

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA STARIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA STARIČ

**VZPOSTAVITEV IN PRIMERJALNO VREDNOTENJE ANALIZNEGA SISTEMA
ZA SEROLOŠKO TESTIRANJE NA OZNAČEVALCE OKUŽB S HBV, HCV, HIV IN
BAKTERIJO *TREPONEMA PALLIDUM***

**ESTABLISHMENT AND COMPARATIVE EVALUATION OF AN ANALYTICAL
SYSTEM FOR SEROLOGICAL TESTING OF HBV, HCV, HIV AND *TREPONEMA
PALLIDUM* INFECTION MARKERS**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom dr. Adele Fratnik Steyer, univ. dipl. mikr..

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., za vse nasvete in usmerjanje v pravo smer pri pisanju magistrske naloge. Zahvala gre prav tako somentorici dr. Adeli Fratnik Steyer, univ. dipl. mikr., Mateji Ozmec, dipl. inž. kem., ostalim zaposlenim na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino in g. Jerneju Palčiču za vse strokovne nasvete ter pomoč pri samem izvajanju magistrske naloge.

Največja zahvala pa gre družini in fantu Mihi za vso podporo in spodbujanje na poti do zastavljenega cilja.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorice dr. Adele Fratnik Steyer, univ. dipl. mikr.

Katja Starič

Podpis:

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega

Član magistrske komisije: doc. dr. Bojan Doljak

Ljubljana, 2017

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	1
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD.....	5
1.1 UREJENOST TESTIRANJA KRVI KRVODAJALCEV V REPUBLIKI SLOVENIJI	5
1.2 DOLOČANJE POVZROČITELJEV BOLEZNI V DAROVANI KRVI.....	6
1.2.1 VIRUS HEPATITISA B (HBV).....	6
1.2.1 VIRUS HEPATITISA C (HCV).....	9
1.2.3 VIRUS ČLOVEŠKE IMUNSKE POMANJKLJIVOSTI (HIV).....	10
1.2.4 Treponema pallidum	12
1.2.5 POMEN DOLOČANJA OZNAČEVALCEV POVZROČITELJEV OKUŽB ..	12
1.3 METODE ZA IZVEDBO PRESEJALNEGA TESTIRANJA	13
1.3.1 SEROLOŠKO TESTIRANJE.....	13
1.3.2 MOLEKULSKO-BIOLOŠKO DOLOČANJE OZNAČEVALCEV OKUŽB...	15
1.3.3 ALGORITEM TESTIRANJA	16
1.4 PRIMERJAVE ANALITSKIH METOD	16
1.4.1 OPREDELITEV UPORABLJENIH IZRAZOV	17
2 NAMEN DELA.....	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 BIOLOŠKI VZORCI.....	20
3.1.1 VZORCI KRVODAJALCEV	20
3.1.2 SKUPINE POSEBNIH VZORCEV	20
3.1.3 REAKTIVNI KLINIČNI VZORCI	21
3.2 ZUNANJE KONTROLE IN SEROKONVERZIJSKA PANELA.....	21
3.3 TESTIRANJE VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ADVIA Centaur XP System.....	22
3.3.1 REAGENTI.....	22
3.3.1.1 Reagenti za testiranje površinskega antigena HBV.....	22
3.3.1.2 Reagenti za testiranje protiteles (IgG) proti HCV	23
3.3.1.3 Reagenti za testiranje antigena HIV in protiteles proti virusu človeške imunske pomanjkljivosti	24

3.3.1.4 Reagenti za določanje protiteles proti T. Pallidum.....	24
3.3.2 KALIBRATORJI	25
3.3.3 KONTROLE	25
3.3.4 PRINCIP TESTIRANJA Z ANALIZNIM SISTEMOM ADVIA Centaur XP ..	26
3.4 TESTIRANJE VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ABBOTT ARCHITECT i2000SR	29
3.4.1 REAGENTI.....	29
3.4.2 KALIBRATORJI	30
3.4.3 KONTROLE	30
3.4.4 PRINCIP MERJENJA VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ABBOTT ARCHITECT i2000SR	31
3.5 INTERPRETACIJA REZULTATOV	33
3.6 STATISTIČNE METODE	33
4. REZULTATI	37
4.1 SKUPINE POSEBNIH VZORCEV	37
4.2 REAKTIVNI KLINIČNI VZORCI.....	37
4.3 ZUNANJE KONTROLE IN SEROKONVERZIJSKA PANELA.....	38
4.3.1 ZUNANJE KONTROLE MEDLABORATORIJSKE PRIMERJAVE.....	38
4.3.2 SEROKONVERZIJSKA PANELA.....	39
4.4 MERITVE KONTROLNIH VZORCEV.....	40
4.4.1 MERITVE KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ADVIA Centaur XP	40
4.4.2 MERITVE KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ABBOTT ARCHITECT	40
4.5 VZORCI REDNIH KRVODAJALCEV	41
4.5.1 DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST	41
4.5.2 DODATNE STATISTIČNE PRIMERJAVE REZULTATOV	45
5 RAZPRAVA.....	69
6 SKLEP	74
7 LITERATURA	75
8 PRILOGE	78

KAZALO SLIK

Slika 1: Pojav DNK, Pt in Ag v krvi pri akutnem (A) in kroničnem (B) hepatitisu, povzeto po (6).	8
Slika 2: Pojav RNK in Pt v krvi, povzeto po (6).	10
Slika 3: Pojav RNK in Ag v krvi, povzeto po (6).	11
Slika 4: Shematski prikaz osnove kemiluminiscenčne imunske metode (CLIA) v primeru, ko je iskani analit antigen, prirejeno po (29).	14
Slika 5: Osnovni algoritem poteka presejalnega testiranja krvodajalcev na označevalce okužb v Republiki Sloveniji, povzeto po (1).	16
Slika 6: Analizni sistema ADVIA Centaur XP, Siemens, povzeto po (28).	27
Slika 7: Analizni sistem Abbott Architect, povzeto po (36).	32
Slika 8: Frekvenčna histograma posameznih vrednosti meritev istih vzorcev (N = 548), izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za HBsAg.	46
Slika 9: Grafični prikaz primerjanih vrednosti meritev HBsAg določenih s posameznim analiznim sistemom v istih vzorcih (N = 548).	48
Slika 10: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev (N = 548), opravljenih z obema analiznima sistemoma za HBsAg.	49
Slika 11: Grafični prikaz porazdelitev izmerjenih vrednosti istih vzorcev (N = 548) za HBsAg, izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede Abbott B – Abbott glede Siemens.	50
Slika 12: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določeni s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev (N = 548) opravljenih z analiznim sistemom Siemens, glede na analizni sistem Abbott za HBsAg.	51
Slika 13: Frekvenčna histograma, ki prikazujeta število posameznih vrednosti meritev istih vzorcev (N = 792), izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za Pt anti-HCV.	53
Slika 14: Grafična prikaza primerjanih vrednosti meritev protiteles anti-HCV določenih s posameznim analiznim sistemom v istih vzorcih (N = 792).	54
Slika 15: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev (N = 792), opravljenih z obema analizatorjema za anti-HCV.	55
Slika 16: Grafični prikaz porazdelitev vrednosti istih vzorcev (N = 792) za HCV izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede na Abbott, B – Abbott glede na Siemens.	56

Slika 17: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določeni s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev (N = 792), opravljenih z analiznim sistemom Siemens, glede na analizni sistem Abbott za anti-HCV.	57
Slika 18: Frekvenčna histograma, ki prikazujeta število posameznih vrednosti meritev istih vzorcev (N = 1.724), določenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za Ag/Pt HIV.	58
Slika 19: Grafična prikaza primerjanih vrednosti meritev Ag/Pt HIV v istih vzorcih (N = 1.724).	60
Slika 20: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev (N = 1.724), opravljenih z obema analiznima sistemoma za Ag/Pt HIV.	61
Slika 21: Grafični prikaz porazdelitev vrednosti istih vzorcev (N = 1.724) za Ag/Pt HIV, izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede na Abbott, B – Abbott glede na Siemens.	62
Slika 22: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določeni s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev (N = 1.724), opravljenih z analizatorjem Siemens, glede na analizator Abbott za Ag/Pt HIV.	63
Slika 23: Frekvenčna histograma, ki prikazujeta število posameznih vrednosti meritev istih vzorcev (N = 52), izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za anti-TP.	64
Slika 24: Grafična prikaza primerjanih vrednosti meritev protiteles proti <i>T.pallidum</i> v istih vzorcih (N = 52).	66
Slika 25: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev (N = 52) za anti-TP, opravljenih z obema analiznima sistemoma.	67
Slika 26: Grafični prikaz porazdelitev vrednosti istih vzorcev (N = 52), izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede na Abbott, B – Abbott glede na Siemens za anti-TP.	68
Slika 27: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določena s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev (N = 52), opravljenih z analiznim sistemom Siemens, glede na analizni sistem Abbott za anti-TP.	69

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Diagnostično pomembne vrednosti.....	33
Preglednica II: Prikaz števila analiziranih rezultatov.....	34
Preglednica III: Rezultati analize vzorcev OČKL.....	37
Preglednica IV: Prikaz rezultatov zunanje kontrole MCA pri določanju <i>T.pallidum</i>	39
Preglednica V: Primerjava občutljivosti analiznih sistemov pri merjenju vzorcev obeh serokonverzijskih panelov.....	40
Preglednica VI: Prikaz rezultatov testiranj na HBV med začetno reaktivnimi in ponovljeno reaktivnimi vzorci.....	41
Preglednica VII: Prikaz rezultatov testiranj prisotnosti HCV z začetno in ponovljeno reaktivnimi vzorci.....	42
Preglednica VIII: Prikaz rezultatov testiranj prisotnosti HIV začetno in ponovljeno reaktivnimi vzorci.....	43
Preglednica IX: Prikaz rezultatov testiranj prisotnosti <i>T.pallidum</i> z začetno in ponovljeno reaktivnimi vzorci.....	44
Preglednica X: Primerjava izračunanih specifičnosti med našimi rezultati in rezultati proizvajalcev.....	45
Preglednica XI: Rezultati dvostranskega neparnega t-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje meritev HBsAg, določenih z obema analiznima sistemoma.....	47
Preglednica XII: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri HBV; SD=standardni odklon. ...	48
Preglednica XIII: Rezultati dvostranskega neparnega T-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje meritev protiteles anti-HCV, določenih z obema analiznima sistemoma.	53
Preglednica XIV: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri HCV; SD=standardni odklon...	55
Preglednica XV: Rezultati dvostranskega neparnega t-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje meritev Ag/Pt HIV, določenih z obema analiznima sistemoma. .	59
Preglednica XVI: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri HIV; SD=standardni odklon. ...	61
Preglednica XVII: Rezultati dvostranskega neparnega T-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje protiteles anti- <i>T.pallidum</i> , določenih z obema analiznima sistemoma.	65
Preglednica XVIII: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri TP; SD=standardni odklon....	66

POVZETEK

Darovana kri krvodajalcev mora biti varna za vse, ki jo bodo prejeli, zato je nujno potrebno presejalno testiranje vseh vzorcev odvzete krvi na označevalce okužb z virusom hepatitisa B (HBV), virusom hepatitisa C (HCV), virusom človeške imunske pomankljivosti (HIV) in bakterijo *Treponema pallidum*, ki povzroča sifilis. V vzorcih plazme lahko s presejalnim testiranjem zaznamo antigenske determinante posameznih povzročiteljev bolezni ali pa specifična protitelesa nastala v okviru imunskega odziva darovalca, kar je odvisno od vrste okužbe. Pri hepatitisu B je to specifičen antigen, pri hepatitisu C in sifilisu protitelesa, pri virusu HIV pa tako antigeni kot protitelesa.

V okviru magistrskega dela, ki smo ga izvedli na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) v Ljubljani, smo najprej vzpostavili analizni sistem proizvajalca Siemens, nato pa primerjalno vrednotili rezultate seroloških testiranj na označevalce okužb s HBV, HCV, HIV in bakterijo *Treponema pallidum*, pridobljene z novim (Siemens) in obstoječim analizatorjem proizvajalca (Abbott). Meritve smo izvajali vzporedno, v istih vzorcih plazme krvodajalcev in rezultate primerjali z ustreznimi statističnimi testi, da bi ugotovili, ali lahko novi analizni sistem uvedemo v vsakdanjo laboratorijsko prakso. Poleg analiziranja vzorcev smo dnevno izvajali tudi kontrolo kakovosti testiranja ter opravili medlaboratorijsko primerjavo z zunanjimi kontrolami kakovosti. Testirali smo tudi nekaj posebnih skupin vzorcev, z namenom, da bi dobili dodatne informacije za zanesljivejšo primerjalno vrednotenje.

Poleg določitve specifičnosti posameznega testa s pomočjo kontingenčnih tabel 2x2, smo dobljene rezultate statistično primerjali tudi s t-testom, Bland-Altman testom, določanjem Pearsonovega koeficienta korelacije (povezanost) in krivuljami ROC. Ugotovili smo, da sta primerjana analizna sistema primerna za presejalno testiranje na označevalce okužb s HBV, HCV, HIV in bakterijo *Treponema pallidum* in da sta v veliki meri primerljiva, saj na podlagi statističnih analiz nismo dokazali, da bi bil eden od njiju bistveno boljši.

Ključne besede: krvodajalci, označevalci okužb, presejalno testiranje.

