, da ohranijo stabilnost. Tudi po opravljeni analizi se vzorce za določen čas shrani zaradi možnosti ponavljanja preiskave ali za opravljanje dodatnih preiskav. Pri hranjenju protiteles sta poleg časa hranjenja zelo pomembna še dva dejavnika, in sicer temperatura in vrsta embalaže.

Kadar je potrebno vzorec krvi shraniti v hladilnik ali zmrzniti, je potrebno najprej ločiti krvne celice od seruma ali plazme. Polne krvi ne zmrzujemo, tudi v primeru, kadar je serum ločen od krvnih celic z ločilnim gelom (WHO, 2006). Serum za serološke teste lahko hranimo nekaj dni pred testiranjem pri temperaturi od 2 °C do 8 °C (Bennet, 1980). Za daljše shranjevanje seruma je potrebno serum preliti v primerno epruveto za shranjevanje vzorca in shraniti pri temperaturi -20 °C ali nižje. Potrebno se je izogibati ponavljajočemu se zmrzovanju in odtajanju (Taylor in sod., 1979). Posode za shranjevanje proteinskih vzorcev naj bi bile iz materialov, na katere se beljakovine ne adsorbirajo, oziroma je njihova vezava zanemarljiva. Uporabljajo se predvsem materiali iz polipropilena, polikarbonata ali borosilikata. Priporočljivo je tudi, da je hranilna posoda brezbarvna, zaradi lažjega preverjanja vsebine.

2.4 STABILNOST PROTITELES

Protitelesa gleden na fizikalne lastnosti in kemijsko sestavo uvrščamo med sestavljene proteine. Na njihovo nestabilnost vplivajo tako kemijski kot fizikalni dejavniki. Med kemijske razgradne procese prištevamo dejavnike, ki vodijo do nastanka ali cepitve kovalentnih vezi. Med fizikalne pa prištevamo ostale spremembe, kot so denaturacija oz. izguba urejene terciarne zgradbe proteina, agregacija, obarjanje in adsorbpcija (Štrukelj in Kos, 2007). Pri fizikalni nestabilnosti protiteles je najbolj pogost pojav agregacija. Opazili so, da je večja verjetnost nastanka agegатов, če je v vzorcu večja koncentracija protiteles. Agregacija se poveča tudi ob povišanju temperature, viskoznosti, pH in ionske jakosti.

Nanjo vpliva tudi mešanje, dolgotrajno shranjevanje in proces zmrzovanja – taljenja (Wang in sod., 2007).

2.4.1 Stabilnost protiteles v krvnih vzorcih

Stabilnost je sposobnost vzorca, da pri shranjevanju pod specifičnimi pogoji ohrani prvotne lastnosti merjene komponente v določenem časovnem obdobju.

Protitelesa se najpogosteje merijo v krvnem serumu. Serum je tekoča frakcija krvi, kateri so odstranjene krvne celice in faktorji strjevanja krvi. V literaturi se podatki glede stabilnosti protiteles v serumu med seboj razlikujejo. Podatki so prikazani v spodnjih dveh preglednicah (3 in 4). Iz preglednice 3 in 4 je moč razbrati, da je stabilnost med razredi protiteles IgA, IgD, IgE, IgG in IgM različna. Razvidno je tudi (preglednica 3), da so protitelesa pri nižjih temperaturah stabilna dlje časa.

Preglednica 3: Stabilnost protiteles v telesu, polni krvi in serumu (WHO, 2002)

analit	biološka razpolovna doba	stabilnost analita v polni krvi		stabilnost analita v serumu/plazmi			literatura
		25 °C	2 – 6 °C	-20 °C	4 – 8 °C	20 – 25 °C	
IgA	6 d	17 d	1 m	8 m	8 m	8 m	*, **
IgD	5 d	/	/	6 m	7 d	7 d	
IgE	2,5 d	/	/	6 m	7 d	7 d	
IgG	3 t	11 d	1 m	8 m	8 m	4 m	*, **
IgM	5 d	17 d	1 m	6 m	4 m	2 m	*, **

* Töpfer in sod., 2000 ** Zhang in sod., 1998

t = teden, d = dan, m = mesec

Preglednica 4: Stabilnost protiteles v serumu pri sobni temperaturi, 4 °C in 30 °C

analit	serum RT	serum 4 °C	serum RT	serum 4 °C	serum 4 °C	serum 30 °C	serum 4 °C
	Töpfer, 1981				Guder in Wisser, 1990	Young, 2007	
	RO	RO	RID	RID			
IgG	>16 t	>16 t	>16 t	>16 t	14 d	7 d	7 d
IgM	4 t	16 t	8 t	>16 t	14 d	7 d	7 d
IgA	7 d	8 t	>16 t	>16 t	14 d	7 d	7 d

RT = sobna temperatura, t = teden, d = dan, RO = Rocket tehnika, RID = radialna imunodifuzija

Za stabilnost protiteles v polni krvi je v literaturi zelo malo podatkov. Le-ti so prikazani v preglednici 3.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 EPRUVETE ZA VAKUUMSKI ODVZEM KRVI

Pri odvzemu vzorca venske krvi smo uporabili dva različna tipa epruvete za odvzem krvi s podtlakom. Proizvajalec obeh tipov epruвет je BD (Becton, Dickinson and Company). Serijska številka epruvete z rumenim zamaškom z gelom je 367953, epruvete z rdečim zamaškom pa 369032.



Slika 5: Epruveta s serijsko številko 367953 (BD, 2012)

Preglednica 5: Lastnosti in opis epruvete s serijsko številko 367953(BD, 2012)

Tip izdelka	Plus, plastična epruveta
Blagovna znamka	BD SST™, BD Hemogard™, BD Vacutainer® Pospeševalec strjevanja krvi in gel za ločitev seruma.
Dodatki	Silikonska notranja prevleka
Barva zamaška	rumen
Dimenzija	16 x 100 mm
Material	plastika
Varnostne funkcije	BD Hemogard™ zamašek
Zamašek epruvete	BD Hemogard™
Tip	plastičen
Uporaba	Serumsko določanje v kemiji in serologiji. Ni priporočljivo za shranjevanje in kasnejše analize.
Volumen	8.5 ml



Slika 6: Epruveta s serijsko številko 369032 (BD, 2012)

Preglednica 6: Lastnosti in opis epruvete s serijsko številko 369032 (BD, 2012)

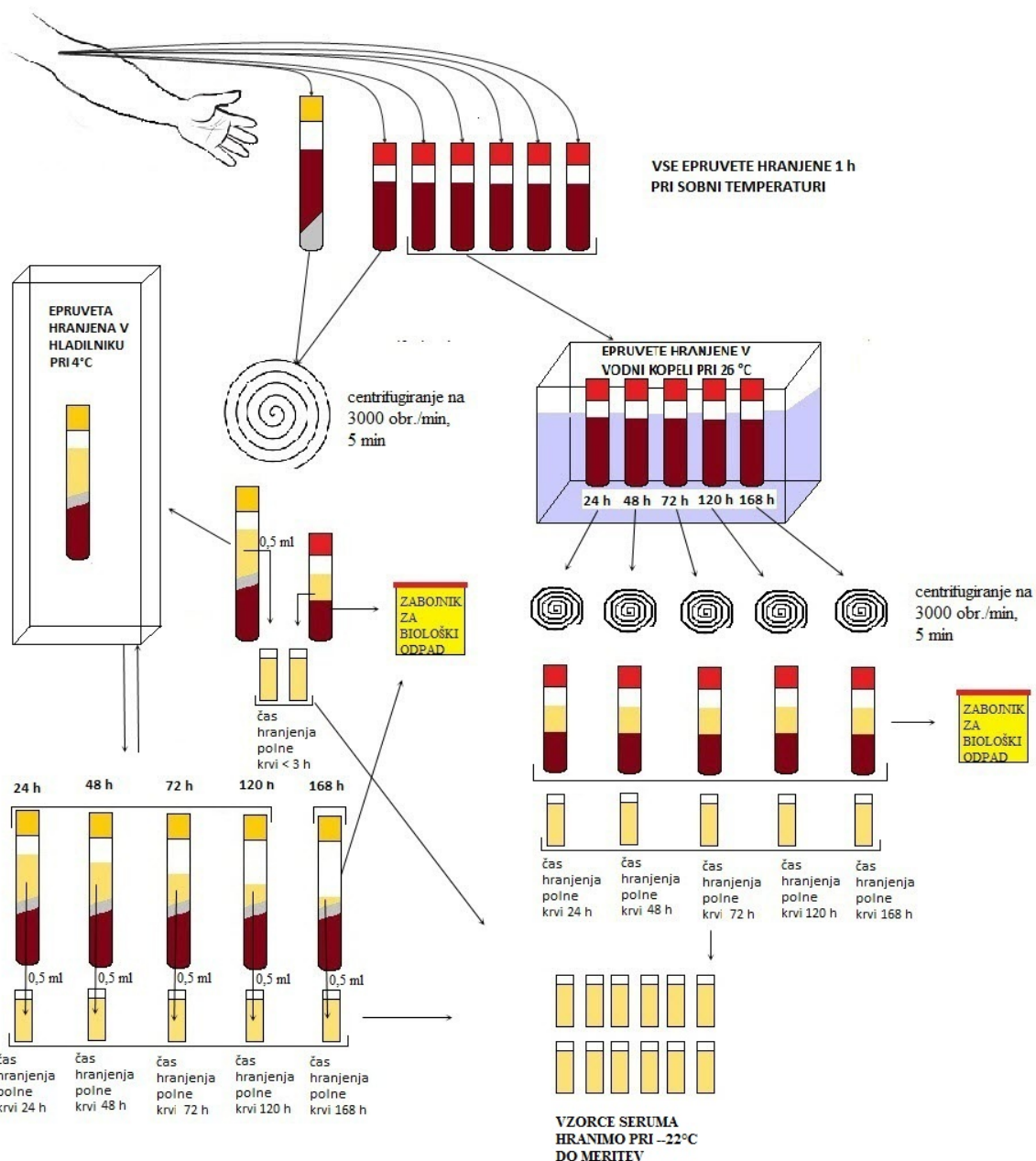
Tip izdelka	Plus, plastična epruveta
Blagovna znamka	BD SST™, BD Hemogard™, BD Vacutainer®
Dodatki	
Barva zamaška	rdeča
Dimenzija	13 x 75 mm
Material	plastika
Varnostne funkcije	BD Hemogard™ zamašek
Zamašek epruvete	BD Hemogard™
Tip	Plastičen
Uporaba	Serumsko določanje v kemiji in serologiji.
Volumen	4 ml

V nadaljevanju smo uporabili imena epruveta z rumenim zamaškom z gelom in epruveta z rdečim zamaškom brez gela, zaradi hitrejše in lažje ločitve med njima.

3.2 VZORCI

Za izvedbo diplomske naloge je dvanajst zdravih, odraslih prostovoljcev darovalo vensko kri. Vsakemu prostovoljcu je oseba, izurjena za odvzem krvi, vzela 32,5 ml venske krvi, in sicer v šestih epruvetah po 4 ml za vakuumski odvzem krvi brez antikoagulantnega sredstva (epruvete z rdečim zamaškom) in 8,5 ml krvi v epruveti z gelom za vakuumski odvzem brez antikoagulantnega sredstva (epruveta z rumenim zamaškom).

3.2.2 Priprava serumskih vzorcev za analizo



Slika 7: Odvzem venske krvi in priprava serumskih vzorcev posameznega darovalca.

Najprej smo vse odvzete vzorce polne krvi v epruvetah za odvzem pustili eno uro na sobni temperaturi, da je prišlo do koagulacije krvi. Nato smo epruveto z rumenim zamaškom z gelom in eno epruveto z rdečim zamaškom brez gela centrifugirali 5 minut na 3000 obr./min. Iz epruvete z rdečim zamaškom smo odpipetirali izhodiščni serumski vzorec (čas hranjenja polne krvi >3ure) in ga shranili. Epruveto smo zavrgli. Ostalih pet epruvet z

rdečim zamaškom pa smo namestili v vodno kopel, kjer je bila stalna temperatura 26 °C (posnemanje pogojev transporta polne krvi v poletnem času).

Iz epruvete z rumenim zamaškom z gelom smo po centrifugiranju odpipetirali 0,5 ml seruma in ga shranili kot izhodiščni vzorec (čas hranjenja polne krvi >3 ure). Epruveto s preostankom seruma, ločenega z gelom od krvnega strdka, smo shranili v hladilnik pri 4 °C. Tako smo dobili vzorec seruma, čas hranjenja polne krvi < 3 h v epruveti z rumenim zamaškom z gelom in vzorec seruma, čas hranjenja polne krvi < 3 h v epruveti z rdečim zamaškom brez gela. Vse serumske vzorce smo do testiranja hranili pri temperaturi -22 °C.

3.2.2.1 Priprava vzorcev, čas hranjenja polne krvi 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h

Iz epruvete z rumenim zamaškom z gelom, ki je bila hranjena v hladilniku pri 4 °C smo po zgoraj navedeni časovnici odpipetirali 0,5 ml seruma, nato smo jo vrnili nazaj v hladilnik. Serum smo shranili pri -22 °C. Po isti časovnici smo pripravili vzorce seruma iz epruvet z rdečim zamaškom brez gela, hranjenih v vodni kopeli pri 26 °C. Kri smo centrifugirali na 3000 obr./min 5 minut. Nato smo odpipetirali serum in ga shranili pri -22 °C.

Na koncu smo od enega darovalca krvi pridobili 12 serumskih vzorcev, in sicer 6 vzorcev iz epruvet z rdečim zamaškom in 6 vzorcev iz ene epruvete z rumenim zamaškom z gelom. Vse vzorce serumov smo do meritev hranili pri -22 °C.

3.2 METODE

Najprej smo za vsako osebo testirali prisotnost izbranih protiteles iz vzorca, ki je bil hranjen manj kot 3 ure. Po potrjeni prisotnosti smo v isti seriji izmerili količino protiteles v vseh vzorcih, čas hranjenja polne krvi 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h v epruvetah z rumenim zamaškom z gelom in v epruvetah z rdečim zamaškom brez gela.

Pri vseh 12 darovalcih krvi smo izmerili koncentracijo specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk in sicer s sistemom Liaison in testom Siemens (Enzygnost® Anti-rubella-virus/IgG).

Pri osebi 1, 2, 3 in 8 smo dodatno merili še druge koncentracije protiteles, ki so navedene v spodnji preglednici.

Preglednica 7: Dodatni testi na vzorcih posameznega darovalca polne krvi

Oseba	Testirana protitelesa	Test
Oseba 1	Specifična protitelesa IgG proti <i>Candida</i> spp.	analizator ImmunoCAP 100
Oseba 2	Specifična protitelesa proti streptokokni DNAzi B	metoda nefelometrija
	Imunoglobulini IgG	sistem BN ProSpec®
	Imunoglobulini IgM	sistem BN ProSpec®
Oseba 3	Specifična protitelesa IgG proti <i>Candida</i> spp.	analizator ImmunoCAP 100
	Imunoglobulini IgE	sistem BN ProSpec®
	Specifična protitelesa IgE proti <i>Phleum pratense</i>	analizator ImmunoCAP 100
Oseba 8	Specifična protitelesa IgG proti tetanusnem toksinu	VaccZyme™

Oznake vzorcev za analizo podatkov so podane v preglednici 10.

Preglednica 8: Oznaka vzorcev glede na osebo in merjeno protitelo

Prva številka označuje darovalca krvi		Druga številka označuje test	
1._.	Oseba 1	_.1.	Specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk _Liaison
2._.	Oseba 2	_.2.	Specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk __Siemens
3._.	Oseba 3	_.3.	Specifična protitelesa IgG proti <i>Candida</i> spp.
4._.	Oseba 4	_.4.	Specifična protitelesa proti streptokokni DNAzi B
5._.	Oseba 5	_.5.	Imunoglobulini IgG
6._.	Oseba 6	_.6.	Imunoglobulini IgM
7._.	Oseba 7	_.7.	Imunoglobulini IgE
8._.	Oseba 8	_.8.	Specifična protitelesa IgE proti <i>Phleum pratense</i>
9._.	Oseba 9	_.9.	Specifična protitelesa IgG proti tetanusnem toksinu
10._.	Oseba 10		
11._.	Oseba 11		
12._.	Oseba 12		

Za označitev smo uporabili dvomestno oznako. Prva številka ponazarja darovalca krvi, druga pa testirano protitelo. Oznaka npr. 2.5. pomeni test, Imunoglobulini IgG izmerjeni v

kateremkoli vzorcu darovalca št. 2. To označitev smo uporabljali v celotnem besedilu diplomskega dela.

Vse teste smo izvajali skladno z navodili proizvajalca.

3.2.1 Merjenje specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk s sistemom Liaison

Virus rdečk je virus z molekulo RNA, ki spada v rod *Rubivirusov*. Povzroča bolezen rdečke, ki se kaže z vročino, izpuščaji in povečanimi bezgavkami. Nevarne so okužbe pri nosečnicah, saj virusi rdečk prehajajo skozi placento in povzročajo okužbo ploda.

Diagnostični sistem Liaison (DiaSorin, Saluggia, Italija) je avtomatiziran sistem, ki omogoča serološko dokazovanje različnih okužb z metodo kemiluminiscence (CLIA) v človeškem serumu ali plazmi. Serološke teste izvajamo v plastičnih kontejnerjih (integralih), ki vsebujejo vse potrebne reagente za izvedbo testa. Reagenti so specifični za določen parameter merjenja, npr. za protitelesa IgG in IgM. Sistem Liaison nam omogoča uporabo več integralov hkrati in tako lahko istočasno na istem vzorcu izvajamo merjenje različnih parametrov (DiaSorin, 2008).

Test »LIAISON[®] Rubella IgG Assay« je posredni kvantitativni kemiluminiscenčni serološki test, s katerim določamo specifična protitelesa IgG proti virusu rdečk. Pri tem se uporabljajo magnetni delci (trdna faza), obdani z antigeni virusa rubele in mišja monoklonska protitelesa, konjugirana z izoluminolnim derivatom proti človeškemu IgG (konjugat). Pri prvi inkubaciji se specifična protitelesa IgG proti virusu rdečk iz bolnikovega vzorca vežejo na antigene virusa. Med drugo inkubacijo pa konjugat reagira samo s protitelesi, ki so vezana na antigen virusa. Po obeh inkubacijah sledi izpiranje odvečnega materiala. Po dodatku vzbujevalnega reagenta nastane kemiluminiscenčna reakcija. Sproščen svetlobni signal merimo s fotopomnoževalnikom v relativnih svetlobnih enotah (RLU – iz angl. *relative light units*). Količina signala je sorazmerna s koncentracijo vezanih spec. IgG protiteles proti virusu rdečk. Rezultati so podani kot AU/ml (enota na ml ali angl. *arbitrary unit*) (DiaSorin, 2008).

3.2.2 Merjenje specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk, proizvajalec Siemens

»Enzygnost® Anti-Rubella-virus/IgG« (Siemens, Erlangen, Nemčija) je indirektni encimsko imunski test (ELISA), ki se uporablja pri kvalitativni in kvantitativni meritvi specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk v človeškem serumu ali plazmi. Specifična protitelesa IgG proti virusu rdečk se vežejo na antigen, ki se nahaja na stenah mikrotitrskih jamic. Kunčja protitelesa konjugirana s peroksidazo (Anti-human IgG/POD) se vežejo na specifična protitelesa IgG proti virusu rdečk, ki so vezana na antigen. Peroksidaza katalizira kromogeno substratno raztopino in kot posledica katalize se raztopina obarva modro. Reakcijo ustavimo z raztopino »stop« POD, ki spremeni modro obarvano raztopino v rumeno. Intenziteta rumene barve je sorazmerna koncentraciji specifičnih protiteles IgG proti virusu rdečk. Rezultati so podani v mednarodnih enotah (IU/ml).