ABSTRACT

Donated blood must be safe for all potential receivers, therefore screening of markers for HBV, HCV, HIV and *Treponema pallidum* infections in all donated blood samples is necessary. Antigen determinants of individual pathogen or specific antibodies formed as immune response to them could be detected by screening of donor's plasma samples. In screening of hepatitis B, viral surface antigens are detected, in hepatitis C and syphilis antibodies, and for HIV the detection of both, antigens and antibodies, is possible.

In our work which was performed at the Blood transfusion centre of Slovenia in Ljubljana, firstly a new analytical system for serological testing was established. Further, a comparative evaluation of infectious markers serology testing results of blood donations was performed. Results from the newer analytical system (Siemens) were compared with results from the system which is in routine use in the laboratory (Abbott). The testing on analytical systems was performed in parallel with the same plasma samples of donated blood. After all tests were accomplished adequate statistics was used to find out if the Siemens analytical system could be introduced in everyday laboratory practice. Daily quality controls and interlaboratory comparisons we also performed. Some special groups of samples were tasted to gain some more information for a reliable comparative evaluation.

Besides determining specificities of both tests by using 2x2 tables, the results were compared by performing t-test and Bland-Altman test, as well as by determining Pearson's correlation coefficient and ROC curves. To sum up, the compared systems are suitable for screening for infectious markers and are largely comparable to each other, as we could not find any statistically significant differences that would indicate that one analytical system is fundamentally better than the other one.

Key words: blood donors, infection markers, screening.

SEZNAM OKRAJŠAV

AE – akridinijev ester

Ag – antigen

anti-HBs – protitelesa proti površinskemu antigenu hepatitisa B

CL – kontrolna meja (control limit)

CLIA – kemiluminiscenčna imunska metoda (ang. Chemiluminescence Immunoassay)

CMIA – kemiluminiscenčna imunska metoda z mikropelci (ang. Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)

DNK – deoksiribonukleinska kislina

EDTA – etilendiamintetraoetna kislina (ang. Ethylenediaminetetraacetic acid)

EIA – encimsko imunska metoda (ang. Enzyme ImmunoAssay)

HCV – virus hepatitisa C

HIV – virus človeške imunske pomanjkljivosti (ang. Human Immunodeficiency Virus)

HBsAg – površinski antigen hepatitisa B

HBV – virus hepatitisa B

IgG, IgM – imunoglobulin G, imunoglobulin M

LCL – spodnja kontrolna meja (lower control limit)

LIS – laboratorijski informacijski sistem

MMD – možni mrtvi darovalci

NAT – tehnologija pomnoževanja nukleinskih kislin (ang. Nucleic Acid Amplification Technology)

OBI – prikriti hepatitis B (occult hepatitis B infection)

OČKL – vzorci krvi darovalcev roženice, odvzeti po smrti

PCR – verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)

Pt – protitelo

RLU – relativne luminiscenčne enote (ang. Relative Light Units)

RNK – ribonukleinska kislina

ROC – krivulja diagnostične občutljivosti in specifičnosti (ang. Receiver Operating Characteristic Curve)

RS – Republika Slovenija

Št. – število

TMA – s transkripcijo posredovano pomnoževanje (ang. Transcription-Mediated Amplification)

TP – bakterija *Treponema pallidum*

TPPA – aglutinacija delcev *T.pallidum* (ang. Treponema pallidum Particle Agglutination)

UCL – zgornja kontrolna meja (upper control limit)

ZTM – Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

1 UVOD

Krvodajalstvo je pomemben del zdravstvenega sistema, saj z darovanjem krvi omogočajo primerno zdravljenje številnih bolnikov, zato je pomembno, da je darovana kri varna oz. da pri bolniku ne povzroči neželenih posledic, zato moramo preprečiti morebitne prenose okužb z darovalca na prejemnika. Pri tem je ključnega pomena presejalno testiranje na tiste označevalce okužb, ki so prisotni v splošni populaciji in bi lahko ogrozile varnost prejemnika. V Sloveniji odvzete enote krvi in komponente krvi, testiramo na označevalce okužb z virusom hepatitisa B, hepatitisa C, HIV in z bakterijo *Treponema pallidum*, ki povzroča sifilis. Dokazujemo bodisi antigenske determinante posameznih povzročiteljev bolezni, specifična protitelesa nastala med imunskim odzivom nanje ali pa njihove nukleinske kisline (1).

1.1 UREJENOST TESTIRANJA KRVI KRVODAJALCEV V REPUBLIKI SLOVENIJI

Zakon o preskrbi s krvjo (ZPKrv, Ur. list RS, št. 104/2006), pravilniki in priporočila Sveta Evrope opredeljujejo in urejajo standarde kakovosti in varnosti preskrbe s krvjo in krvnimi pripravki v RS in zagotavljajo visoko raven varstva bolnikov in njihovega zdravja. Zakon povzema evropsko zakonodajo skladno z Direktivo 2002/98/ES Evropskega parlamenta in s priporočili Sveta Evrope, katerega članica je Slovenija. Svet Evrope je ena izmed največjih evropskih ustanov, ki teži k izboljšanju življenja Evropejcev tudi na področju transfuzije krvi (2). Priporočila so osnova za Zakon o preskrbi s krvjo, ta pa določa, da je za zagotavljanje ustrezne kakovosti vsake odvzete enote in komponente krvi, odgovoren transfuzijski zavod ali transfuzijski center. Obseg testiranja predpiše minister pristojen za zdravje (3). Presejalno testiranje je postopek s katerim vnaprej izločimo vse okužene enote krvi in pripravke, ter tako preprečimo prenos bolezni. Od leta 1995 se v Republiki Sloveniji izvaja enotno testiranje po predpisanih nacionalnih algoritmih za presejalno testiranje krvi. Laboratorijske testne metode so se tekom let spreminjale oz. izboljševale v skladu s tehnološkim razvojem. Danes uporabljajo encimsko-immunske in kemiluminiscenčne metode za serološka testiranja in postopek TMA (s transkripcijo posredovano pomnoževanje) za neposredno določanje virusov. Vse nove metode predlaga in potrjuje Razširjeni strokovni kolegij za transfuzijsko medicino pri Ministrstvu za zdravje (1).

1.2 DOLOČANJE POVZROČITELJEV BOLEZNI V DAROVANI KRVI

1.2.1 VIRUS HEPATITISA B (HBV)

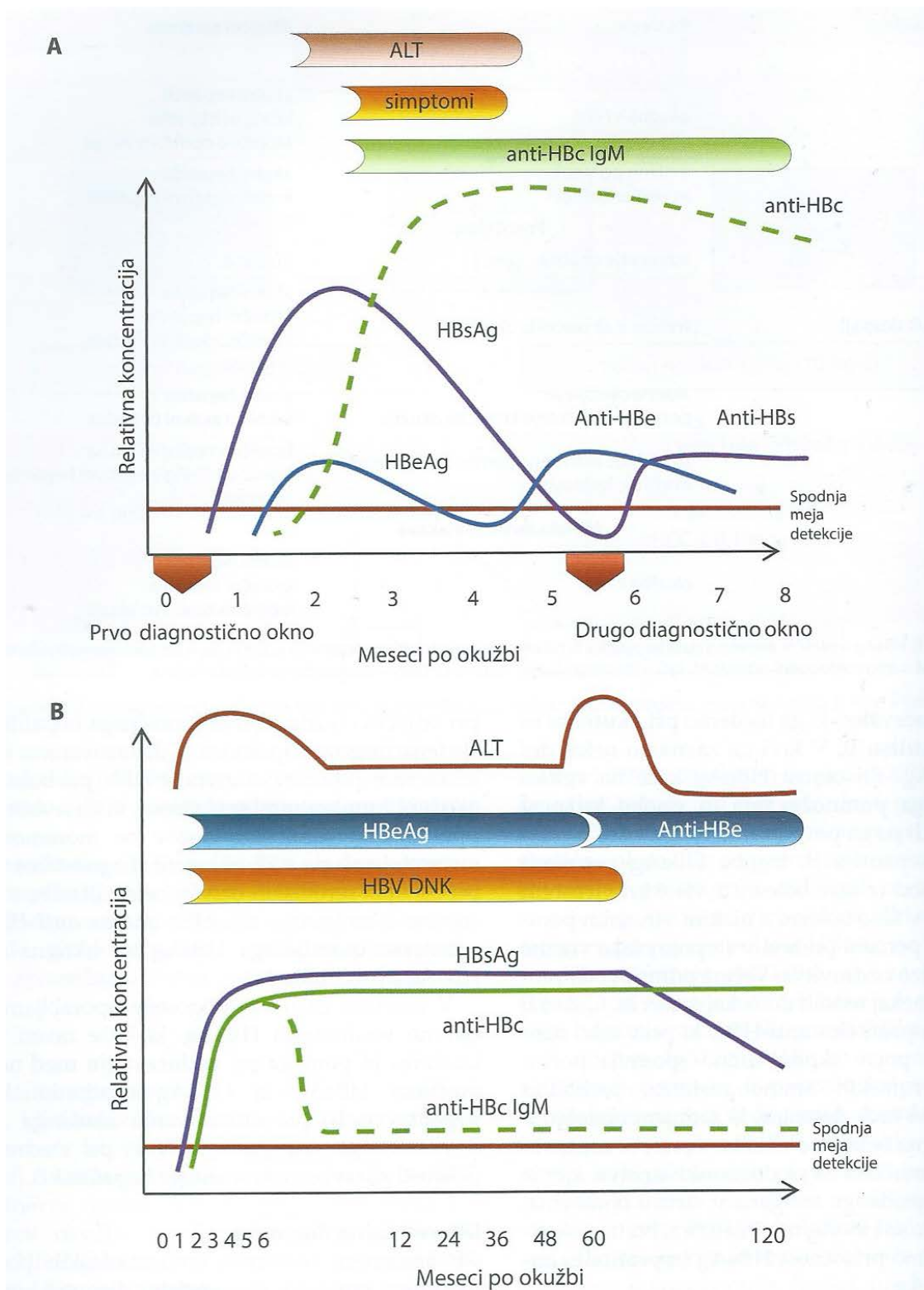
Hepatitis B je najbolj razširjen med vsemi hepatitisimi in je eden od glavnih vzrokov za smrt zaradi nalezljivih bolezni. Za njegovimi posledicami namreč umre več kot pol milijona ljudi letno, okuži pa se jih več kot 400 milijonov. Prenaša se preko krvi in drugih telesnih tekočin, okužbe pa lahko preprečimo s predhodnim cepljenjem. Velike koncentracije delcev HBV najdemo ravno v krvi, zato je prenos preko nje ali njenih pripravkov lahko hiter. Število potransfuzijskih hepatitisov B pa se je zaradi obveznega testiranja krvodajalcev na HBsAg, močno zmanjšalo (4).

HBV je majhen virus, ki ga sestavlja proteinska nukleokapsida in zunanja lipidna ovojnica, katere del je HBsAg. Njegova posebnost je, da vsebuje tako enovijačno kot dvovijačno kroglasto urejeno DNK (5). Poznamo 8 genotipov HBV, ki jih označujemo s črkami od A do H, nedavno pa so odkrili še nekaj novih. Zanje je značilna visoka stopnja mutacij. Nekatere virusne variante lahko povežemo z določenimi kliničnimi značilnostmi, npr. za genotip A je značilna nagnjenost h kronični obliki hepatitisa, za genotip C pa višja stopnja mutacij in bolj pogosto napredovanje v hujše stopnje bolezni jeter. Prav patogena raznolikost omenjenih genotipov je kriva za intenzivnost bolezni, napredovanje v cirozo jeter in razvoja raka jetrnih celic. Domnevajo, da so različni genotipi HBV geografsko različno razporejeni, izzovejo različno napredovanje bolezni in pogojujejo različne odzive na zdravljenje. Na našem ozemlju sta najbolj razširjena genotipa A in D (4).

Hepatitis B lahko bolniki prebolijo brez izraženih znakov, pri tretjini pa se razvije v akutno bolezen s prebavnimi težavami, utrujenostjo, slabostjo in s končnim pojavom zlatenice, ki lahko traja več tednov. Razvoj akutnega v kronični hepatitis je značilen za približno 10% bolnikov in je odvisen od starosti v času okužbe. Nevarnost nadaljnjega razvoja bolezni v cirozo jeter in razvoja raka jetrnih celic, se lahko poveča zaradi dodatnih dejavnikov tveganja.

V laboratoriju za presejalno testiranje krvodajalcev na ZTM določajo virusni protein HBsAg s kemiluminiscenčno-imunsko metodo, poleg tega pa lahko določajo še pet drugih virusnih označevalcev okužbe s HBV. Določanje HBsAg ima to prednost, da ga v krvi lahko zaznamo že od 2 do 7 tednov pred pojavom kliničnih znakov, medtem ko se protitelesa pojavijo kasneje, pri čemer pa ostanejo prisotna več let. HBsAg je prvi antigen,

ki se pojavi v krvi po okužbi s HBV, nato pa pri akutnih bolnikih po nekaj mesecih izgine, pri kroničnih pa običajno ostane prisoten celo življenje. V serumu določamo tudi koncentracijo DNK HBV, ki jo lahko dokažemo v 7 do 14 dnevih po okužbi (5). Na Sliki 1 vidimo, v katerem obdobju v krvi pri akutnem in pri kroničnem hepatitisu B lahko zaznamo DNK, protitelesa ter antigene HBV. S prvim diagnostičnim oknom je poimenovano obdobje pred pojavom HBsAg. Po tem, ko se pri akutni obliki pojavijo klinični simptomi, HBsAg postopoma izgine iz krvi, nato pa se kmalu pojavijo protitelesa anti-HBs (to je drugo diagnostično okno). Pri bolnikih z akutnim hepatitisom se v krvi najprej pojavijo Pt IgM anti-HBc. HBeAg v krvi zaznamo nekaj dni po pojavu HBsAg. Najbolj zanesljiv pokazatelj kužnosti bolnika je HBV DNK, saj jo v krvi zaznamo najprej in je pri bolnikih z akutnim hepatitisom prisotna v prvem in drugem diagnostičnem oknu (6).