3.2.3 Merjenje specifičnih protiteles IgG proti *Candida* spp. z analizatorjem ImmunoCAP 100

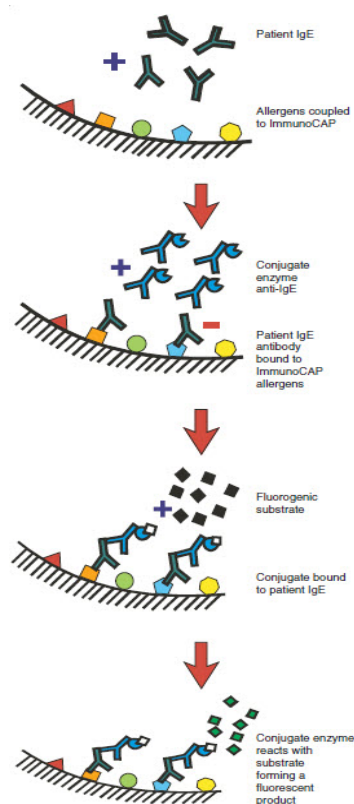
Candida spp. uvrščamo med glive kvasovke. Je del normalne flore, ki poseljuje kožo, ustno votlino, nožnico in debelo črevo. Spada med oportunistične povzročitelje okužb in, v kolikor se ob prisotnosti ugodnih pogojev prekomerno razmnožijo, povzročajo vnetja in bolezni (Tomalka in sod., 2011).

Z analizatorjem ImmunoCAP 100 smo izmerili koncentracijo specifičnih protiteles IgG s testnim kompletom ImmunoCAP® Specific IgG (Phadia, Uppsala, Švedska) proti *Candida* spp. Metoda je fluoroencimski imunski test. Antigen je kovalentno vezan na trdno fazo ImmunoCAPa, ki je polimer celuloze. Med inkubacijo antigen reagira s spec. IgG v vzorcu. Sledi izpiranje odvečnega materiala. Po dodatku konjugata (protitelesa označena z encimom) se le-ta veže na protitelesa IgG, ki so vezana na antigen. Po spiranju nevezanih protiteles sledi inkubacija z reagentom za razvijanje reakcije. Reakcijo ustavimo z reagentom za prekinitev reakcije. Temu sledi zadnje spiranje ImmunoCAPa in merjenje fluorescence. Koncentracija specifičnih protiteles IgG je premosorazmerna s signalom fluorescence. Za vrednotenje rezultata meritve v vzorcu upoštevamo umeritveno krivuljo. Koncentracija spec IgG protiteles proti *Candida* spp. je podana v mg/l.

3.2.4 Merjenje specifičnih protiteles IgE proti *Phleum pratense* z analizatorjem ImmunoCAP 100

Phleum pratense (travniški mačji rep) spada med trave in je ena izmed najbolj razširjenih trav po vsem svetu. Posledično je tudi cvetni prah mačjega repa eden izmed najpogostejših alergenov v poletnem času, ki povzroča alergijski rinitis, astmo in alergijski konjunktivitis v zmerno hladnem pasu (Pepys in sod., 1975).

Koncentracijo specifičnih protiteles IgE smo izmerili v analizatorju ImmunoCAP 100 s testnim kompletom ImmunoCAP® Specific IgE (Phadia, Uppsala, Švedska) proti *Phleum pratense*. Princip metode merjenja specifičnih protiteles IgE (prikazan na sliki 8) proti travniškem mačjem repu je isti kot pri merjenju spec. protiteles IgG proti *Candida* spp. Za vrednotenje rezultata meritve v vzorcu upoštevamo umeritveno krivuljo. Rezultati meritev specifičnih protiteles IgE proti *Phleum pratense* so podani v kU/l.



Slika 8: Princip merjenja specifičnih protiteles IgE s testnim kompletom ImmunoCAP® Specific IgE (Johansson, 2004).

3.2.5 Merjenje imunoglobulinov razreda IgG in IgM s sistemom BN ProSpec®

Imunoglobuline (Ig) izločajo limfociti B kot odziv na stik imunskega sistema z antigenom. Primarna reakcija na začetni kontakt antigena je tvorba protiteles razreda IgM, sledijo protitelesa IgG in IgA. Določanje koncentracije imunoglobulinov lahko poda pomembno informacijo glede statusa humoralnega imunskega sistema (Thomas, 1998).

Za kvantitativno določitev imunoglobulinov IgG in IgM smo uporabili test »N Antisera to human immunoglobulins (IgG, IgA in IgM)«. Metoda merjenja s sistemom BN proSpec® (Siemens, Marburg, Nemčija) je imunonefelometrija. Uporablja se za kvantitativne meritve imunoglobulinov IgM, IgG in IgA v človeškem serumu in plazmi odvzeti s heparinom ali EDTA. Za meritve imunoglobulinov IgG je lahko vzorec tudi človeški urin ali likvor.

N Antiserum, pridobljen iz imuniziranih kuncev z visoko očiščenimi človeškimi protitelesi razreda IgM, IgG ali IgA, s človeškimi protitelesi v vzorcu tvori imunski kompleks. Ti imunski kompleksi razpršijo žarek svetlobe, ki potuje skozi vzorec. Intenzivnost razpršene svetlobe je sorazmerna s koncentracijo merjenega imunoglobulina. Z umeritveno krivuljo standardnih koncentracij ovrednotimo rezultate, ki so podani v g/l.

3.2.6 Merjenje imunoglobulinov razreda IgE s sistemom BN ProSpec®

Imunoglobulini IgE so odgovorni za nastanek alergij. Pri alergijskih boleznih kot so atopični dermatitis ali astma, je koncentracija IgE protiteles v korelaciji z intenziteto izpostavljenosti alergenu in resnostjo alergijskih simptomov.

Za kvantitativno določanje imunoglobulinov IgE smo uporabili test »N latex IgE mono« (Dade Behring, Marburg, Nemčija). Princip metode merjenja je imunonefelometrija s sistemom BN ProSpec® (Siemens, Marburg, Nemčija). Polistirenski delci so obdani s protitelesi, ki so specifično uperjena proti človeškim protitelesom IgE. Ob stiku s človeškimi protitelesi IgE nastanejo imunski kompleksi. Imunski kompleks razprši žarek svetlobe, ki potuje skozi vzorec. Intenziteta razpršene svetlobe je sorazmerna s koncentracijo protiteles IgE v vzorcu. Rezultati meritev so evalvirani z znanimi koncentracijami protiteles IgE. Koncentracija merjenih protiteles je podana v IU/ml.

3.2.7 Merjenje streptokoknih ADNaza B protiteles

ADNaza B so protitelesa, ki so uperjena proti encimu deoksiribonukleaza, ki ga izločajo streptokoki skupine A. Dokaz teh protiteles kaže na možnost obstoječih ali preteklih streptokoknih okužb (škrlatinka, revmatoidna vročina in druge streptokokne bolezni).

Za merjenje ADNaza B protiteles v serumu smo uporabili test »N-Latex ADNase B«. Metoda merjenja je imunonefelometrija s sistemom BN proSpec® (Siemens, Marburg, Nemčija). Prisotnost protiteles v serumu proti streptokokni DNazi B povzroči vezavo streptokokne DNaze B (N ADNase B supplementary reagent) na protitelesa v serumu. Rezultat je šibka aglutinacija delcev, ali pa je sploh ni. Kadar v serumskem vzorcu ni protiteles proti streptokokni DNazi B, se streptokokna DNaza veže na kunčja protitelesa, ki so vezana na polistirenske delce. Rezultat je aglutinacija polistirenskih delcev, na katerih so vezana kunčja protitelesa proti streptokokni DNazi s streptokokno DNazo B. Višja kot je vsebnost anti-DNaze B v vzorcu, nižja je intenziteta sipane svetlobe. Tako lahko z umiritveno krivuljo standardnih koncentracij določimo koncentracijo anti-streptokokne DNazo B v vzorcu.

3.2.8 Merjenje protiteles IgG usmerjenih proti tetanusnem toksinu

Protitelesa IgG proti tetanusnem toksinu proizvaja imunski sistem zaradi okužbe z bakterijo *Clostridium tetani* (odziv na prisotnost toksina, ki ga med rastjo proizvajajo bakterije), ali kot odziv na cepljenje s cepivom proti tetanusu. Merjenje specifičnih protiteles IgG proti tetanusnem toksinu pred cepljenjem in po cepljenju je pomembno pri ocenjevanju sposobnosti posameznika, kako se bo njegov imunski sistem odzval na antigen.

Za merjenje vsebnosti protiteles IgG proti tetanusnem toksinu v vzorcu smo uporabili test VaccZyme™ Anti-tetanus toxoid IgG (The Binding Site, Birmingham, Velika Britanija), ki temelji na principu testa ELISA. Najmanjša zaščitna koncentracija protiteles IgG proti tetanusnem toksinu s to metodo je 0,15 IE/ml.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Obdelava podatkov je potekala s statističnima programoma Microsoft Excel in SPSS 17.0. Izmerjene rezultate smo preračunali v indekse, jih statistično ovrednotili s pomočjo grafov, izračunali smo vrednosti statističnih parametrov, (aritmetično sredino (\bar{x}), standardni odklon (SD), koeficient variabilnosti (KV %), standardno napako (SE). S Kolmogorov-Smirnovim testom, ki je vgrajen v program SPSS, smo testirali normalnost porazdelitve podatkov. Za preverjanje razlik aritmetičnih sredin dveh neodvisnih vzorcev smo uporabili Studentov t-test. T-test je metoda za testiranje hipotez, kjer testna statistika sledi Studentovi porazdelitvi ob predpostavki, da ničelna hipoteza (H_0) drži. Mejo statistično značilnih razlik smo postavili pri vrednosti $p < 0,05$. Na podlagi statistične obravnave smo na koncu povzeli zaključke.

4 REZULTATI

Po ločitvi seruma od krvnih celic smo vizualno pregledali vzorce na hemolizo, saj bi le-ta lahko vplivala na rezultate merjenja. Pri vzorcih v epruveh z rumenim zamaškom z gelom, hranjenih pri 4 °C, v nobenem času hranjenja polne krvi ni prišlo do vidne hemolize, saj se je gel pri centrifugiranju umestil med serum in krvni strdek ter s tem vpostavljal trdno prepreko med obema. Pri vzorcih, hranjenih v epruveh z rdečim zamaškom brez gela, pri temperaturi 26 °C, pa je prišlo do hemolize pri časih hranjenja polne krvi 72 h, 120 h in 168 h. Rezultati so podani v preglednici 9.

Preglednica 9: Vizualni pregled serumov na hemolizo po ločitvi od krvnih celic glede na čas hranjenja polne krvi v epruveh z rdečim zamaškom.

OSEBA	čas hranjenja polne krvi < 3 h	čas hranjenja polne krvi 24 h	čas hranjenja polne krvi 48 h	čas hranjenja polne krvi 72 h	čas hranjenja polne krvi 120 h	čas hranjenja polne krvi 168 h
1._.	/	/	/	+	++	+++
2._.	/	/	/	/	++	+++
3._.	/	/	/	+	++	+++
4._.	/	/	/	/	++	+++
5._.	/	/	/	+	++	+++
6._.	/	/	/	/	++	+++
7._.	/	/	/	++	++	+++
8._.	/	/	/	/	++	+++
9._.	/	/	/	/	++	+++
10._.	/	/	/	/	++	+++
11._.	/	/	/	/	++	+++
12._.	/	/	/	+	++	+++

Legenda: /: ni hemolize; +: rahla hemoliza; ++: srednja hemoliza; +++: močna hemoliza

Najprej smo vsem rezultatom izračunali indekse tako, da smo rezultat meritve pri času hranjenja polne krvi 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h delili z rezultatom meritve pri času hranjenja polne krvi <3 h, za vsak test merjenja posebej.

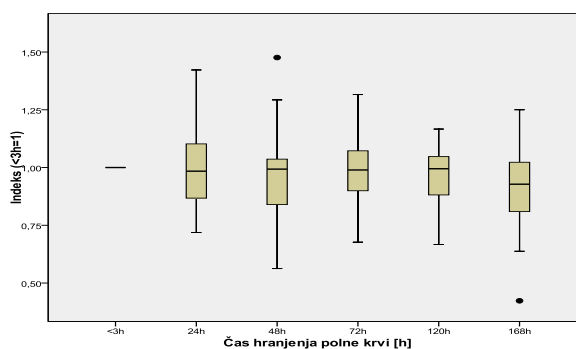
$$I = \frac{\text{Rezultat meritve pri času hranjenja polne krvi 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 168 h}}{\text{Rezultat meritve pri času hranjenja polne krvi < 3 h}} \dots(1)$$

Indekse smo izračunali zato, da smo lahko rezultate meritev pri različnih metodah posredno primerjali med seboj. Vsi nadalje predstavljeni rezultati in izračuni so že predstavljeni kot indeksi.

V nadaljevanju smo predstavili rezultate v epruvetah z rdečim zamaškom, hranjene pri temperaturi 26 °C, ločeno od rezultatov v epruvetah z rumenim zamaškom z gelom, hranjene pri temperaturi 4 °C. Ta dva poskusa med seboj nimata nobene korelacije, saj vsebujeta dve različni spremenljivki, temperaturo (26 °C in 4 °C) in embalažo hranjenja polne krvi (epruvete brez gela in epruvete z gelom).

4.1 VZORCI V EPRUVETAH Z RDEČIM ZAMAŠKOM, HRANJENI PRI TEMPERATURI 26 °C

Pred določitvijo vrednosti diskretnih statistik smo preverili prisotnost osamelcev, ki bi lahko motili nadaljnjo statistično obdelavo. Iz grafičnega prikaza kvartilov (slika 8) lahko razberemo, da se osamelec – vrednost, ki bistveno odstopa od večine ostalih vrednosti – pojavi v dveh grafih, in sicer pri času hranjenja 48 h (vrednost indeksa 1,48) in 168 h (vrednost indeksa 0,42). Vrednosti osamelcev v nadaljnji statistični obdelavi nismo upoštevali. Sklepamo, da je prišlo do teh odstopanj zaradi napake pri meritvi (izvedbi metode). Iz slike 9 vidimo, v kakšnem razponu se porazdeljujejo podatki posamezne skupine: osrednja črta označuje mediano, robovi okvirja označujejo spodnji in zgornji kvartil, medtem ko ročaji okvirja predstavljajo najnižjo in najvišjo ekstremno vrednost spremenljivke. Območje znotraj okvirja predstavlja kvartilni razmik, s katerim pridobimo podatke o razpršenosti podatkov.



Slika 9: Indeksi ($\le 3 h = 1$) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rdečim zamaškom, pri 26 °C. Okvirji z ročaji izrisani s programom SPSS

Preglednica 10: Prikaz izmerjenih vrednosti specifičnih in celokupnih protiteles v polni krvi, hranjeni v epruvetah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C in izračuni njihovih indeksov (< 3 h = 1)

oznaka vzorcev	Specifična protitelesa + razredi imunoglobulinov	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas
		hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h	hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h
		IZMERJENE VREDNOSTI						INDEKSI preračunani na čas hranjenja polne krvi < 3h					
1.1	Rubella_Liaison	121,00	111,00	127,00	127,00	111,00	115,00	1,00	0,92	1,05	1,05	0,92	0,95
1.2	Rubella_Siemens Spec.IgG Candida albicans	210,00	230,00	170,00	160,00	140,00	155,00	1,00	1,10	0,81	0,76	0,67	0,74
1.3	Rubella_Liaison	145,00	145,00	148,00	132,00	130,00	136,00	1,00	1,00	1,02	0,91	0,90	0,94
2.1	Rubella_Liaison	55,80	61,50	45,90	56,00	53,00	47,70	1,00	1,10	0,82	1,00	0,95	0,85
2.2	Rubella_Siemens Anti-streptokokna DNA-za	96,00	69,00	54,00	65,00	95,00	65,00	1,00	0,72	0,56	0,68	0,99	0,68
2.4	Celokupni IgG	356,00	297,00	296,00	297,00	371,00	316,00	1,00	0,83	0,83	0,83	1,04	0,89
2.5	Celokupni IgM	11,50	9,77	9,21	10,40	12,10	10,20	1,00	0,85	0,80	0,90	1,05	0,89
2.6	Celokupni IgE	0,79	0,66	0,65	0,71	0,83	0,74	1,00	0,84	0,82	0,89	1,06	0,94
3.1	Rubella_Liaison	50,70	41,00	46,60	47,00	45,20	41,50	1,00	0,81	0,92	0,93	0,89	0,82
3.2	Rubella_Siemens Spec.IgG Candida albicans	87,00	96,00	89,00	88,00	80,00	93,00	1,00	1,10	1,02	1,01	0,92	1,07
3.3	Celokupni IgE	158,00	145,00	151,00	151,00	134,00	145,00	1,00	0,92	0,96	0,96	0,85	0,92
3.7	Spec.IgE Phleum pratense	197,00	244,00	253,00	229,00	218,00	206,00	1,00	1,24	1,28	1,16	1,11	1,05
3.8	Rubella_Liaison	38,00	36,60	38,10	50,00	38,80	37,00	1,00	0,96	1,00	1,32	1,02	0,97
4.1	Rubella_Siemens	189,00	223,00	203,00	185,00	197,00	159,00	1,00	1,18	1,07	0,98	1,04	0,84
4.2	Rubella_Liaison	240,00	280,00	240,00	270,00	240,00	240,00	1,00	1,17	1,00	1,13	1,00	1,00
5.1	Rubella_Siemens	261,00	334,00	216,00	270,00	265,00	196,00	1,00	1,28	0,83	1,03	1,02	0,75
5.2	Rubella_Liaison	300,00	310,00	300,00	210,00	240,00	240,00	1,00	1,03	1,00	0,70	0,80	0,80
6.1	Rubella_Siemens	48,80	44,60	48,60	49,40	41,20	43,80	1,00	0,91	1,00	1,01	0,84	0,90
6.2	Rubella_Liaison	70,00	62,00	63,00	70,00	61,00	56,00	1,00	0,89	0,90	1,00	0,87	0,80
7.1	Rubella_Siemens	22,60	21,70	23,00	26,20	24,20	17,80	1,00	0,96	1,02	1,16	1,07	0,79
7.2	Rubella_Liaison	41,00	44,00	53,00	30,00	42,00	40,00	1,00	1,07	1,29	0,73	1,02	0,98
8.1	Rubella_Siemens	57,00	55,20	57,50	54,80	50,90	47,90	1,00	0,97	1,01	0,96	0,89	0,84
8.2	Tetanus	87,00	64,00	85,00	81,00	100,00	100,00	1,00	0,74	0,98	0,93	1,15	1,15
8.9	Rubella_Liaison	2,68	2,28	2,56	1,88	2,10	1,71	1,00	0,85	0,95	0,70	0,78	0,64
9.1	Rubella_Siemens	52,80	75,10	66,10	61,70	61,60	58,00	1,00	1,42	1,25	1,17	1,17	1,10
9.2	Rubella_Liaison	130,00	110,00	110,00	110,00	110,00	55,00	1,00	0,85	0,85	0,85	0,85	np*