Slika 1: Pojav DNK, Pt in Ag v krvi pri akutnem (A) in kroničnem (B) hepatitisu, povzeto po (6).
 Legenda: ALT= alanin-aminotransferaza, HBV DNK= koncentracija deoksiribonukleinske kisline HBV, anti-HBs= protitelesa proti površinskemu antigenu HBV, HBeAg= e antigen HBV, anti-HBc IgM= IgM protitelesa proti jedrnemu Ag, anti-HBc= protitelesa proti jedrnemu Ag.

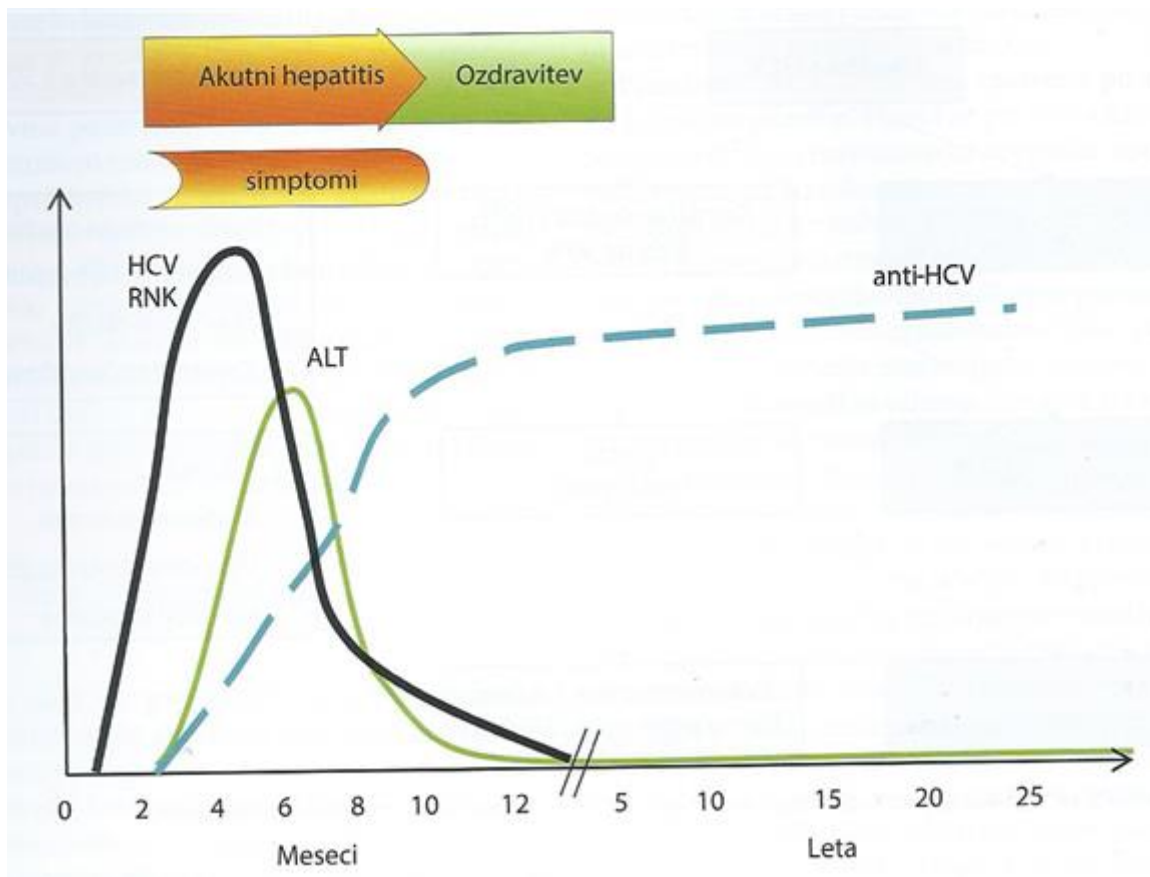
1.2.1 VIRUS HEPATITISA C (HCV)

S tem virusom je po svetu okuženih več kot 170 milijonov ljudi. Je eden od glavnih povzročiteljev kronične bolezni jeter, ciroze jeter in razvoja raka jetrnih celic. Prenša se večinoma parenteralno, prenosa pri spolnem odnosu in z matere na dojenčka pa sta redka. V časih pred uvedbo obveznega presejalnega testiranja krvi krvodajalcev, je bil HCV glavni razlog za nastanek potransfuzijskih hepatitisov, danes pa je takih primerov izjemno malo.

Poznamo 6 virusnih genotipov ter še več njihovih podtipov. Za HCV so značilne številne mutacije, ki nastajajo pri podvojevanju virusov z RNK genomom v okuženi osebi, kar predstavlja veliko oviro za izdelavo cepiva. Virus je kroglaste oblike, s premerom 50 – 60 nm, na njegovi površini pa so bodicam podobni izrastki. Sestavljen je iz nukleokapside z virusnim genomom RNK ter lipidne ovojnice s površinsko izraženimi proteini (5).

Okužba s HCV velikokrat poteka brez simptomov, pri čemer je največkrat prisotna le utrujenost, ki pa ni razložljiva. To je značilno predvsem za akutni hepatitis C, pri katerem ponavadi ne pride do sočasnega pojava zlatenice, pri več kot četrtini obolelih pa okužba spontano izgine. V nasprotnem primeru akutni hepatitis C lahko preide v kroničnega, pri katerem se lahko pojavi ciroza, v manjšem primeru pa tudi rak jetrnih celic.

V okuženi osebi se protitelesa anti-HCV pojavijo po 7 - 8 tednih in ostanejo prisotna celo življenje, medtem ko HCV RNK zaznamo v serumu že 2 tedna po okužbi. V vzorcih plazme krvodajalcev dokazujemo prisotnost protiteles anti-HCV z uporabo encimsko-imunskih testov. V primeru pozitivnega rezultata le-tega potrdimo s potrditvenimi imunoblot testi, trenutno potekajoče okužbe pa lahko dokazujemo z zelo občutljivimi molekularno-biološkimi metodami za določanje virusne RNK. Te metode uporabljamo za zanesljivo določitev okužbe s HCV tudi takrat, ko še ne pride do razvoja protiteles, to je v obdobju serološkega diagnostičnega okna (5). Na Sliki 2 lahko vidimo, v katerem obdobju v krvi lahko zaznamo RNK in protitelesa HCV.



Slika 2: Pojav RNK in Pt v krvi, povzeto po (6).

Legenda: ALT= alanin-aminotransferaza, HCV RNK= koncentracija ribonukleinske kisline virusa HCV, anti-HCV= protitelesa proti HCV.

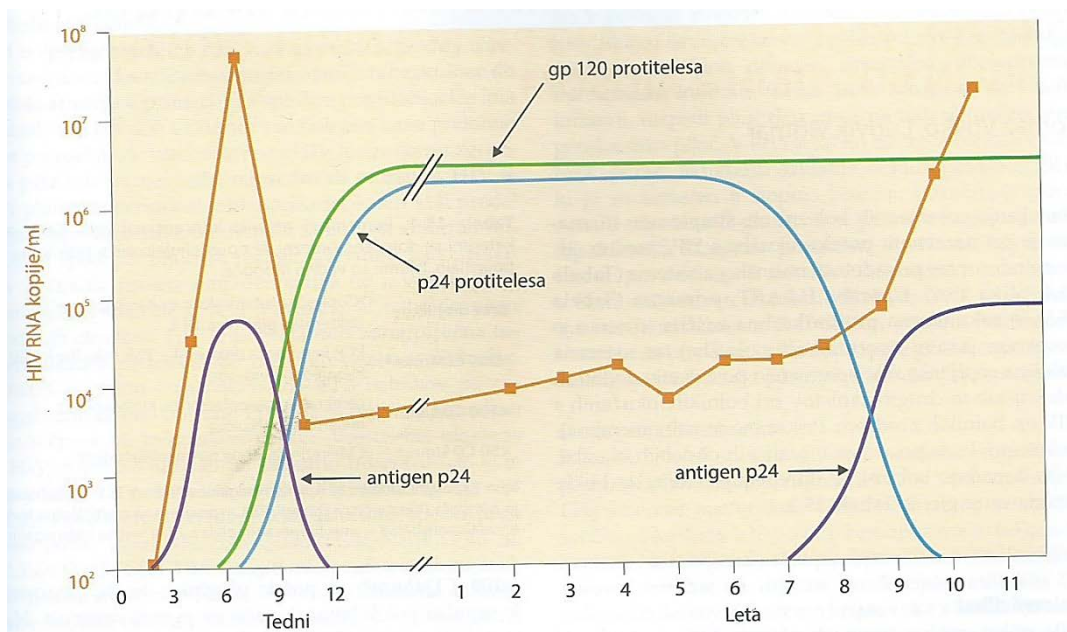
1.2.3 VIRUS ČLOVEŠKE IMUNSKE POMANJKLJIVOSTI (HIV)

Virus človeške imunske pomanjkljivosti (HIV) povzroča aids, zaradi katerega je do leta 2008 umrlo okrog 25 milijonov ljudi, 33,4 milijonov pa je bilo z njim okuženih. Prenos HIV je možen preko krvi in krvnih pripravkov, spolnih odnosov ali z okužene matere na dojenčka. Tudi v tem primeru se je število prenosov virusa preko krvodajalčeve krvi po uvedbi obveznega presejalnega testiranja drastično zmanjšalo, žal pa se število okuženih oseb v Sloveniji še vedno rahlo povečuje.

Virus HIV je okrogle oblike. Ikozaedrično kapsido obdaja dvoslojna lipidna ovojnica iz celične membrane človeške celice, v kateri se nahajajo virusni glikoproteini. Znotraj kapside sta dve enaki kopiji enovijačne RNK ter reverzna transkriptaza in drugi virusni encimi.

HIV je najbolj genetsko raznolik med vsemi virusi, ki napadejo človeka. Poznamo viruse HIV-1 in HIV-2, ki so si precej podobni, a se hkrati razlikujejo v morfoloških lastnostih in v klinični sliki, ki jo povzročajo pri obolelih. Virus HIV povzroči gripi podobno bolezensko stanje z različnimi spremljajočimi kliničnimi znaki. Potek bolezni je razdeljen na več obdobj.

Z encimsko-immunskimi testi lahko v serumu ali plazmi zaznamo prisotna protitelesa anti-HIV oz. Pt proti določenim virusnim proteinom, ki se v krvi nekaterih okuženih pojavijo 3 do 5 tednov po okužbi. Ta so po 3 mesecih prisotna pri 95% bolnikov, po 6 mesecih pa že pri 99%. Hkrati v vzorcu krvi določamo tudi protein p24, ki sestavlja virusno kapsido, s čimer lahko zožimo diagnostično okno. Z molekulsko-biološkimi metodami dokazujemo prisotnost virusne RNK in tudi provirusne DNK (5). Na Sliki 3 lahko vidimo, v katerem časovnem obdobju v krvi lahko zaznamo protitelesa proti HIV, antigen p24 in RNK HIV. Tri tedne po okužbi v krvi lahko zaznamo protitelesa, 14-17 zaznamo virusno kapsidno beljakovino p24, že v 11.-14. dnevu po okužbi pa z molekulskim testiranjem lahko zaznamo HIV RNK (6).



Slika 3: Pojav RNK in Ag v krvi, povzeto po (6).

Legenda: gp protein= protein, ki se nahaja na površini ovojnice HIV, p24= jederni antigen virusa, PCR-HIV RNK= koncentracija HIV v krvi.

1.2.4 *Treponema pallidum*

Treponema pallidum je spiralna bakterija, ki pri ljudeh povzroča sifilis (lues). Prenaša se s spolnimi odnosi, lahko pa tudi s transfuzijo ali z matere na plod, kar je še posebej nevarno. Število okuženih s sifilisom do leta 2015 je bilo ocenjeno na 45,4 milijonov.

T.pallidum je zgrajena iz enakomernih zavojev, je tanka in dolga do 20 µm. Po Gramu se obarva negativno. Zanja je značilno, da lahko izraža več kot 100 različnih antigenov, za diagnostiko pa je najbolj pomemben tisti, ki je podoben kardiolipinu, proti katerem se tvorijo protitelesa.

Sifilis je kronična bolezen, ki poteka v 3 do 4 fazah, znotraj katerih so znaki oz. simptomi lahko različni. Prva od teh je primarna oblika, za katero so značilne kožne razjede, ki ne srbijo. Izpuščaji, ki se navadno pojavijo na dlaneh in podplatih, spremljajo sekundarno fazo, medtem ko za latentno obdobje ni znanih veliko specifičnih znakov. V terciarni fazi se pojavijo nekroze tkiva ter nevrološki in srčni simptomi.