*np –ni podatka, osamela vrednost izločena iz statistične obravnave

Se nadaljuje

Nadaljevanje

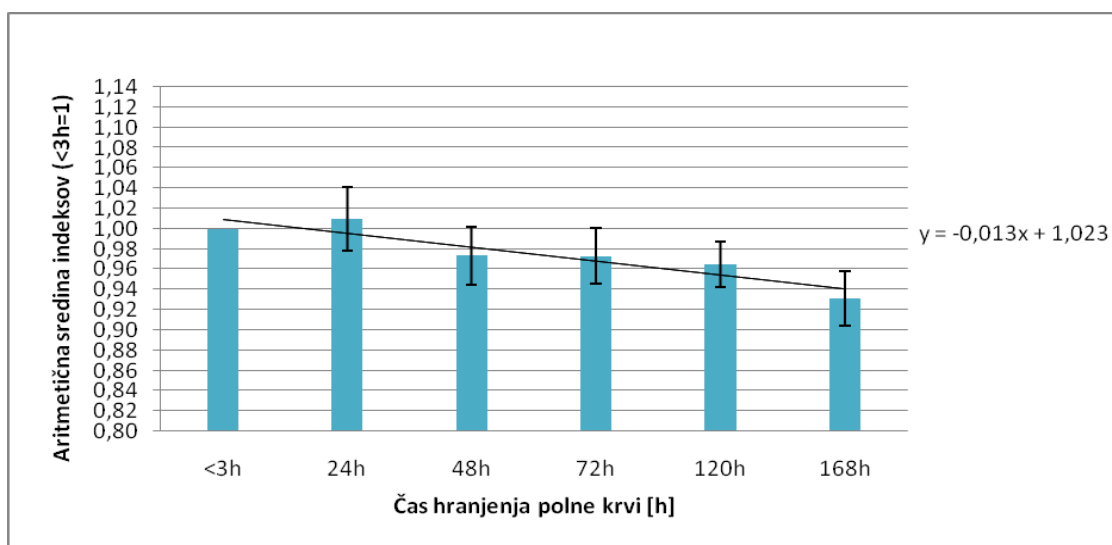
Preglednica 10: Prikaz izmerjenih vrednosti specifičnih in celokupnih protiteles v polni krvi, hranjeni v epruvetah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C in izračuni njihovih indeksov (< 3 h = 1)

oznaka vzorcev	Specifična protitelesa + razredi imunogloblinov	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas
		hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h	hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h
IZMERJENE VREDNOSTI													
10.1	Rubella_Liaison	62,40	68,80	61,80	62,50	62,60	61,30	1,00	1,10	0,99	1,00	1,00	0,98
10.2	Rubella_Siemens	63,00	89,00	93,00	75,00	72,00	74,00	1,00	1,41	np*	1,19	1,14	1,17
11.1	Rubella_Liaison	93,30	95,50	85,50	88,10	70,50	89,40	1,00	1,02	0,92	0,94	0,76	0,96
11.2	Rubella_Siemens	120,00	110,00	100,00	120,00	140,00	150,00	1,00	0,92	0,83	1,00	1,17	1,25
12.1	Rubella_Liaison	126,00	136,00	145,00	138,00	118,00	134,00	1,00	1,08	1,15	1,10	0,94	1,06
12.2.	Rubella_Siemens	130,00	140,00	160,00	150,00	130,00	150,00	1,00	1,08	1,23	1,15	1,00	1,15

*np –ni podatka, osamela vrednost izločena iz statistične obravnave

Preglednica 11: Vrednosti statističnih parametrov indeksov ($< 3 \text{ h} = 1$) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v eprugetah z rdečim zamaškom, pri temperaturi $26 \text{ }^\circ\text{C}$

	čas hranjenja polne krvi $< 3 \text{ h}$	čas hranjenja polne krvi 24 h	čas hranjenja polne krvi 48 h	čas hranjenja polne krvi 72 h	čas hranjenja polne krvi 120 h	čas hranjenja polne krvi 168 h
\bar{X}	1,00	1,01	0,97	0,97	0,96	0,93
SD	0,00	0,18	0,16	0,16	0,13	0,15
KV %	0,00	17,4	16,4	16,0	13,0	16,00
ŠT. VZORCEV	32	32	31	32	32	31
SE	0,00	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03



Slika 10: Prikaz standardnih napak in vrednosti aritmetičnih sredin indeksov ($< 3 \text{ h} = 1$) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v eprugetah z rdečim zamaškom, brez gela, pri temperaturi $26 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz slike 10 je razvidno padanje aritmetične sredine indeksov ($< 3 \text{ h} = 1$) glede na čas hranjenja polne krvi v eprugetah z rdečim zamaškom brez gela, pri temperaturi $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Padec je ponazorjen s trendno črto. Standardna napaka na sliki 9 označena s črnimi črtami na vrhu stolpcev, je pri vseh časih 0,03 enote, razen pri času hranjenja polne krvi 120 h, ki je 0,02 enoti, in pri času $< 3 \text{ h}$. Pri času hranjenja polne krvi $< 3 \text{ h}$ ni standardne napake, saj so vsi podatki iste vrednosti ($< 3 \text{ h} = 1$).

Za preverjanje normalnosti smo uporabili Kolmogorov Smirnov test, ki je vgrajen v program SPSS. Pri testiranju smo upoštevali stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Vrednost p je bila pri vseh časih hranjenja polne krvi (3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h) večja od α , kar pomeni, da so podatki normalno porazdeljeni.

S pomočjo T-testa smo v Excelu preverili razlike med aritmetičnimi sredinami dveh neodvisnih vzorcev, da bi ugotovili, pri katerem času hranjenja polne krvi pride do signifikantnih razlik. Indekse pri časih hranjenja polne krvi 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h (matrika 2) smo primerjali z indeksi pri času hranjenja polne krvi < 3 h (matrika 1). Postavili smo ničelno domnevo, da sta aritmetični sredini matrike 1 in matrike 2 enaki.

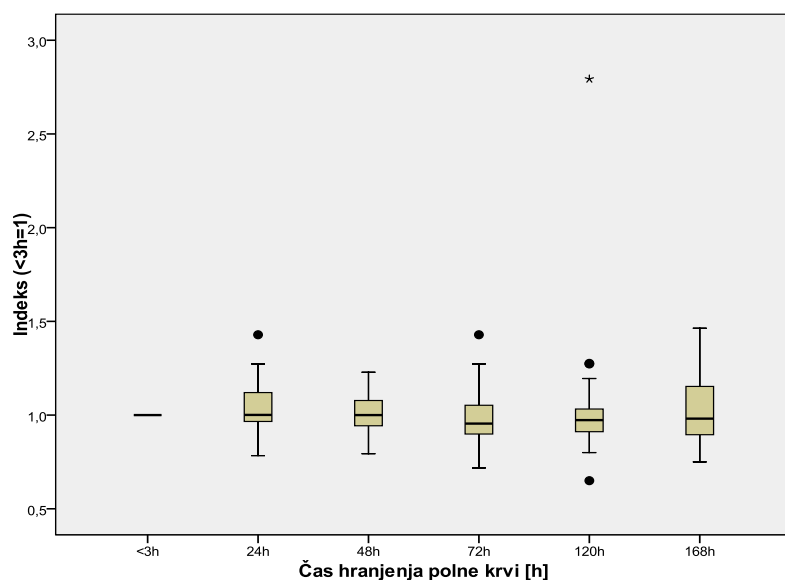
Preglednica12: Rezultati T-testa indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C

	čas hranjenja polne krvi < 3 h	čas hranjenja polne krvi 24 h	čas hranjenja polne krvi 48 h	čas hranjenja polne krvi 72 h	čas hranjenja polne krvi 120 h	čas hranjenja polne krvi 168 h
p vrednost	/	0,753	0,359	0,339	0,121	0,015

Vrednosti p pri T-testu so pri vseh časih večje od $\alpha = 0,05$, kar pomeni da ničelno domnevo potrdimo. Izjema je le pri času hranjenja polne krvi 168 h, katere p vrednost je 0,015. Pri tem času hranjenja ovržemo ničelno domnevo. Aritmetična sredina matrike 1 ni enaka aritmetični sredini matrike 2, torej se vzorec, čas hranjenja polne krvi 168 h, signifikantno razlikuje od vzorca, čas hranjenja polne krvi < 3 h.

4.2 VZORCI V EPRUVETAH Z RUMENIM ZAMAŠKOM Z GELOM, HRANJENI PRI TEMPERATURI 4 °C

Postopek statistične obdelave indeksov polne krvi hranjene v epruvetah z rumenim zamaškom, z gelom, pri 4 °C je enak kot pri indeksih polne krvi hranjene v epruvetah z rdečim zamaškom, pri temperaturi 26 °C. Najprej smo preverili prisotnost osamelcev; le-ti se pojavijo pri časih hranjenja polne krvi 24 h (vrednost indeksa 1,43), 72 h (vrednost indeksa 1,43) in 120 h. Pri času hranjenja polne krvi 120 h se pojavijo tri osamele vrednosti. Prvi je ekstremni osamelec, katerega vrednost indeksa je 2,79. Isti vzorec smo dvakrat testirali, misleč, da je prišlo do laboratorijske napake, vendar se vrednost ni razlikovala od prvotne vrednosti. Zamenjavo vzorcev z drugo osebo smo tudi ovrgli, saj je bil isti vzorec 3.3. pri času hranjenja polne krvi 120 h, testiran še z drugimi metodami in v teh primerih ni bistveno odstopal od povprečja. Zakaj je prišlo do tako velikega odstopanja, ne znamo razložiti. Druga dva osamelca, vrednosti indeksa 1,28 in 0,65, sta verjetno nastala zaradi laboratorijske napake. Vse osamele vrednosti smo izključili iz nadaljnje statistične obravnave.



Slika 11: Indeksi (<math><3h=1</math>) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rumenim zamaškom z gelom, pri 4 °C. Okvirji z ročaji izrisani s programom SPSS.