Pri presejalnem testiranju določamo specifična protitelesa proti *T.pallidum*. Poznamo tudi t.i. netreponemske teste, s katerimi določamo protitelesa gostitelja, ki se pojavijo tekom imunskega odziva na lastne lipide, sproščene iz poškodovanih celic ter lipoproteinom podobne molekule, ki so del spirohete. S treponemskimi testi zaznavamo specifična protitelesa proti treponemi. Pri tem uporabljamo npr. imunske (EIA ali CLIA), hemaglutinacijske, aglutinacijske in imunoblot teste. Slednji so bolj občutljivi in specifični kot netreponemski (7).

1.2.5 POMEN DOLOČANJA OZNAČEVALCEV POVZROČITELJEV OKUŽB

Verjetnost, da se povzročitelji hepatitisa B in C, aids-a in sifilisa, iz okužene osebe, ki je krvodajalec ali darovalec organov, prenesejo na prejemnika, je velika, saj se nahajajo v krvi. Prav zaradi tega dejstva je bila zelo pomembna vpeljava presejalnih testov ter njihovo nenehno izboljševanje, saj s tem zagotavljamo varno zdravljenje s krvjo oz. krvnimi pripravki in darovanimi presadki. V primeru, da je vzorec krvi dajalca pozitiven na kateregakoli od omenjenih označevalcev, ga izločimo kot krvodajalca oz. dajalca presadkov. Na področju krvodajalstva je sicer v zadnjih letih takih primerov čedalje manj, še vedno pa v RS povprečno na leto odkrijejo približno 12 nosilcev HBV, od 0 - 2 okuženih s HIV, 5 oseb s HCV in 10 takih, ki so preboleli sifilis. Razlogi za to, da s presejalnimi testi še vedno ne zaznamo vseh okuženih, so lahko: različne mutacije, ki so

jim podvrženi povzročitelji, preširoko diagnostično okno, premajhna občutljivost ali nezadostna specifičnost testov, pa tudi sama laboratorijska izvedba (1).

1.3 METODE ZA IZVEDBO PRESEJALNEGA TESTIRANJA

1.3.1 SEROLOŠKO TESTIRANJE

Vsak tuj organizem v telesu gostitelja izzove specifične celične in protitelesne imunske odzive. Po določenem času izpostavljenosti povzročitelju določene bolezni, v organizmu nastanejo specifična protitelesa. Pojav zaznavnih količin protiteles v krvi okužene osebe, imenujemo serokonverzija ali serološki preobrat.

Prisotnost teh protiteles v serumu določamo s serološkim testiranjem. Prednosti seroloških metod so enostavnost, ugodna cena in možnost določanja prisotnosti tistih virusov, ki jih ne moremo dokazati neposredno. Med tovrstne tehnike testiranja sodijo npr. encimsko-immunske, aglutinacijske, imunoblot metode, idr (8).

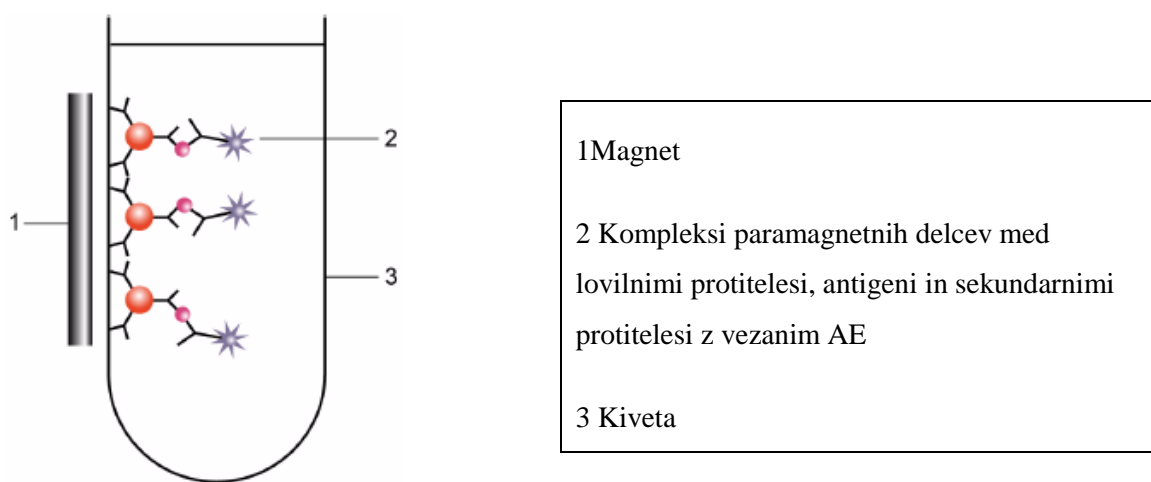
ENCIMSKO-IMUNSKA METODE (EIA)

Encimsko-immunske metode uporabljamo za določanje protiteles ali antigenov. Temeljijo na specifičnih interakcijah protitelo-antigen in obstajajo v številnih različicah. Za detekcijo imunskih reakcij uporabljamo z encimom, največkrat s hrenovo peroksidazo ali z alkalno fosfatazo označena protitelesa. V primeru, ko v biološkem vzorcu iščemo protitelesa, najprej vežemo ustrezen antigen na nosilec (npr. mikrokroglice). Po dodatku vzorca se v njem prisotna protitelesa specifično vežejo na antigen, pri čemer nastanejo imunski kompleksi, na katere se nato vežejo označena sekundarna protitelesa. Po spiranju, s katerim odstranimo nevezane reagente dodamo substrat, ki ga encim pretvori v obarvan produkt, količino katerega izmerimo spektrofotometrično (8).

KEMILUMINISCENČNI IMUNSKI TEST (CLIA)

V zadnjih letih je zaradi visoke občutljivosti, dobre specifičnosti, hitrosti, široke uporabnosti ter razmeroma enostavne opreme, ki jo potrebujemo za njihovo izvedbo, postala kemiluminiscenčna imunska metoda zelo popularna. Veliko jo uporabljajo na področju raziskav, v klinični diagnozi, za farmacevtske analize, itd. Koncentracijo analita v vzorcu določimo z merjenjem intenzitete luminiscence, ki se sprosti med kemijsko reakcijo. V ta namen uporabljajo kemiluminiscenčno označena protitelesa ter kemiluminiscenčne substrate, s katerimi generiramo kemiluminiscentno reakcijo in nato merimo nastale svetlobne signale v obliki relativnih luminiscenčnih enot (RLU), ki so

sorazmerne koncentracijam analita v vzorcih. Za substrat uporabljamo luminol, izoluminol, akridinijev ester in peroksid, izmed encimov pa najpogosteje hrenovo peroksidazo in alkalno fosfatazo. Pri metodi CLIA uporabljamo stacionarne trdne delce prekrte bodisi z antigenom ali protitelesi, odvisno od analita, ki ga določamo v vzorcih. Ti trdni delci so nanokroglice, ki se dobro vežejo na biološke molekule, poleg tega pa katalizirajo kemiluminiscenčno reakcijo. Nanodelci so narejeni iz različnih materialov, npr. iz zlata, večslojnih ogljikovih nanocevčic, magnetnih snovi, silike, ipd (9). Shematski prikaz metode CLIA lahko vidimo na Sliki 4.



Slika 4: Shematski prikaz osnove kemiluminiscenčne imunske metode (CLIA) v primeru, ko je iskani analit antigen, prirejeno po (29).

KEMILUMINISCENČNA IMUNSKA METODA Z MIKRODELICI (CMIA)

Princip metode CMIA je pravzaprav enak principu metode CLIA. Za označevanje protiteles uporabljamo organske molekule, antigene pa vežemo na superparamagnetne delce, ki jih s pomočjo magnetna zlahka ločimo in speremo. CMIA je napredna serološka tehnika, ki omogoča hitro in stroškovno učinkovito določanje analitov v bioloških vzorcih. Specifičnost in občutljivost te metode naj bi bili zelo visoki, in sicer 99,6% in 99,7% (10).

METODE ZAZNAVANJA REAKCIJSKIH SIGNALOV

Kot smo že omenili, pogosto uporabljamo označevanje z encimi, ki nam omogočajo detekcijo in kvantifikacijo imunskih reakcij v testih. Protitelesa ali antigene označene z encimi najprej inkubiramo z vzorci, da pride do vezave z ligandom oz. analitom, nato pa

dodamo ustrezne substrate, ki se pretvorijo v fluorescentne, luminiscentne ali kromogene produkte. Merimo lahko upadanje koncentracij substratov ali pa porast koncentracij nastalih produktov in s tem kvalitativno ali kvantitativno ugotavljamo prisotnost kompleksov antigen-protitelo. Za detekcijo signalov uporabljamo različne fotometrične sisteme (11).

S fluorometrijo merimo fluorescenco fluorofora vezanega na analit. Fluorofori so spojine, ki oddajajo absorbirano ekscitacijsko svetlobo s kratko valovno dolžino, v obliki emisijske svetlobe, z daljšo valovno dolžino, a z manjšo energijo. Vsak fluorofor ima svoji valovni dolžini ekscitacijske in emitirane svetlobe, kar nam omogoča ustrezno selektivnost. Emitirano svetlobo merimo s fluorimetrom, pri čemer je njena jakost odvisna od količine fluorofora v reakcijski zmesi. Pogosto uporabljena fluorofora sta rodamin B in fluorescein-5-izotiocianat.

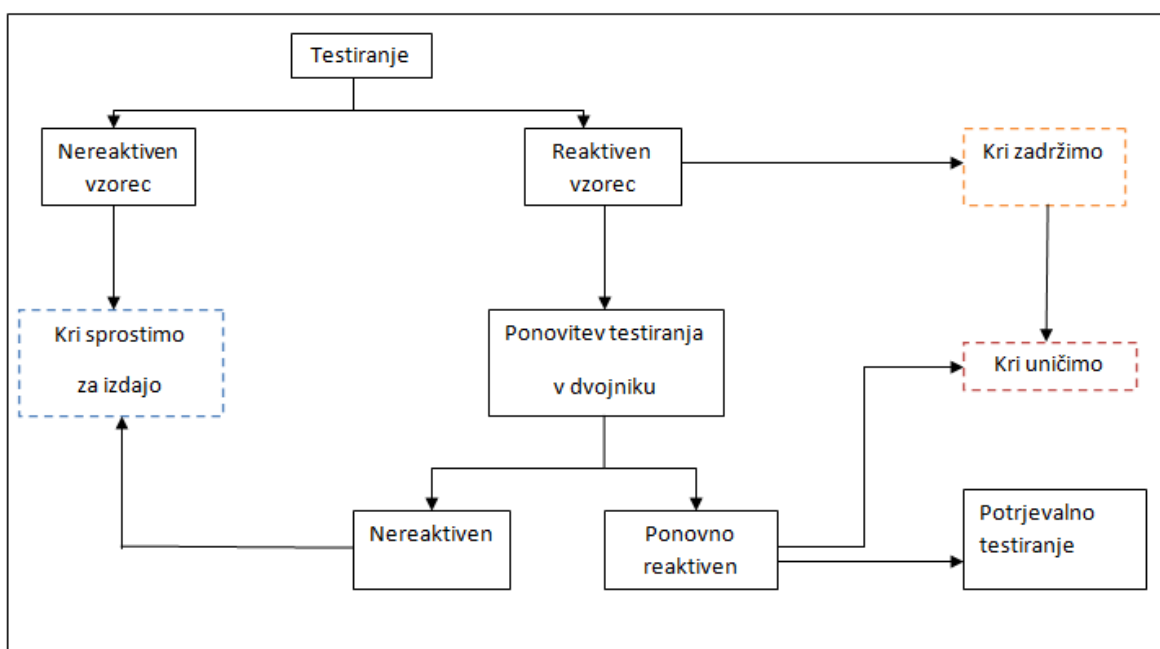
Kemiluminiscenca je nastajanje svetlobe med kemijsko reakcijo, pri kateri elektroni najprej preidejo v vzbujeno stanje, nato pa se relaksirajo in oddajo energijo v obliki fotonov. Primer take reakcije je oksidacija izoluminola z vodikovim peroksidom v prisotnosti katalizatorja, pri čemer pride do razmeroma dolgotrajne emisije svetlobe, ki jo merimo (12).

1.3.2 MOLEKULSKO-BIOLOŠKO DOLOČANJE OZNAČEVALCEV OKUŽB

Neposredno določanje virusnih nukleinskih kislin (RNK, DNK) z njihovim pomnoževanjem (*ang.* NAT, Nucleic Acid Amplification Technology) je zelo občutljivo in tudi bolj specifično od serološkega testiranja. Pri tem uporabljamo encime, ki večkratno pomnožijo specifična nukleotidna zaporedja DNK ali RNK vijačnic, produkte pa detektiramo z različnimi metodami. Za pomnoževanje izberemo tiste odseke nukleinskih kislin, ki so značilni za posamezen virus in se najmanj spreminjajo. Za določanje nukleinskih kislin virusov HBV, HCV in HIV uporabljamo metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), ali pa s transkripcijo posredovano pomnoževanje nukleinskih kislin. Na ta način lahko že kmalu po okužbi zaznamo prisotnost virusov, in sicer DNK HBV po 15 dneh, DNK HCV po 3 - 5 dneh, HIV RNK pa po 5 dneh, kar pomeni, da diagnostično okno močno zožimo v primerjavi z ostalimi presejalnimi testi. Prednosti metod NAT so tudi hitrost, enostavnost, možnost avtomatizacije ter sočasno zaznavanje vseh 3 vrst virusov v isti reakcijski zmesi (13).