Preglednica 13: Prikaz izmerjenih vrednosti specifičnih in celokupnih protiteles v polni krvi, hranjeni v epruvetah z rumenim zamaškom, pri temperaturi 4 °C in izračuni njihovih indeksov (< 3 h = 1)

oznaka vzorcev	Specifična protitelesa + razredi imunoglobulinov	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas
		hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h	hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h
		IZMERJENE VREDNOSTI						INDEKSI preračunani na čas hranjenja polne krvi < 3h					
1.1	Rubella_Liaison	110	132	105	115	109	120	1,00	1,20	0,95	1,05	0,99	1,09
1.2	Rubella_Siemens Spec.IgG Candida albicans	200,00	200,00	190,00	190,00	130,00	150,00	1,00	1,00	0,95	0,95	np	0,75
1.3	Rubella_Liaison	135,00	152,00	136,00	143,00	128,00	133,00	1,00	1,13	1,01	1,06	0,95	0,99
2.1	Rubella_Liaison	63,10	60,80	50,10	45,30	54,20	55,60	1,00	0,96	0,79	0,72	0,86	0,88
2.2	Rubella_Siemens Anti-streptokokna DNA-za	77,00	110,00	73,00	62,00	70,00	110,00	1,00	np	0,95	0,81	0,91	1,43
2.4	Celokupni IgG	362,00	357,00	341,00	354,00	342,00	332,00	1,00	0,99	0,94	0,98	0,94	0,92
2.5	Celokupni IgM	11,50	11,40	11,30	11,00	11,60	11,40	1,00	0,99	0,98	0,96	1,01	0,99
2.6	Celokupni IgE	0,78	0,78	0,78	0,71	0,80	0,76	1,00	1,00	1,00	0,91	1,03	0,98
3.1	Rubella_Liaison	43,10	38,90	45,70	41,60	40,00	50,40	1,00	0,90	1,06	0,97	0,93	1,17
3.2	Rubella_Siemens Spec.IgG Candida albicans	88,00	72,00	82,00	95,00	84,00	79,00	1,00	0,82	0,93	1,08	0,95	0,90
3.3	Celokupni IgE	150,00	165,00	166,00	167,00	419,00	154,00	1,00	1,10	1,11	1,11	np	1,03
3.7	Spec.IgE Phleum pratense	247,00	225,00	218,00	228,00	223,00	239,00	1,00	0,91	0,88	0,92	0,90	0,97
3.8	Rubella_Liaison	35,90	37,40	36,50	34,20	32,80	34,80	1,00	1,04	1,02	0,95	0,91	0,97
4.1	Rubella_Liaison	189,00	183,00	207,00	179,00	170,00	159,00	1,00	0,97	1,10	0,95	0,90	0,84
4.2	Rubella_Siemens	220,00	270,00	230,00	240,00	250,00	250,00	1,00	1,23	1,05	1,09	1,14	1,14
5.1	Rubella_Liaison	280,00	293,00	288,00	255,00	263,00	269,00	1,00	1,05	1,03	0,91	0,94	0,96
5.2	Rubella_Siemens	280,00	290,00	340,00	250,00	250,00	250,00	1,00	1,04	1,21	0,89	0,89	0,89
6.1	Rubella_Liaison	39,50	45,80	39,50	44,70	50,40	46,50	1,00	1,16	1,00	1,13	np	1,18
6.2	Rubella_Siemens	74,00	58,00	63,00	68,00	71,00	63,00	1,00	0,78	0,85	0,92	0,96	0,85
7.1	Rubella_Liaison	24,20	23,90	23,70	24,80	23,80	21,20	1,00	0,99	0,98	1,02	0,98	0,88
7.2	Rubella_Siemens	35,00	39,00	43,00	29,00	36,00	43,00	1,00	1,11	1,23	0,83	1,03	1,23
8.1	Rubella_Liaison	57,10	53,00	53,90	50,40	57,60	44,40	1,00	0,93	0,94	0,88	1,01	0,78
8.2	Rubella_Siemens	82,00	68,00	66,00	73,00	98,00	120,00	1,00	0,83	0,80	0,89	1,20	1,46
8.9	Tetanus	1,88	2,00	1,82	1,96	1,51	1,82	1,00	1,06	0,97	1,04	0,80	0,97
9.1	Rubella_Liaison	72,90	65,60	68,50	68,10	75,20	62,10	1,00	0,90	0,94	0,93	1,03	0,85
9.2	Rubella_Siemens	120,00	140,00	96,00	97,00	96,00	110,00	1,00	1,17	0,80	0,81	0,80	0,92

*np –ni podatka, osamela vrednost izločena iz statistične obravnave

Se nadaljuje

Nadaljevanje

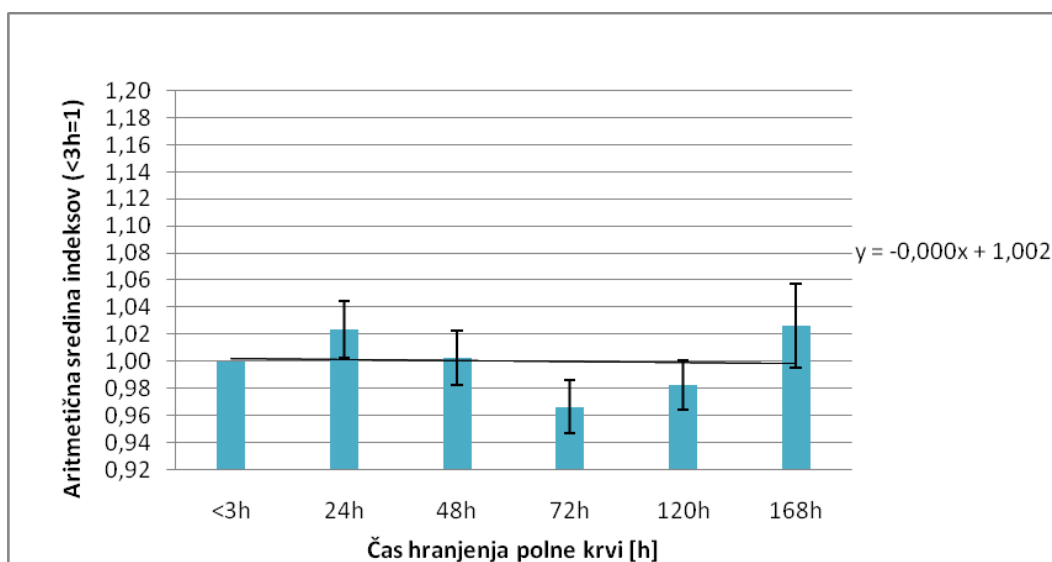
Preglednica 13: Prikaz izmerjenih vrednosti specifičnih in celokupnih protiteles v polni krvi, hranjeni v epruvetah z rumenim zamaškom, pri temperaturi 4 °C in izračuni njihovih indeksov (< 3 h = 1)

oznaka vzorcev	Specifična protitelesa + razredi imunoglobulinov	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas	čas
		hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenj a polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h	hranjenja polne krvi <3 h	hranjenja polne krvi 24 h	hranjenja polne krvi 48 h	hranjenja polne krvi 72 h	hranjenja polne krvi 120 h	hranjenja polne krvi 168 h
10.1	Rubella_Liaison	59,20	59,30	65,20	63,70	57,00	60,30	1,00	1,00	1,10	1,08	0,96	1,02
10.2	Rubella_Siemens	70,00	80,00	80,00	100,00	76,00	71,00	1,00	1,14	1,14	np	1,09	1,01
11.1	Rubella_Liaison	75,50	75,40	79,70	65,70	78,00	83,60	1,00	1,00	1,06	0,87	1,03	1,11
11.2	Rubella_Siemens	120,00	130,00	120,00	120,00	120,00	150,00	1,00	1,08	1,00	1,00	1,00	1,25
12.1	Rubella_Liaison	158,00	154,00	177,00	156,00	170,00	187,00	1,00	0,97	1,12	0,99	1,08	1,18
12.2.	Rubella_Siemens	110,00	140,00	130,00	140,00	140,00	140,00	1,00	1,27	1,18	1,27	1,27	1,27

***np** –ni podatka, osamela vrednost izločena iz statistične obravnave.

Preglednica 14: Vrednosti statističnih parametrov indeksov ($< 3 \text{ h} = 1$) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruveh z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

	čas hranjenja polne krvi < 3 h	čas hranjenja polne krvi 24 h	čas hranjenja polne krvi 48 h	čas hranjenja polne krvi 72 h	čas hranjenja polne krvi 120 h	čas hranjenja polne krvi 168 h
X	1,00	1,02	1,00	0,97	0,98	1,03
SD	0,00	0,12	0,11	0,11	0,10	0,18
KV%	0,0	11,6	11,1	11,7	10,6	17,1
ŠT. VZORCEV	32	31	32	31	29	32
SE	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03



Slika 12: Prikaz standardnih napak in vrednosti aritmetičnih sredin indeksov ($< 3 \text{ h} = 1$) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruveh z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Iz slike 12 lahko razberemo zelo rahlo padanje trendne črte aritmetičnih sredin indeksov ($< 3 \text{ h} = 1$) glede na čas hranjenja polne krvi v epruveh z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Aritmetična sredina pri času hranjenja polne krvi 168 h je višja od aritmetične sredine časa hranjenja polne krvi $< 3 \text{ h}$ za 0,03 enote. Tolikšna pa je tudi standardna napaka pri času hranjenja polne krvi 168 h, medtem ko je pri vseh ostalih časih, razen pri času hranjenja polne krvi $< 3 \text{ h}$, standardna napaka 0,02 enoti. Koeficient variabilnosti je okoli 11 %, razen pri času hranjenja polne krvi 168 h, ki je 17,1 %.

Za preverjanje normalnosti smo uporabili Kolmogorov Smirnov test, stopnja tveganja $\alpha = 0,05$. Vrednost p je bila pri vseh časih hranjenja polne krvi večja od α , kar pomeni, da so podatki normalno porazdeljeni.

S pomočjo T-testa smo v Excelu preverili razlike med aritmetičnimi sredinami pri dveh neodvisnih vzorcih pri času hranjenja polne krvi < 3 h (matrika 1) in ostalimi časi hranjenja polne krvi 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h (matrika 2), da bi ugotovili, pri katerem času hranjenja polne krvi pride do signifikantnih razlik. Postavili smo ničelno domnevo, da sta aritmetični sredini matrike 1 in matrike 2 enaki.

Preglednica 15: Rezultati T-testa indeksov (< 3 h = 1) specifičnih in celokupnih protiteles glede na čas hranjenja polne krvi v epruvetah z rumenim zamaškom z gelom, pri temperaturi 4 °C

	čas hranjenja polne krvi < 3 h	čas hranjenja polne krvi 24 h	čas hranjenja polne krvi 48 h	čas hranjenja polne krvi 72 h	čas hranjenja polne krvi 120 h	čas hranjenja polne krvi 168 h
p vrednost	/	0,284	0,899	0,107	0,377	0,404

Vrednosti p pri T-testu so pri vseh časih hranjenja polne krvi večje od $\alpha = 0,05$, kar pomeni, da ničelno domnevo potrdimo. Glej preglednico 15.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

O stabilnosti protiteles v polni krvi je bilo narejenih zelo malo študij v primerjavi s stabilnostjo protiteles v človeškem serumu. V literaturi se podatki glede stabilnosti protiteles istih razredov v serumu med seboj razlikujejo, kar je razvidno iz preglednic 3 in 4. Podatki se med seboj lahko razlikujejo zaradi različnih metod merjenja in zaradi različnega pristopa k raziskavi (drugačen čas hranjenja, temperatura, embalaža, vsi vzorci niso testirani v isti seriji).