1.3.3 ALGORITEM TESTIRANJA

Laboratorij za testiranje krvi krvodajalcev je za presejalno testiranje na označevalce okužb izdelal nacionalni algoritem, ki natančno opredeljuje posamezne korake testiranja. Za določanje posameznih označevalcev uporabljajo še bolj natančno opredeljene, specifične postopke. V primeru, da je rezultat presejalnega testiranja nereaktiven, kri lahko uporabimo za transfuzijo. Kadar je rezultat reaktiven pa testiranje vzorca ponovimo v dvojniku ter tudi z reagenti drugega proizvajalca (po isti metodi). Če so vsi rezultati negativni, kri sprostimo. Kadar je rezultat ponovljivo reaktiven kri uničimo, pozitiven rezultat pa nadalje potrjujemo s potrditvenimi tehnikami. Ta je pri določanju HIV, HCV in *T.pallidum* imunoblot, pri določanju HBV pa nevtralizacijski test. Na Sliki 5 je prikazan osnovni algoritem presejalnega testiranja krvodajalcev (1).



Slika 5: Osnovni algoritem poteka presejalnega testiranja krvodajalcev na označevalce okužb v Republiki Sloveniji, povzeto po (1).

1.4 PRIMERJAVE ANALITSKIH METOD

V praksi pogosto želimo uvesti novo namesto že obstoječe rutinske ali referenčne laboratorijske metode. Najprej ju moramo primerjati med seboj tako, da z njima testiramo isto populacijo vzorcev pod čim bolj primerljivimi pogoji. Nato ocenimo v kolikšni meri se rezultati pridobljeni z novo metodo razlikujejo od rezultatov izmerjenih z referenčno ter kako zahtevna je interpretacija dobljenih kliničnih rezultatov pri novejši metodi (14).

Za takšno primerjalno vrednotenje 2 analiznih metod je priporočeno, da:

- v času študije za izvedbo obeh metod zagotovimo ustrezne kontrole kakovosti (notranje in/ali zunanje);
- dovolj časa namenimo spoznavanju novega analiznega sistema, njenemu vzdrževanju ter morebitnim težavam, ki se lahko pojavijo ob delu z njo;
- pri uporabi reagenčnih kompletov upoštevamo priporočila proizvajalca;
- uporabimo najmanj 40 vzorcev ter da so ti čim bolj reprezentativni;
- uvajalni čas traja vsaj 5 dni lahko pa tudi več – v primeru zahtevnejših analiznih sistemov;
- je vsak korak primerjalne študije sledljiv, kar je pogoj za zagotovitev objektivne analize (15).

Kadar se rezultati nove metode statistično značilno ne razlikujejo od tistih, ki jih določimo z referenčno, to pomeni, da sta obe enakovredni (14).

1.4.1 OPREDELITEV UPORABLJENIH IZRAZOV

Validacijo analitskega postopka izvajamo zato, da bi dokazali, da je primeren za namen uporabe in omogoča ponovljive, točne in natančne rezultate. Izvajamo jo pri razvoju in vpeljevanju nove analitske metode, pri uvajanju metode v drug laboratorij in tudi pri preverjanju že uporabljenih analitskih metod. Parametri, ki jih mora zajemati validacija, so naslednji: točnost, natančnost, specifičnost, območje linearnosti, selektivnost, ponovljivost, meja zaznavanja, meja določljivosti in robustnost (16). Z verifikacijo pa ugotavljamo ali predhodno validirana analizna metoda izpolnjuje zahteve za omenjene parametre, ali je primerna za vpeljavo v specifičen laboratorij in ali bomo z njo lahko izvajali zanesljive in natančne analize (17).

Z diagnostično občutljivostjo, ki jo podajamo v odstotkih, izrazimo delež tistih preiskovancev, ki imajo določeno bolezen in hkrati tudi pozitiven rezultat testa. Kadar je diagnostična občutljivost testa velika, to pomeni, da lahko pričakujemo majhno število lažno negativnih rezultatov. Izraz, lažno negativen rezultat, uporabimo takrat, ko v vzorcu, v katerem pričakujemo prisotnost analita, tega ne zaznamo. Razloga za to sta lahko biološka raznolikost, kar pomeni, da preiskovanec v vzorcu dejansko nima prisotnega analita ali pa metoda, s katero ne uspemo zaznati analita, kar v tem primeru pomeni dejansko napačen rezultat (18).

Nasprotno pa diagnostična specifičnost predstavlja delež oseb, ki nimajo bolezni in imajo hkrati negativen rezultat testa. Tako izrazimo rezultate, ki smo jih s testom zaznali kot resnično negativne. Diagnostična specifičnost je izrazito odvisna od mejnih vrednosti, ki ločujejo zdravo in bolno populacijo in pravzaprav predstavlja tisto najnižjo koncentracijo analita, ki ima še vedno kliničen pomen. Zato je pomembno, da je izbrana analitska metoda kar se da natančna, saj se tako izognemo prevelikemu sipanju rezultatov. Natančnost metode pa pomeni, da z njo dobimo rezultate, ki so čim bolj ponovljivi (18).

Z analizo specifičnostjo ocenjujemo ali z izbrano metodo v vzorcu lahko zaznamo in izmerimo izključno analit, ki ga določamo (18).

Meja detekcije oziroma zaznavanja ima analitski pomen, z njo ocenjujemo zanesljivost meritev najmanjših količin analita z izbrano analizo metodo (18).

Presejalni test je postopek s katerim v skupini domnevno zdravih oseb iščemo prisotnost bolezni z merjenjem analita, ki je z njo povezan. Tovrstni testi morajo biti občutljivi, saj lahko le tako identificiramo vse tiste posameznike, ki imajo dejansko določeno bolezen. Takšno testiranje pa mora biti cenejše in enostavnejše od kasnejšega potrditvenega testiranja, ki je bolj specifično in ga uporabimo z namenom, da z njim izključimo vse tiste, ki določene bolezni nimajo (19).

Z izrazom diagnostično okno opredelimo čas, ki poteče od okužbe do pojava npr. specifičnih protiteles v krvi, ki jih lahko nato dokažemo z laboratorijskim testiranjem. Pomembno je, da je diagnostično okno čim ožje, zato, da lahko okužbo določimo v najkrajšem možnem času (6).

2 NAMEN DELA

Presejalno testiranje krvodajalcev je zelo pomemben del zdravstvenega sistema, zato je izjemno pomembno, da izberemo najustreznejši postopek laboratorijskega testiranja za zanesljivo odkrivanje vseh okuženih posameznikov.

Cilj našega dela bo vzpostavitev delovanja avtomatiziranega analizatorja ADVIA Centaur XP System (Siemens) za serološko določanje označevalcev okužb s HBV, HCV, HIV in bakterijo *Treponema pallidum*, nato pa njegova primerjava z uveljavljenim avtomatskim analiznim sistemom Abbott Architect i2000SR. Postopek verifikacije novega analizatorja bomo izvedli v Centru za testiranje krvi dajalcev in v Centru za ugotavljanje označevalcev okužb, ki sta del Oddelka za diagnostične storitve na ZTM. Primerjalno testiranje novega in obstoječega analiznega sistema bomo izvedli s pomočjo vnaprej izbranega števila vzorcev krvodajalcev, hkrati pa bomo tekom dela testirali tudi zunanje kontrole kakovosti, komercialno dostopne serokonverzijske panele, klinično dokazano pozitivne vzorce ter skupine vzorcev z določenimi posebnostmi.

Dobljene rezultate bomo nato statistično primerjalno ovrednotili in ocenili, kateri od analiznih sistemov bi bil primernejši za rutinsko presejalno testiranje.

Hipoteza: predpostavljamo, da bodo rezultati testiranja vseh štirih označevalcev okužb z obema analiznima sistemoma primerljivi, kar pomeni, da sta oba primerna za presejalno testiranje krvodajalcev, saj imata dovolj občutljive in specifične teste.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BIOLOŠKI VZORCI

3.1.1 VZORCI KRVODAJALCEV

Testirali smo donacije krvi rednih krvodajalcev, ki so darovali kri na ZTM na krvodajalskih akcijah ter na dislociranih centrih za transfuzijsko dejavnost, ki so del ZTM. Med krvodajalci, ki so kri darovali v obdobju med 1. in 15.6.2015, je bilo 1.380 moških in 621 žensk, in sicer največ v starostnem obdobju med 41 in 50 let. Pri tem je 1.875 krvodajalcev kri darovalo že večkrat, 125 prvič, za enega pa tega podatka nismo imeli na razpolago. Za testiranja smo uporabili vzorce plazme odvzete in shranjene v ustreznih epruveh z antikoagulantom EDTA. Z vsemi vzorci smo rokovali varno in testiranja opravili čimprej po odvzemu.

Vse vzorce, odvzete na posamezen dan, smo najprej centrifugirali na 3.000 obratih/min, nato pa testirali z analiznim sistemom Abbott Architect. Po končani analizi smo jih shranili v hladilniku pri 4 °C do naslednjega dne, ko smo jih izmerili še z analiznim sistemom, ki smo ga vrednotili. Skupaj smo testirali vzorce 2.001 krvodajalcev. Za vse tiste vzorce, za katere smo s posameznim analiznim sistemom dobili reaktiven ali mejen rezultat, smo testiranje ponovili v dvojniku, v primeru ponovno reaktivnih rezultatov pa smo jih poslali še na potrditveno testiranje.

3.1.2 SKUPINE POSEBNIH VZORCEV

Dve skupini vzorcev smo umestili med tako imenovane posebne vzorce, in sicer zato, ker bi lahko predstavljali biološko spremenjen material, ki bi zato morda vplival na končne rezultate izmerjene s posameznim analiznim sistemom.

Izbrali smo:

- 21 dializnih vzorcev,
- 50 vzorcev možnih mrtvih darovalcev organov, tkiv ali celic (MMD) in 50 vzorcev darovalcev roženice, odvzetih po smrti (OČKL).

Rezultati serološkega testiranja vzorcev MMD in OČKL (vzorci odvzeti po smrti), so namreč lahko lažno negativni, kar je posledica razredčenja protiteles in/ali antigenov, zaradi velike količine predhodno prejetih transfuzij in infuzij (20). Na podobne težave naletimo tudi pri testiranju vzorcev dializnih bolnikov. Poleg tega se pri vzorcih odvzetih

po smrti sprožijo določeni procesi, kar vpliva na sestavo vzorca krvi, ki se lahko posledično odraža na uspešnosti in točnosti testiranja.

3.1.3 REAKTIVNI KLINIČNI VZORCI

Testirali smo po 10 klinično dokazano pozitivnih vzorcev pacientov in krvodajalcev za vsak označevalec okužb, in sicer 10 za HBsAg, 10 za anti-HCV, 10 za HIV Ag/Pt in 10 za anti-TP. Ti vzorci so bili arhivirani različno dolgo (vendar ne več kot 4 leta), kar pomeni, da so bili daljši čas zamrznjeni na $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V to skupino smo uvrstili tudi serijske redčitve dveh vzorcev z genotipoma A in D virusa hepatitisa B. Vzorec z genotipom A je pripadal ženski in je bil odvzet leta 2011, vzorec z genotipom D pa moškemu, ki so mu kri prav tako odvzeli leta 2011. Oba vzorca smo redčili 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 in 1:128 ter nato ugotovili, da sta še vedno močno reaktivna, in zato smo zadnji redčini (1:128) redčili še 1:10 do razmerja 1:1.280, tega pa nadalje redčili kot sledi: $1:1.280 \rightarrow 1:2.560 \rightarrow 1:5.120 \rightarrow 1:10.240 \rightarrow 1:20.480$.

Analizirali smo tudi 6 arhivskih vzorcev krvodajalcev, ki so bili reaktivni na HBsAg po cepljenju proti hepatitisu B. Trije od teh so bili odvzeti v letu 2011, dva v letu 2012 in eden v letu 2013. Dva od krvodajalcev sta cepivo prejela 7 dni, eden 5 dni, dva 4 dni in eden 2 dni pred darovanjem.

3.2 ZUNANJE KONTROLE IN SEROKONVERZIJSKA PANELA

Zunanje kontrole kakovosti VQC-MCA: HBsAg (set 6-ih vzorcev), anti-HCV (set 6-ih vzorcev), anti-HIV (set 6-ih vzorcev), anti-TP (set 6-ih vzorcev), proizvedene v laboratorijih MCA na Nizozemskem (21). Vsak set zunanjih kontrol kakovosti MCA za posamezne označevalce okužb je vseboval 6 vzorcev, označenih s črkami A - F. V laboratoriju po vsakem testiranju zunanjih kontrol in pošiljanju rezultatov pristojni ustanovi, dobijo povratne informacije o pričakovani opredelitvi rezultata, zato smo vedeli kakšen naj bi bil pričakovani rezultat in smo z njim lahko primerjali naše izsledke.

Komercialno dostopni serokonverzijski panel:

- HBV PHM934 SeraCare: 5 neredčenih vzorcev plazme zbranih v obdobju serokonverzije okužbe s HBV izbranega dajalca,
- HCV PHV925 SeraCare: 5 neredčenih vzorcev plazme dajalca, zbranih v obdobju serokonverzije pri okužbi s HCV,

- HIV PRB966 SeraCare: 10 neredčenih vzorcev plazme dajalca, zbranih v obdobju serokonverzije pri okužbi s HIV,
- ti serokonverzijski paneli so bili na analiznem sistemu Abbott testirani v obdobju pred verifikacijo analiznega sistema Siemens, zato pogoji testiranja niso isti.

Drugi set komercialno dostopnega serokonverzijskega panela:

- HBV PHM939 SeraCare: 5 neredčenih vzorcev plazme zbranih v obdobju serokonverzije okužbe s HBV izbranega dajalca,
- HCV PHV922 SeraCare: 6 neredčenih vzorcev plazme dajalca, zbranih v obdobju serokonverzije pri okužbi s HCV,
- HIV PRB969 SeraCare: 10 neredčenih vzorcev plazme dajalca, zbranih v obdobju serokonverzije pri okužbi s HIV,
- sete panelov smo pod istimi pogoji testirali z obema analiznima sistemoma (22).

3.3 TESTIRANJE VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ADVIA Centaur XP System

3.3.1 REAGENTI

Reagenti so deklarirani za uporabo v *in vitro* diagnostiki. Reagenti v tekoči obliki so bili že vključeni v reakcijski komplet in smo jih pred uporabo, morali le rahlo premešati. Po tem, ko smo vzpostavili homogenost in pri tem pazili, da ne ustvarimo zračnih mehurčkov, smo jih vstavili v ustrezno hlajena mešalna mesta, kjer ostanejo dokler jih ne porabimo oz. do poteka stabilnosti ali roka uporabe, na kar nas opozori analizator. Pri uporabi vseh reagentov je pomembno, da v celoti upoštevamo varnostna opozorila in navodila proizvajalca.

Proizvajalci reagentov so le-te validirali tudi za vzorce krvodajalcev.

3.3.1.1 Reagenti za testiranje površinskega antigena HBV

Za dokazovanje antigena hepatitisa B, smo uporabili naslednje reagente:

- Primarni reagent trdne faze ADVIA Centaur HBsAgII ReadyPack: magnetni delci lateksa prekriti s streptavidinom, v pufru z govejim serumskim albuminom, govejim gama globulinom, kozjim serumom.

- Primarni lahki reagent ADVIA Centaur HBsAgII ReadyPack®: mišja monoklonska protitelesa proti HBsAg, označena z akridinijevim estrom, v pufru z govejim serumskim albuminom, govejim gama globulinom, kozjim serumom.
- Pomožni reagent ADVIA Centaur HBsAgII ReadyPack: z biotinom označena monoklonska mišja protitelesa proti HBsAg in protitelesa proti HBsAg označena z akridinijevim estrom, v pufru z govejim serumskim albuminom, govejim gama globulinom, kozjim serumom.
- Pomožni reagent ADVIA Centaur ReadyPack – tekočina za spiranje: raztopina natrijevega hidroksida.
- Tekočina za spiranje ADVIA Centaur Wash: fosfatni pufer z natrijevim azidom in surfaktantom. Ta tekočina je pri vseh 5-ih testih enaka.

Reagente smo po odprtju hranili pri 2-8 °C vse do datuma roka uporabe. Pazili smo tudi, da jih nismo izpostavljali svetlobi in toploti. Po odprtju so reagenti stabilni 60 dni (23).

3.3.1.2 Reagenti za testiranje protiteles (IgG) proti HCV

ADVIA Centaur HCV ReadyPack primarnega reagenta vsebuje:

- Lahki reagent ADVIA Centaur HCV ReadyPack: monoklonska protitelesa proti človeškemu IgG, označena z akridinijevim estrom, v pufru z govejim serumskim albuminom.
- Reagent trdne faze ADVIA Centaur HCV ReadyPack: paramagnetni mikro delci prekriti s streptavidinom in biotiniziranim rekombinantnim antigenom (c200 HCV antigen) ter biotiniziranim sinteznim antigenom (c22p HCV antigen).
- Pomožni reagent ADVIA Centaur HCV ReadyPack: biotiniziran rekombinantni antigen HCV (NS5 antigen).
- Pomožni reagent ADVIA Centaur HCV ReadyPack: goveji serumski albumin, kozji serum, natrijev azid.

Posebej je dodan še pomožni reagent ADVIA Centaur Wash, ki vsebuje natrijev azid in surfaktante.

Reagente smo shranjevali pri 2-8 °C, zaščitene pred svetlobo in toploto (24).

3.3.1.3 Reagenti za testiranje antigena HIV in protiteles proti virusu človeške imunske pomanjkljivosti

Komplet vsebuje naslednje reagente:

- Reagent trdne faze ADVIA Centaur CHIV ReadyPack: paramagnetni mikro delci prekriti s streptavidinom, biotiniziranimi antigeni HIV in protitelesi, v pufru z govejim serumskim albuminom, kozjim serumom.
- Lahki reagent ADVIA Centaur CHIV ReadyPack®: rekombinantni antigeni HIV in protitelesa, označena z akridinijevim estrom, v pufru z govejim serumskim albuminom, mišjimi IgG, kozjim serumom.
- Pomožni lahki reagent ADVIA Centaur CHIV ReadyPack: rekombinantni antigeni HIV in protitelesa, označena z akridinijevim estrom, v pufru z govejim serumskim albuminom, mišjimi IgG, kozjim serumom.
- Pomožni reagent ADVIA Centaur ReadyPack – tekočina za spiranje sonde: raztopina natrijevega hipoklorita (0,5%) in natrijevega hidroksida (<0,5%) s pH= 11,0.

Dodana sta še reagenta ADVIA Centaur Wash, ki vsebujeta natrijev azid in surfaktante.

Po odprtju reagente shranjujemo pri temperaturi 2-8 °C, zaščitene pred svetlobo in toploto (25).

3.3.1.4 Reagenti za določanje protiteles proti *T. Pallidum*

Potrebujemo naslednje reagente:

- Reagent trdne faze ADVIA Centaur SYPH ReadyPack®: paramagnetni mikro delci prekriti s streptavidinom in biotiniziranimi rekombinantnimi antigeni *T. Pallidum* (Tp 15 in Tp17 Ag), v pufru z govejim gama globulinom, kozjim serumom.
- Pomožni reagent ADVIA Centaur SYPH ReadyPack: rekombinantni antigeni (Tp 15 in Tp17 Ag), označeni z akridinijevim estrom, v pufru s kozjim serumom.
- Pomožni reagent – tekočina za spiranje sonde: raztopina natrijevega hidroksida.

Dodana sta še reagenta ADVIA Centaur Wash, ki vsebujeta natrijev azid in surfaktante.

Po odprtju reagente shranjujemo pod istimi pogoji kot v prejšnjih primerih (26).

3.3.2 KALIBRATORJI

Kalibracijo analizatorja smo izvedli pred vsakim testiranjem, nato pa jo ponovili vsak mesec oz. v primeru uporabe novega lota reagentov. Kalibratorje shranjujemo pri temperaturi od 2 – 8 °C. Tako ostanejo stabilni do roka uporabe, k čemur pripomorejo tudi dodani konzervansi.

Kalibrator ADVIA Centaur HBsAgII za dokazovanje prisotnosti HBsAg vsebuje visoki in nizki kalibrator (23).

Kalibrator ADVIA Centaur HCV je sestavljen iz vzorca obdelane človeške plazme, ki vsebuje protitelesa anti-HCV in vzorca, ki jih ne vsebuje (24).

Kalibrator ADVIA Centaur CHIV vsebuje obdelano človeško plazmo brez protiteles proti HIV in z dodanimi protitelesi anti-HIV-1(25).

Kalibrator ADVIA Centaur SYPH je sestavljen iz človeške plazme, ki vsebuje protitelesa proti *T. pallidum* (26).

3.3.3 KONTROLE

Pred začetkom vsakega testiranja smo z analiznim sistemom opravili dnevno kontrolo kakovosti z vnaprej pripravljenimi kontrolnimi vzorci proizvajalca (Siemens). V primeru, da so bili rezultati kontrol znotraj zahtevanega referenčnega območja, smo nadaljevali s testiranjem vzorcev (22).

Vse kontrole so stabilne pri 2 do 8 °C, zelo je pomembno, da jih ne izpostavimo svetlobi in visokim temperaturam ter da upoštevamo varnostne predpise. Uporabljali smo naslednje kontrole:

- ADVIA Centaur HBsAg Quality Control: obdelana človeška plazma, brez in z dodatkom HBsAg (23).
- HCV quality control: obdelana človeška plazma, brez in z dodanimi protitelesi anti-HCV (24).
- ADVIA Centaur CHIV quality control: obdelana človeška plazma nereaktivna na HIV, reaktivna na HIV-1 in reaktivna na HIV-2 z dodatkom natrijevega azida (< 0,1%) ter antigen HIV (p24) v obdelani človeški plazmi, ki vsebuje natrijev azid (25).

- ADVIA Centaur SYPH quality control: obdelana človeška plazma brez in z protitelesi anti-TP (26).

Za vsako kontrolo je proizvajalec določil intervalno območje, znotraj katerega je izmerjeni rezultat kontrole še veljaven. Vrednosti intervalnih območij naših kontrol v indeks enotah so bile naslednje:

- HBsAG: - negativna kontrola: 0,0 - 0,99; - pozitivna kontrola: 2,0 - 9,0;
- anti-HCV: negativna kontrola: 0,0 - 0,8; - pozitivna kontrola: 1,5 - 6,0;
- Ag/Pt HIV: - kontrola Ag1-365: 1,2 - 12,0; - kontrola Ab2-363: 1,2 - 12,0;
- kontrola Ab1-362: 1,2 - 12,0; - negativna kontrola: 0,0 - 0,8;
- anti-TP: -negativna kontrola: 0,0 - 0,8; - pozitivna kontrola: 2,0 - 6,0.

3.3.4 PRINCIP TESTIRANJA Z ANALIZNIM SISTEMOM ADVIA Centaur XP

Analizni sistem ADVIA Centaur XP (Siemens) je namenjen za diagnostiko *in vitro*. Lahko ga uporabljamo za ugotavljanje delovanja ščitnice (hormona T3, T4), metabolnih procesov (kortizol), za določanje tumorskih označevalcev, kardiovaskularno dignostiko (npr. mioglobin), za spremljanje nivojev terapevtskih učinkovin v krvi, za diagnostiko infekcijskih boleznih, itd.

Sestavljen je iz dveh osnovnih enot, analizatorja in računalnika. V analizatorju poteka celoten proces analize kalibratorjev, vzorcev in kontrol, ki ga vodi računalniški sistem preko ukazov. Slednji nam omogoča tudi pregled in vrednotenje rezultatov, izris kontrolnih grafov in povezavo z laboratorijskim informacijskim sistemom (LIS). Analizator je zgrajen iz več podenot. Do večine teh lahko dostopamo tudi med samim testiranjem, kar je ena od prednosti tega analizatorja. Sledi opis ključnih podenot.

Področje za vstavljanje vzorcev je sestavljeno iz vstopne vrste oz. iz dela, v katerega vstavimo vzorce v posebnih nosilcih, iz dela iz katerega vzorci izstopajo po končanem pipetiranju ter dela, v katerega lahko med delovanjem analizatorja vstavimo nujne vzorce in se testirajo prednostno. Posamezen nosilec za vzorce sprejme 5 epruvet, celotna vstopna vrsta pa 15 nosilcev naenkrat. Le-ti nato potujejo v procesno območje, kjer čitalec najprej prebere črtno kodo vsakega nosilca, nato pa še posamezne kode na epruvetah z vzorci. Epruvete morajo biti pravilno obrnjene, da jih čitalec lahko zazna. Sledi aspiracija vsakega vzorca in njegova nadaljnja analiza.

Področje testiranja se začne s pipetiranjem vzorcev iz epruvet v nosilcih v kivete oz. v inkubacijski krog. Ta premika kivete z vzorci od pipetorjev z vzorci do pipetorjev z

reagenti in pomožnimi reagenti. Pomembna je tudi postaja za spiranje, ki spere pipetorje pred vsakim novim pipetiranjem. Inkubacijski krog se nato pomakne do druge postaje za spiranje, ki iz kivet spere vse kar ni pritrjeno z magnetno silo na steno kivet. Pot kivet se nadaljuje do točke, kjer analizator v kivete doda kislino, od tu pa do luminometra, v katerem po dodatku bazičnega reagenta poteče kemiluminiscentna reakcija. Luminometer meri oddano svetlobo v obliki enot RLU, ki jih računalniški program zabeleži, shrani in pretvori v indeksirane rezultate in jih izpiše na zaslonu.

Področje za reagente je namenjeno vstavljanju reagentov in pomožnih reagentov. Reagente vstavimo v notranjost oštevilčenega hlajenega predela. Na vratih tega dela analizatorja so barvne diode, ki nas opozarjajo na njihovo stanje. Pomožne reagente pa vstavimo v drugo področje, od koder jih avtomatski sistem prestavi v analizator, kjer so shranjeni pri 4 – 8 °C. Do reagentov med testiranjem dostopa pipetor, ki jih v določenih količinah odpipetira in prenese v ustrezne kivete z vzorci v inkubacijskem krogu.

Področje za odpadke predstavlja zabojnik za porabljene kivete, zabojnik za porabljene nastavke ter vsebnik za odvečno in odpadno tekočino.

Na Sliki 6 je prikazan analizni sistem Siemens.



Slika 6: Analizni sistema ADVIA Centaur XP, Siemens, povzeto po (28).

Pred in med uporabo analiznega sistema moramo vedno preveriti njegovo stanje, izprazniti odpadke, napolniti vsebnik z vodo ter preveriti zalogo reagentov in pomožnih reagentov.

Preden začnemo s postopkom testiranja moramo na analiznem sistemu sprožiti program dnevnega čiščenja, poleg tega pa moramo vsak mesec izvesti mesečno čiščenje (29).