V nadaljnji razpravi bomo ločeno obravnavali rezultate meritev v vzorcih iz epruвет z rdečim zamaškom, hranjenih pri temperaturi 26 °C, ter rezultate meritev v vzorcih iz epruвет z rumenim zamaškom z gelom, hranjene pri temperaturi 4 °C. Teh dveh skupin vzorcev ni smiselno primerjati neposredno, ker se razlikujejo v več spremenljivkah (dve različni temperaturi in dve različni embalaži).

5.1 VZORCI V EPRUVETAH Z RDEČIM ZAMAŠKOM BREZ GELA, HRANJENI PRI TEMPERATURI 26 °C

Standard NCCLS H18-A3 priporoča, da se serum ali plazma od krvnih celic loči najhitreje, v kolikor je to mogoče, razen če so študije pokazale, da podaljšan stik seruma ali plazme s krvnimi celicami nima vpliva na rezultate merjenja analita. Priporoča tudi maksimalno 2-urni kontakt seruma in krvnih celic (NCCLS H18-A3, 2004). Ker o stabilnosti protiteles v polni krvi ni bilo narejenih veliko študij, smo se odločili, da preverimo, v kolikšem času je stik seruma s krvnim strdkom pri temperaturi 26 °C še primeren za merjenje protiteles. To smo naredili z namenom, da ne bi po nepotrebnem zavrnila še primerne vzorce polne krvi za testiranje protiteles, katerih transport do laboratorija je daljši kot priporoča NCCLS H18-A3.

V raziskavi smo spremljali in merili koncentracije protiteles pri časih hranjenja polne krvi < 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h. Meritev pri časih hranjenja polne krvi 96 h in 144 h

niso bile vključene v raziskavo z namenom, da darovalcu krvi le-te ne bi odvzeli še več. Za vsak čas hranjenja polne krvi smo izmerili 32 vzorcev. Rezultate smo preračunali v indekse in z njimi nadaljevali statistično obdelavo.

V objavljeni literaturi, ki smo jo našli, so podatki za stabilnost protiteles IgG in IgM v polni krvi pri temperaturi 25 °C večji od 7 dni (WHO, 2002), zato smo se odločili, da jih vključimo v isto statistično obdelavo, saj smo testirali stabilnost protiteles le do časa hranjenja polne krvi 168 h. Prav tako smo v isto statistično obdelavo vključili protitelesa IgE. Stabilnosti protiteles posameznih razredov, razen IgG, nismo določili, ker smo imeli premalo količino vzorcev, da bi lahko v vseh vzorcih merili vse razrede imunoglobulinov. Celotni IgM je bil merjen samo pri enem darovalcu krvi, in sicer z metodo nefelometrije (2.6.). Celotni IgE je bil prav tako merjen samo pri enem darovalcu krvi, vendar z dvema različnima metodama. V končno statistično obdelavo smo torej vključili rezultate merjenj razredov Ig (IgG, IgM in IgE) ter specifičnih protiteles IgG in IgE.

Po ločitvi seruma od krvnih celic (po protokolu iz poglavja 3.2.2) smo najprej vizualno pregledali vzorce na prisotnost hemolize, saj bi le-ta lahko vplivala na rezultate merjenja. Hemolizo smo opazili pri času hranjenja polne krvi 72 h, in sicer pri 41 % vzorcev, od tega rahlo hemolizo pri 33 % in srednjo hemolizo pri 8 % vzorcev. Pri 8 % pojav srednje hemolize ni nujno odvisen od pogojev hranjenja, ampak je lahko posledica travmatičnega odvzema krvi ali nepopolne izhlapelosti etanola pri razkuževanju mesta odvzema. Pri daljših časih hranjenja polne krvi smo opazili hemolizo pri vseh vzorcih, in sicer srednjo hemolizo pri času hranjenja polne krvi 120 h ter močno hemolizo pri času hranjenja polne krvi 168 h. Pri časih hranjenja polne krvi manj kot 72 h hemolize vizualno nismo opazili. Da bi lahko še natančneje določili čas nastanka hemolize pri večini vzorcev, bi morali vizualno spremljati rezultate še pri času hranjenja 96 h. Prav tako bi morali za prehod iz srednje do močne hemolize spremljati še rezultate pri času hranjenja polne krvi 144 h. Vizualno določanje hemolize je subjektivna metoda, zato bi lahko druga oseba drugače vrednotila intenziteto hemolize.

Po pričakovanjih so vrednosti aritmetičnih sredin indeksov ($< 3 = 1$) padale glede na čas hranjenja polne krvi. Z izračunom SD smo pridobili podatke o razpršenosti. Pri vseh časih

hranjenja polne krvi je bil SD znotraj 0,18, kar pomeni, da so bile vrednosti indeksov dokaj zgoščene okoli aritmetične sredine. S pomočjo T-testa smo določili, pri katerem času hranjenja polne krvi je vzorec še primeren za merjenje protiteles, pri čemer ne bi prišlo do signifikantnih odstopanj pri rezultatih merjenja. Izkazalo se je, da se vrednost aritmetične sredine indeksov pri času hranjenja polne krvi 168 h statistično razlikuje od vrednosti aritmetične sredine indeksov pri času hranjenja polne krvi < 3 h, saj je bila vrednost p 0,015, kar je nižje od intervala zaupanja, ki smo ga postavili pri 0,05. Tudi v tem primeru ne moremo točno določiti stabilnosti protiteles v polni krvi, saj le-teh nismo merili pri času hranjenja polne krvi 144 h, ki je lahko mejni čas. Trdimo lahko samo, da je serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 120 h, še primeren za merjenje protiteles, medtem ko serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 168 h, ni več primeren za testiranje. Torej, če bi transport polne krvi pri $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ trajal 7 dni, tega vzorca ne bi smeli sprejeti.

5.2 VZORCI V EPRUVETAH Z RUMENIM ZAMAŠKOM Z GELOM, HRANJENI PRI TEMPERATURI $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Za dodatno raziskavo smo se odločili, ker nas je zanimalo, ali je serum, ki je v stiku z ločilnim gelom 168 h, pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ še primeren za kvantitativno določevanje protiteles, saj proizvajalec epruвет za vakuumski odvzem krvi, Becton, Dickinson and Company, odsvetuje hranjenje in kasnejšo analizo v epruветah s serijsko številko 367953.

V raziskavi smo spremljali in merili vzorce pri časih hranjenja polne krvi < 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h. Meritve pri časih hranjenja polne krvi 96 h in 144 h niso bile vključene v raziskavo. Po odvzemu seruma, ločenega z gelom od krvnega strdka (po protokolu iz poglavja 3.2.2), in pred meritvami smo vzorce vizualno pregledali na prisotnost hemolize. Hemoliza ni bila prisotna pri nobenem času hranjenja polne krvi, saj se je gel pri centrifugiranju umestil med serum in krvni strdek ter s tem vzpostavil trdno prepreko med obema. Za vsak čas hranjenja polne krvi smo izmerili 32 vzorcev. Prav tako smo v isto statistično obdelavo vključili protitelesa IgG (specifična in celokupna), IgE (specifična in celokupna) ter IgM. Rezultate smo preračunali v stalne indekse in z njimi nadaljevali statistično obdelavo.

Pri preverjanju prisotnosti osamelih vrednosti indeksov se je poleg ostalih osamelcev pojavil še ekstremni osamelec pri času hranjenja polne krvi 120 h. Njegova vrednost indeksa je bila 2,79, medtem ko so bile druge vrednosti približno 1. Pojavil se je pri darovalcu 3, in sicer pri meritvi specifičnih protiteles IgG proti *Candida* spp. Isti vzorec smo dvakrat testirali, misleč, da je prišlo do laboratorijske napake, vendar se vrednost ni razlikovala od prvotne izmerjene vrednosti. Zavrgli smo tudi možnost zamenjave vzorcev z drugo osebo, saj je bil isti vzorec z oznako 3.3. pri času hranjenja polne krvi 120 h testiran še z drugimi testi in v teh primerih ni bistveno odstopal od povprečja. Teoretično bi to lahko razložili tako, da se je vzorec nekje med postopkom kontaminiral samo s specifičnimi protitelesi IgG proti *Candida* spp. V takšnem primeru vzorec ne bi vplival na rezultate merjenja pri ostalih razredih protiteles. Takšna kontaminacija je pri izvedbi testa zelo malo verjetna, zato tako velikega odstopanja še vedno ne znamo razložiti. Ekstremni osamelec smo poleg ostalih osamelcev izključili iz nadaljnje statistične obdelave.

Vrednosti aritmetične sredine indeksov ($< 3 = 1$), sodeč po trendni črti, rahlo padajo glede na čas hranjenja polne krvi ($y = -0,000x + 1,002$). Aritmetična sredina pri času hranjenja polne krvi 168 h je višja od aritmetične sredine časa hranjenja polne krvi < 3 h za 0,03 enote. Tolikšna je tudi njena standardna napaka, zato ima formula trendne črte še vedno negativen predznak. Razpršenost podatkov, razvidna iz SD, se pri vseh časih hranjenja polne krvi giblje okoli $0,11 \pm 0,1$, razen pri času hranjenja polne krvi 168 h, ki je 0,18. S T-testom smo preverili, če je prišlo pri katerem času hranjenja polne krvi do signifikantnih razlik. Ugotovili smo, da so vse vrednosti p večje od intervala zaupanja 0,05, torej se vrednosti aritmetičnih sredin med časi hranjenja polne krvi statistično ne razlikujejo. Zato lahko trdimo, da je stabilnost protiteles v serumu, ločenim z gelom od krvnih celic, vsaj 168 h. Da bi točno določili čas stabilnosti protiteles, bi morali v raziskavo vključiti še daljše čase hranjenja.