Metoda, ki jo uporablja analizator je kemiluminiscenčna imunska metoda (CLIA). Gre za sendvič metodo z neposredno kemiluminiscenčno detekcijo. V analiznem sistemu poteka direktno oz. neposredno merjenje svetlobne energije, brez dodatnih vmesnih korakov. Kot kemiluminiscenčni označevalec, kovalentno pritrjen na protitelesa ali antigen, uporabljamo akridinijev ester (AE). Njegova prednost je v tem, da pri testiranju ni potrebno dodajati substrata ali katalizatorja. Analizni sistem ADVIA Centaur XP uporablja vodikov peroksid, ki zelo hitro oksidira AE ter s tem spremeni rekreacijsko okolje iz kislega v bazično, pri čemer poveča količino oddane svetlobe. Uporabi AE in kemiluminiscence imata več prednosti v primerjavi z metodami EIA, kjer največkrat uporabljamo alkalno fosfatazo, in sicer: hiter reakcijski čas, zelo nizko ozadje pri merjenju signala, povečamo občutljivost zaradi majhnosti molekule in zmanjšamo možnost blokiranja vezavnih mest. AE je sestavina lahkega reagenta, medtem ko se v reagentu trdne faze nahajajo paramagnetni delci, na katere so vezana bodisi specifična protitelesa ali antigeni. To so pravzaprav oksidirani kristali železa, ki jih privlači magnetno polje magneta, ki se nahaja v analiznem sistemu (29).

Analizni sistem lahko izvaja tudi nevtralizacijski test za potrjevanje HBsAg, ki poteka drugače kot njegovo osnovno določanje, saj temelji na specifičnih nevtralizacijskih protitelesih. Vzorec inkubiramo s človeškimi poliklonskimi protitelesi proti HBsAg. Ta se vežejo na prisotne antigene v vzorcu in jih nevtralizirajo. Tako so HBsAg blokirani in se ne morejo vezati na detekcijska protitelesa, s katerimi jih določamo. Posledično izmerimo nižan signal, v primerjavi s tistim, ki ga dobimo v drugem alikvotu vzorca, inkubiranim z ne-nevtralizirajočim kontrolnim reagentom. Vzorec, ki ga opredelimo kot potrjeno reaktivnega na HBsAg, je tisti v katerem je obseg nevtralizacije po inkubaciji z nevtralizacijskim reagentom 50% ali več (30).

Moteči dejavniki, ki vplivajo na testiranje in končne rezultate, so lahko: heterofilna protitelesa prisotna v vzorcih, lipemičnost ali hemoliziranost vzorca, prisotnost večjih mehurčkov ali fibrinskih vlaken ter seveda nepravilno ravnanje z vzorci ali reagenti (29).

3.4 TESTIRANJE VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ABBOTT ARCHITECT i2000SR

Analizni sistem Abbott Architect je bil v laboratorij za dokazovanje označevalcev HBV, HCV, HIV in sifilisa vpeljan že prej. Pooblaščenim izvajalcem Centra za testiranje krvi dajalcev so dnevno testirali vzorce krvodajalcev, skladno z vpeljanimi postopki in algoritmi.

3.4.1 REAGENTI

Z vsemi reagenti, kalibratorji in kontrolami smo ravnali enako kot v primeru izvajanja testov z vpeljanim analiznim sistemom. Shranjevali smo jih v hladilniku pri 2-8 °C, vse do datuma, ki je označeval rok uporabe. Za vsak določeni analit smo uporabljali ustrezne reagente proizvajalca Abbott. Uporabljali so naslednje reagente:

- Komplet reagentov ARCHITECT za določanje HBsAg: mikrodenci z mišjimi protitelesi v pufru s stabilizatorjem proteinov (goveji serumski albumin); mišja protitelesa anti-HBs in kozja protitelesa anti-HBs označena z AE v fosfatnem pufru s človeško plazmo in stabilizatorjem proteinov (goveji serumski albumin, kozji in mišji imunoglobulini); pomožni pufer za spiranje in ostali reagenti (sprožilec reakcije, pufer za spiranje) (31).
- Komplet reagentov ARCHITECT anti-HCV: mikrodenci prekriti s HCV antigenom; protitelesa anti-HCV konjugirana z AE; raztopina za redčenje protiteles anti-HCV s pufrom TRIS in ostali reagenti (32).
- Komplet reagentov ARCHITECT HIV Ag/Pt Combo: mikrodenci z rekombinantnimi antigeni HIV-1 in HIV-2 in mikrodenci s pripetimi protitelesi proti antigenu p24 HIV; z AE označeni rekombinantni antigeni, z AE označeni sintetični peptidi HIV-1/HIV-2 ter z AE označena mišja protitelesa proti p24; raztopina za redčenje HIV Ag/Pt Combo, s pufrom in ostali reagenti (33).
- Komplet reagentov ARCHITECT sifilis: mikrodenci prekriti z antigenom *T. pallidum* v pufru; protitelesa z anti-IgG/anti-IgM označena z AE; raztopina za redčenje s pufrom in ostali reagenti (34).

Tudi proizvajalci reagentov analiznega sistema Abbott so le-te validirali za vzorce krvodajalcev.

3.4.2 KALIBRATORJI

Kalibratorji, potrebni za izračun mejnih vrednosti (cut-off) in za vrednotenje veljavnosti kalibracije:

- Kalibrator ARCHITECT HBsAg: kalibrator 1 (s HBsAg), kalibrator 2 (človeška plazma) (31).
- Kalibrator ARCHITECT anti-HCV: plazma s protitelesi anti-HCV (32).
- Kalibrator ARCHITECT HIV Ag/Pt Combo: očiščeni lizat HIV (33).
- Kalibrator ARCHITECT sifilis TP: človeška plazma s protitelesi anti-TP (34).

3.4.3 KONTROLE

Kontrole pri delu s tem analiznim sistemom uporabljamo vsakodnevno za ocenjevanje ustreznosti delovanja analiznega sistema in odkrivanje analitskih odstopanj. Pri analiznem sistemu Abbott so razponi kontrol navedeni z enoto s/co, ki je razmerje med signalom (v tem primeru RLU) in cut-off vrednostjo. Za ustrezno izvajanje testov so potrebne naslednje:

- Kontroli ARCHITECT HBsAg: pozitivna kontrola (razpon 1,75 - 5,25 s/co) z inaktiviranim človeškim HBsAg v človeški plazmi brez Ca^{2+} in negativna kontrola (razpon $\leq 0,85$ s/co), ki vsebuje človeško plazmo brez Ca^{2+} (31).
- Kontroli ARCHITECT anti-HCV: pozitivna, iz človeške plazme brez Ca^{2+} s protitelesi anti-HCV (razpon od 1,71 - 5,13 s/co) in negativna iz človeške plazme brez Ca^{2+} (razpon $\leq 0,60$ s/co) (32).
- Kontrole ARCHITECT HIV Ag/Pt Combo: pozitivna kontrola 1, s protitelesi anti-HIV-1 v človeški plazmi brez Ca^{2+} (razpon 1,20 - 11,50 s/co); pozitivna kontrola 2 s protitelesi anti-HIV-2, prav tako v človeški plazmi brez Ca^{2+} (razpon 1,52 - 8,30 s/co); pozitivna kontrola 3, ki vsebuje očiščen lizat HIV v pufru (razpon 1,87 - 4,59 s/co); negativna kontrola človeška plazma brez Ca^{2+} (razpon 0,00- 0,50 s/co) (33).
- Kontroli ARCHITECT sifilis: pozitivna, ki vsebuje protitelesa anti-TP (razpon 1,25 - 3,75 s/co) in negativna (razpon $\leq 0,40$ s/co), obe pripravljene v človeški plazmi brez Ca^{2+} (34).

3.4.4 PRINCIP MERJENJA VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ABBOTT ARCHITECT i2000SR

Za rutinsko določanje HBsAg, protiteles anti-HCV, Ag/Pt HIV in protitelesa anti-TP, v laboratoriju na ZTM uporabljajo Abbott Architect i2000SR.

Analizni sistem omogoča diagnostiko *in vitro*, z določanjem različnih označevalcev, npr. metabolnih poti (inzulin, vitamin D), delovanja ščitnice (anti-TPO, celotni T3, T4), nosečnosti (estradiol, hCG), bolezni srca (BNP, CK-MB) ter infekcijskih bolezni, spremljanje nivojev zdravilnih učinkovin v krvi, itn (35).

Omogoča izvedbo 200 testov na uro, z možnostjo prednostnega testiranja izbranih vzorcev, za katere potrebujemo takojšen rezultat, shranjevanje reagentov v hlajenih prostorih in povezavo z LIS. Analizni sistem je sestavljen iz:

- prednjega, zgornjega, pokritega dela, kjer lahko dostopamo do sestavnih elementov, ki izvajajo procesne aktivnosti;
- enote s procesno tipkovnico, ki uporabniku omogoča nadzorovanje procesnega centra;
- prostora za zalogo spiralnih tekočin in odpada;
- vrat, ki omogočajo dostop do centralne procesne enote.

Analizni sistem Abbott je prikazan na Sliki 7.



Slika 7: Analizni sistem Abbott Architect, povzeto po (36).

Analizni sistem za določanje antigenov, protiteles in ostalih analitov uporablja kemiluminiscenčno imunsko reakcijo z mikrodenci (CMIA), ki temelji na uporabi AE kot označevalca tako kot pri analiznem sistemu ADVIA Cenatur XP. Postopek testiranja je sledeč:

1. Pipetorska enota prenese reagent s paramagnetnimi mikrodenci prekritimi z lovilno molekulo v vzorce, ki se nahajajo v reakcijskih posodicah, nato pa vorteksni mešalec reakcijsko mešanico premeša.
2. Med inkubacijo se analit prisoten v vzorcu veže na lovilno molekulo, vezano na mikrodence, pri čemer nastane imunski kompleks.
3. Magnet ob steno reakcijskega vsebnika pritegne paramagnetne mikrodence, na katere je vezan specifičen analit, spiralna tekočina pa spere in odstrani vse nevezane snovi.
4. Pipetor v reakcijski mešanici doda kemiluminiscenčni, z AE označen konjugat, ki se veže na imunske komplekse.
5. Sledi inkubacija, tej pa zopet spiranje, ki odstrani vse nevezane reagente.
6. Funkcije naslednjega reagenta, to je vodikov peroksid, pedsprožilca reakcije, so naslednje: ustvari kislino okolje in tako prepreči prehitro sproščanje svetlobne

energije, preprečuje zlepljanje mikrodlecev in loči prosto akridinijevo barvilo od tistega vezanega na konjugirani kompleks ter tako reakcijsko mešanico pripravi za naslednji korak.

7. V reakcijsko mešanico analizni sistem doda sprožilec reakcije (raztopina natrijevega hidroksida). Zaradi izpostavljenosti peroksidu in alkalni raztopini, poteče oksidacija akridinijevih molekul, kar ima za posledico pojav kemiluminiscence. Nastaja namreč N-metilakridon, ki sprosti svetlobno energijo, ko preide v nižje energijsko stanje.

8. Optični sistem CMIA izmeri kemiluminiscenco v vnaprej določenem časovnem obdobju in nato kvantificira koncentracijo analita ali pa kvalitativno ovrednoti interpretacijo indeksa (cut off) za izmerjene vzorce (37).

Tudi ta analizni sistem lahko izvaja nevtralizacijski test za potrjevanje HBsAg.

3.5 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Interpretacija rezultatov glede na navodila proizvajalcev posameznega reagenta, je predstavljena v Preglednici I.

Preglednica I: Diagnostično pomembne vrednosti.

	Abbott Architect® Anti-HCV		ADVIA Centaur XP System, Siemens	
	Reaktiven	Mejna vrednost	Reaktiven	Mejna vrednost
HBV	$\geq 1,0$	$\geq 0,9$ in $<1,0$	$\geq 1,0$	/
HCV	$\geq 1,0$	$\geq 0,9$ in $<1,0$	$\geq 1,0$	$\geq 0,8$ in $< 1,0$
HIV	$\geq 1,0$	$\geq 0,9$ in $<1,0$	$\geq 1,0$	/
Sifilis	$\geq 1,0$	/	$\geq 1,10$	$\geq 0,90$ in $< 1,10$

3.6 STATISTIČNE METODE

Statistično analizo in grafično predstavitev rezultatov smo izvedli z računalniškimi programi Microsoft Excel 2007, MedCalc® in GraphPad Prism®, verzija 6.05.

Že pred statistično obdelavo smo ugotovili, da bomo imeli med vsemi 2.001 dobljenimi rezultati težave zaradi omejitve v statističnem programu s tistimi vrednostmi, ki so imele predznak "<" (manjše od). Zato smo se odločili, da bomo statistično analizirali le tiste rezultate, ki teh predznakov ne vsebujejo, saj so te vrednosti zelo majhne. Iz statistike izključeni rezultati so bili začetno nereaktivni z obema sistemoma, razen pri HCV, kjer je

bil rezultat dveh vzorcev pri analiznem sistemu Abbott lažno reaktiven, pri Siemensu pa negativen.

Preglednica II: Prikaz števila analiziranih rezultatov.

Označevalec	Število rezultatov, ki smo jih statistično analizirali (izmed 2.001 donacij krvi)
HBsAg	548
anti-HCV	792
HIV Ab/Pt	1724
anti-TP	52

Izrisali smo tudi **Levey-Jenningsove grafe** meritev, določenih z analiznim sistemom Advia Cenatur XP, s čimer smo rezultate kontrol primerjali z njihovimi mejami sprejemljivosti ter tako ugotavljali morebitna odstopanja, poleg tega pa tudi sistemske ali naključne napake. Za odkrivanje slednjih se poslužujemo različnih pravil, tudi Westgardovih, ter na ta način zagotavljamo zaupanje v zanesljivost in ponovljivost rezultatov. Z upoštevanjem pravil in ustreznim ukrepanjem zagotavljamo, da je proces pod nadzorom (38).