5.3 SKLEPI

- Hemoliza se pojavi ob 72-urnem stiku seruma s krvnimi celicami, pri temperaturi 26 °C.
- Srednja hemoliza je prisotna pri 120-urnem stiku seruma s krvnimi celicami, pri temperaturi 26 °C.
- Močna hemoliza je prisotna pri 168-urnem stiku seruma s krvnimi celicami, pri temperaturi 26 °C.
- Serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 120 ur, pri temperaturi 26 °C, je še ustrezen za merjenje protiteles.
- Serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 168 ur, pri temperaturi 26 °C, ni več ustrezen za merjenje protiteles.
- Serum, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic 168 ur in hranjen v isti epruveti pri temperaturi 4 °C, je še ustrezen za merjenje protiteles.

6 POVZETEK

Protitelesa so glikoproteini, ki specifično spoznajo in odstranijo antigene. Prisotni so na površini limfocitov B, kjer so receptorji za specifične antigene in kot prosta protitelesa, ki jih izločajo plazmatke. Imunoglobuline najdemo v krvi, v limfni tekočini in drugih telesnih tekočinah. Pri človeku poznamo pet različnih razredov protiteles in sicer IgA, IgD, IgE, IgG in IgM, ki se med seboj razlikujejo po velikosti, zgradbi in po vlogi, ki jo imajo v imunskem sistemu. Visoka specifičnost reakcij antigen-protitelo je omogočila razvoj različnih imunskih preskusov, ki jih lahko uporabimo za določevanje navzočnosti protiteles ali antigena. Taki preskusi so tudi bistvenega pomena za diagnozo bolezni, za spremljanje ravni humoralnega imunskega odziva in istovetenje biološko in medicinsko pomembnih molekul. Ti preskusi se razlikujejo po hitrosti izvedbe in po občutljivosti. Nekateri so samo kvalitativni, drugi pa kvantitativni (Vozelj, 2000). Da so meritve zanesljive, morajo biti protitelesa v vzorcu stabilna. Največkrat se protitelesa testirajo v krvnem serumu. Protitelesa IgA, IgE, IgG in IgM so v serumu stabilna sedem dni pri 4 °C, sobni temperaturi in pri 30 °C (Young, 2007). V laboratorij v veliko primerih prispe vzorec kot polna kri. O stabilnosti protiteles v polni krvi ni navedenih veliko podatkov, zato smo se odločili za raziskavo.

V diplomski nalogi smo želeli določiti stabilnost protiteles v polni krvi, hranjeni v epruveh z rdečim zamaškom pri temperaturi 26 °C. Preverili smo tudi stabilnost protiteles v serumu, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic in hranjen v isti epruvi pri temperaturi 4 °C. V teh dveh raziskavah smo spremljali in merili vzorce pri časih hranjenja polne krvi < 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h in 168 h. Za vsak čas hranjenja smo izmerili 32 vzorcev.

Ugotovili smo, da je serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 120 h pri temperaturi 26 °C, še primeren za merjenje protiteles, medtem ko serum, ki je bil v kontaktu s krvnim strdkom 168 h pri temperaturi 26 °C, ni več primeren za merjenje protiteles. Torej, če bi transport polne krvi trajal 7 dni pri temperaturi 26 °C, bi ta vzorec zavrnil. Prvi pojav hemolize smo opazili pri času hranjenja polne krvi 72 h, in sicer pri 41 % vzorcev, od tega rahlo hemolizo pri 33 % in srednjo hemolizo pri 8 % vzorcev. Pri daljših časih hranjenja

polne krvi smo opazili hemolizo pri vseh vzorcih, in sicer srednjo hemolizo pri času hranjenja polne krvi 120 h ter močno hemolizo pri času hranjenja polne krvi 168 h.

Pri merjenju stabilnosti protiteles v serumu, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic in hranjen v isti epruveti pri temperaturi 4 °C, smo ugotovili, da je serum hranjen 168 h pri 4 °C še vedno primeren za merjenje koncentracije protiteles. Da bi točno določili čas stabilnosti protiteles, bi morali v raziskavo vključiti še daljše čase hranjenja.

Da bi lahko določili stabilnost protiteles v polni krvi pri 26 °C bi morali v raziskavo vključiti tudi čas hranjenja polne krvi 144 h, ki bi lahko bil mejni čas. Za natančno določitev stabilnosti protiteles v serumu, ki je bil ločen z gelom od krvnih celic in hranjen v isti epruveti pri temperaturi 4 °C, bi morali podaljšati čas hranjenja.

7 VIRI

Bennet C. W. 1980. Clinical serology. Springfield, C. C. Thomas Publisher: 304 str.

BD. 2012. Product catalogue. New Jersey, Becton, Dickinson and Company: 44 str.
<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8107> (november 2012)

Bush V., Cohen R. 2009. The evolution of evacuated blood collection tubes. Labnotes, 19, 1: 1-6
<http://www.bd.com/vacutainer/labnotes/Volume19Number1/>

Carraro P., Servidio G., Plebani M. 2000. Hemolyzed specimens: A reason for rejections or a clinical challenge?. Clinical Chemistry, 46: 306-307

DiaSorin. 2008. Instruction for use LIAISON® Rubella IgG (310720). Control Rubella (310721). Saluggia, Italia, DiaSorin: 1 str.

Guder W., Wisser H. 1990. Verhalten von Blutbestandteilen während des Transportes (Versand) und der Lagerung von Untersuchungsgut. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Klinisch Chemie, 21: 4-13

Guder W. G., Narayanan S., Wisser H., Zawta B. 2003. Samples: from the patient to the laboratory : The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 3rd ed. Weinheim, Wiley-VCH: 106 str.

Hawkins R.C. 2010. Phlebotomy site haemolysis rates vary inversely with workload. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 48, 7: 1049-1051

IMI. 2012. Katalog preiskav. Ljubljana, Medicinska fakulteta. Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: baza podatkov
<http://www.imi.si/diagnosticna-dejavnost/preiskave> (november 2012)

Ishizaka K., Ishizaka T., Lee E.H. 1970. Biologic function of the Fc fragments of E myeloma protein. *Immunochemistry*, 7, 8: 687–702

ISO 15189. Specifies requirements for quality and competence particular to medical laboratories, 2nd ed. 2007: 59 str.

Johansson S.G. 2004. ImmunoCAP® specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4, 3: 273-279

Kabat E. A. 1976. Structural concepts in immunology and immunochemistry. New York, Holt, Rinehart and Winston: 109-119

Lippi G., Blanckart N., Bonini P., Green S., Kitchen S., Palicka V., Vassault A.J., Plebani M. 2008. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine*, 46: 764-772

LLopis M.A., Alvarez V., Martínez-Brú C., Gómez R., Barba N., Ibarz M., Cortés M., Ventura M., Alsina M.J. 2011. Quality assurance in the preanalytical phase. V: Applications and experiences of quality control. Ivanov O. (ed.). Rijeka, InTech: 185-204

NCCLS H18-A3. Procedures for the handling and processing of blood specimens; approved guideline. 3rd ed. 2004: 52 str.

NCCLS I/LA18-A2. Specifications for immunological testing for infectious diseases; approved guideline. 2nd ed. 2001: 67 str.

Pepys J., Roth A., Carroll K.B. 1975. RAST, skin and nasal tests and the history in grass pollen allergy. *Clinical Allergy*, 5, 4: 431-442

Racaniello V. 2009. Adaptive immune defenses:antibodies. *Virology blog*: 1 str.
[http://www.virology.ws/2009/07/22/adaptive-immune-defenses-antibodies/\(november 2012\)](http://www.virology.ws/2009/07/22/adaptive-immune-defenses-antibodies/(november%2012))

Rioja-Rubén G., Alsina-Kirchner M.J., Funes-Virtudes A., Meseguer-Nuria B., Cortes-Rius M., Llopis-Díaz M.A., Martínez-Bru, C. 2009. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. Publicado en Laboratorio Clinico, 2, 4:185-195

Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. 1998. Immunology. 5th ed. London, Mosby: 423 str.

Saleem S., Mani V., Chadwick M.A., Creanor S., Ayling R.M. 2009. A prospective study of causes of haemolysis during venepuncture: tourniquet time should be kept to a minimum. Annals of Clinical Biochemistry, 46: 244-246

Štrukelj B., Kos J. 2007. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.

Taylor R. N., Huong A. Y., Fulford K. M., Przybyszewski V. A., Hearn T. L. 1979. Quality control for immunologic tests. Center for Disease Control, Atlanta, Ga.: 55-58

Thomas L. 1998. Immunoglobulins. V: Clinical laboratory diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory. Thomas L. (ed.). Frankfurt, TH-Books: 667-678

Tomalka J., Ganesan S., Azodi E., Patel K., Majmudar P., Hall B.A., Fitzgerald K.A., Hise A.G. 2011. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. PLoS Pathogens, 7, 12: e1002379, doi: 10.1371/journal.ppat.1002379: 14 str.

Töpfer G. 1981. Untersuchungen zur Stabilität von 11 Serumproteinen in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen des Serums. Zeitschrift für medizinische Laboratoriumsdiagnostik, 22: 284-295

Töpfer G., Lutze G., Sauer K., Friedel G., Hornig F., Kühnert T., et al. 2000. Einfluß der Citratkonzentration in Blutentnahmeröhrchen auf hämostaseologische Meßgrößen. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 24: 162-168

Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. 1. izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 552 str.

Wang W., Singh S., Zeng D. L., King K., Nema S. 2007. Antibody structure, instability and formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 1: 1-26

WHO. 2002. *Use of anticoagulants in diagnostic Laboratory investigations*. New Delhi, World Health Organization: 64 str.

http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_DIL_LAB_99.1_Rev.2.pdf (november 2012)

WHO. 2006. *Quality assurance in serology*. New Delhi, World Health Organization: 1str.

http://www.searo.who.int/en/Section10/Section17/Section53/Section375_1189.htm
(november 2012)

Young D.S. 2007. *Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests*. 3rd ed. Washington DC, AACC Press, cop: 1982 str.

Zhang D.J., Elswick R.K., Miller W.G., Baily J.L. 1998. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. *Clinical_Chemistry*, 44: 1325-1333

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof.dr. Miroslavu Petrovcu za prevzem mentorstva in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se znan. svetnici dr. Branka Wraber za prevzem somentorstva, potrpežljivo vodenje ter vse nasvete pri delu v laboratoriju in pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Alojzu Ihanu za pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se moji družini in prijateljem, ki so me vzpodbujali in nudili moralno podporo tekom študija.