Diagnostično specifičnost smo izračunali posebej za tiste rezultate, ki so bili začetno reaktivni nato pa v duplikatu nereaktivni ter posebej za tiste, ki so bili ponovljivo reaktivni, torej reaktivni v treh ponovitvah. To smo storili s pomočjo naslednje formule:

$$\text{Diagnostična specifičnost (DS) [\%]} = \frac{PN \cdot 100}{PN + LP}$$

Oznaka PN pomeni pravilno negativne rezultate oz. negativen izid testa pri tistih preiskovancih, ki nimajo bolezni, medtem, ko so LP lažno pozitivni rezultati, izmerjeni prav tako pri osebah, ki nimajo bolezni (18).

Za izračun diagnostične specifičnosti smo uporabili **kontingenčne tabele** 2x2, s pomočjo katerih lahko, kot v našem primeru, ocenimo tudi natančnost diagnostičnega testa. V njih prikažemo frekvence porazdelitev rezultatov, ki jih ustrezno razdelimo v skupine, da lahko

nato med seboj primerjamo dve ali več skupin kategoričnih spremenljivk (npr. bolezen/ni bolezen) (38).

Z dvostranskim **neparnim t-testom** primerjamo povprečne vrednosti dveh skupin. Pri tem nam 95% interval zaupanja za razlike med povprečnimi vrednostmi s 95% gotovostjo zagotavlja, da vsebuje prave razlike med njimi.

Najprej smo normalnost porazdelitev meritev preverili z D'Agostino in Pearsonovim omnibus testom, pri čemer je pri vrednosti $p > 0,05$ ta dejansko prisotna, pri $p < 0,05$ pa vrednosti niso normalno porazdeljene (40).

Če z dvostranskim T-testom potrdimo ničelno hipotezo (H_0), to pomeni, da sta aritmetični sredini primerjanih vzorcev enaki, v primeru, da potrdimo alternativno hipotezo (H_a) pa da sta si različni. Določiti moramo tudi stopnjo tveganja (α). Ta je ponavadi 5% in nam zagotavlja, da smo 95% prepričani v trditev.

Test je statistično značilen kadar je izračunana vrednost p manjša od stopnje tveganja ($p < 0,05$), kar nam omogoča, da ničelno hipotezo zavrnilo in sprejmemo alternativno. Kadar pa je vrednost p večja od stopnje tveganja, rezultat testiranja ni statistično značilen, zato ničelne hipoteze ne zavržemo. Grafično smo prikazali tudi frekvenčne porazdelitve rezultatov, izmerjenih z obema analizatorjema in jih medsebojno primerjali, da bi si lažje predstavljali v katerih mejah leži večina meritev (38).

Z **Bland-Altmanovim testom** smo ocenjevali kako se primerjani analizni metodi ujemata med seboj. Izrisali smo tudi grafe, kjer so na osi y prikazane razlike povprečnih vrednosti, na osi x pa povprečne vrednosti meritev. Ob normalni porazdelitvi pričakujemo, da se bodo razlike povprečnih vrednosti nahajale znotraj 95% intervala ujemanja. Pomembno je, da je sipanje okoli biasa oz. premice povprečnega neujemanja med meritvami čim manjše (majhna vrednost odstopanja), da je 95% interval ujemanja čim ožji, spodnja in zgornja meja tega intervala ujemanja pa morata biti karseda enakomerno oddaljeni od črte povprečnega neujemanja. Iz Bland-Altmanovega diagrama lahko razberemo tudi ali se razliki (bias) med metodama z razpršenostjo točk ob premici odstopanja povečujeta ali zmanjšujeta s povečanjem primerjanih vrednosti (40).

Določili smo tudi diagnostično uporabnost primerjanih analiznih metod, in sicer s pomočjo **krivulj ROC**, ki prikažejo razmerje med deleži pričakovano pozitivnih vrednosti

(diagnostična občutljivost) in razlikami med deleži lažno pozitivnih rezultatov in vrednostjo 1 (diagnostična specifičnost). Na grafu so na osi x prikazane vrednosti 1-specifičnost, na osi y pa občutljivost. Izračunali smo tudi površino pod posamezno krivuljo (AUC). Pri popolnem testu bi imela površina pod krivuljo vrednost 1, kar bi pomenilo največjo diagnostično uporabnost testa (42).

Hipotezi, ki smo ju preverjali sta bili sledeči:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2$ – analizni metodi v določenem diagnostičnem območju dajeta primerljive vrednosti, zato sta enaki;

H_a : $\mu_1 \neq \mu_2$ – analizni metodi v določenem diagnostičnem območju ne dajeta primerljivih vrednosti, zato nista enaki.

4. REZULTATI

4.1 SKUPINE POSEBNIH VZORCEV

Pri primerjavi rezultatov meritev 21 izbranih dializnih vzorcev smo ugotovili, da sta oba analiznega sistema, pri določanju vseh štirih označevalcev, vse opredelila kot nereaktivne.

Z obema analiznima sistemoma smo 49 vzorcev MMD opredelili kot negativne, v 1 pa smo z obema zaznali prisotnost antigenov HBV. Pri analizi vzorcev OČKL pa smo izmerili različne rezultate, kar je predstavljeno v Preglednici III.

Preglednica III: Rezultati analize vzorcev OČKL.

Označevalec okužb	Delež reaktivnih - Abbott	Delež reaktivnih - Siemens	Končna interpretacija
HBsAg	0/50	0/50	50 negativnih
anti-HCV	0/50	0/50	50 negativnih
HIV Ag/Pt	8/50	0/50	50 negativnih
anti-TP	2/50	1/50 2/50 mejna vrednost	50 negativnih

4.2 REAKTIVNI KLINIČNI VZORCI

Pri vseh 40 arhivskih vzorcih (po 10 za vsak označevalec), ki so bili dokazano pozitivni, smo z obema analiznima sistemoma potrdili določane označevalce, zato smo sklepali, da sta enako občutljiva.

Z nereaktivno plazmo smo redčili vzorec krvodajalca, okuženega z genotipom A HBV in 1 vzorec krvodajalca okuženega z genotipom D HBV, da bi ugotovili, če med analiznima sistemoma obstaja razlika pri detekciji HBsAg glede na genotip HBV. V primeru genotipa A je bil analizni sistem Siemens za eno redčitev bolj občutljiv, saj je zaznal antigen tudi v zadnji redčitvi 1:20.480, medtem, ko ga Abbott ni. Pri genotipu D pa smo z obema analiznima sistemoma HBsAg še zaznali pri redčitvi 1:2.560. Reagenti obeh analiznih sistemov so bili validirani in zasnovani tako, da smo z njimi lahko zaznali različne genotipe HBV.

V skupino reaktivnih kliničnih vzorcev smo med drugim uvrstili krvodajalce, ki so bili v krajšem časovnem obdobju pred odvzemom krvi cepljeni proti hepatitisu B. Rekombinantni antigen iz cepiva zaznajo metode testiranja in te vzorce opredelijo kot reaktivne. HBsAg iz cepiva smo z analiznim sistemom Siemens določili v 4/6 vzorcev, in sicer je vzorec 4. dan po cepljenju umestil v sivo področje, vzorec 7. dan po cepljenju pa je opredelil kot nereaktivnega. Z analiznim sistemom Abbott smo vseh 6 vzorcev določili kot pozitivne.

4.3 ZUNANJE KONTROLE IN SEROKONVERZIJSKA PANELA

4.3.1 ZUNANJE KONTROLE MEDLABORATORIJSKE PRIMERJAVE

Dobljene rezultate obeh analiznih sistemov smo primerjali z rezultati pristojnih ustanov. Odstopanj ni bilo pri kontrolah MCA za HBsAg, saj smo z obema analiznima sistemoma zaznali prisotnost antigena pri enaki redčitvi (1:128), pri čemer sta oba analizna sistema vzorec opredelila kot reaktiven. Tudi pri kontrolah za anti-HCV ni bilo odstopanj. Zadnja redčitev, v kateri smo z analiznima sistemoma še zaznali prisotnost protiteles, pa je bila 1:256. Pri kontrolah za protitelesa in antigene HIV pa smo z analiznim sistemom ADVIA Centaur XP kot reaktivno opredelili še redčitev 1:1024, medtem, ko je bil za analizni sistem Abbott Architect v tem primeru rezultat nereaktiven. Pri testiranju kontrol MCA za bakterijo *T.pallidum* smo ugotovili, da z analiznim sistemom ADVIA Centaur XP zaznamo nižje koncentracije specifičnih protiteles (1:64 in 1:256), medtem, ko jih z analiznim sistemom Abbott Architect pri teh redčitvah nismo zaznali.

Preglednica IV: Prikaz rezultatov zunanje kontrole MCA pri določanju *T.pallidum*.

MCA LUES 2015.1				
Vzorec	Redčitev	Pričakovani rezultat	Abbott Architect® TP	Siemens ADVIA Centaur XP SYPH
F	1:4	POZITIVEN	12,66	>45,00
D	1:16	POZITIVEN	3,36	17,31
C	1:32	POZITIVEN	1,60	8,45
B	1:64	POZITIVEN ALI NEGATIVEN	0,88	5,06
E	1:256	POZITIVEN ALI NEGATIVEN	0,23	1,62
A	/	NEGATIVEN	0,06	<0,10

V Preglednici IV sta z rdečo barvo označeni tisti dve redčitvi, pri katerih je prišlo do razlik v zaznavanju protiteles med analiznima sistemoma. Oznaka »Pozitiven ali negativen« pomeni, da je koncentracija protiteles v kontroli MCA takšna, da jo nekateri analizni sistemi zaznajo, drugi pa ne, odvisno od občutljivosti, zato so proizvajalci oba rezultata smatrali za pravilna.

4.3.2 SEROKONVERZIJSKA PANELA

Pri prvem serokonverzijskem panelu sta oba analizna sistema vseh 5 vzorcev za HBV opredelila kot reaktivne. Pri drugem serokonverzijskem panelu pa je 1 vzorec analizni sistem Siemens opredelil kot reaktivnega, Abbott pa ga je umestil v t.i. sivo področje. Testiranje smo s slednjim še enkrat ponovili v duplikatu in končni rezultat je bil reaktiven. Naslednji trije vzorci so bili dokazano reaktivni, medtem ko sta bili meritvi enega vzorca pri obeh analiznih sistemih malo pod mejo reaktivnosti.

Tudi pri prvem HCV serokonverzijskem panelu ni bilo razlik v rezultatih – tako Siemens kot Abbott sta en vzorec opredelila kot reaktiven. Odstopanje smo opazili pri drugem serokonverzijskem panelu, saj je analizni sistem Abbott drugi vzorec opredelil kot reaktiven, Siemens pa kot nereaktiven. Potrditveni rezultati pri tem vzorcu so bili negativni. Meritev vseh ostalih vzorcev, razen prvega, ki je bil nereaktiven, sta oba analizna sistema v naraščajočih koncentracijah opredelila kot reaktivne.

V okviru zadnjega serokonverzijskega panela HIV, odstopanj ni bilo, saj sta oba analizna sistema pri obeh panelih 7 vzorcev opredelila kot nereaktivne, zadnje 3 pa kot reaktivne. Slednji so bili dejansko reaktivni, glede na potrditvene teste.

Preglednica V: Primerjava občutljivosti analiznih sistemov pri merjenju vzorcev obeh serokonverzijskih panelov.

		DELEŽ REAKTIVNIH VZORCEV	
Označevalec okužb	Serokoverzijski komplet Seracare	Abbott Architect®	Siemens ADVIA Centaur XP
		HBsAg	PHM934
PHM939	4/5		4/5
anti-HCV	PHV925	1/5	1/5
	PHV922	5/6	4/6
HIV Ab/Pt	PRB966	3/10	3/10
	PRB969	3/10	3/10

Iz podatkov, navedenih v Preglednici V vidimo, da so bili rezultati testiranja serokonverzijskega panela za določanje različnih označevalcev, zelo primerljivi.

4.4 MERITVE KONTROLNIH VZORCEV

4.4.1 MERITVE KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ADVIA Centaur XP

Kontrolo kakovosti oz. postopke, s katerimi spremljamo ustreznost delovnih procesov ter ob tem odkrivamo morebitne napake in posledično izvajamo potrebne korektivne ukrepe še pred izdajanjem rezultatov, smo izvajali vsak dan tik pred začetkom testiranja vzorcev. Serije kontrol za merjene označevalce okužb so bile ves čas enake.

Rezultate meritev kontrol za vse dni testiranj (od 1.6. do 16.6.2015) smo predstavili v obliki Levey-Jennigsovih kontrolnih grafov. Navedeno časovno obdobje smo izbrali zato, ker smo takrat vsak dan testirali skupno 2.001 vzorcev.

Vse izmerjene meritve kontrol so bile znotraj omenjenih kontrolnih območij, zato lahko rezultate meritev vseh vzorcev sprejmemo kot verodostojne. Primer izrisanega Levey-Jennigsovega grafa za *T.pallidum* je v Prilogi 1.

4.4.2 MERITVE KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZNIM SISTEMOM ABBOTT ARCHITECT

Oceno kakovosti testiranja z analiznim sistemom Abbott Architect smo podali zgolj opisno, saj je nismo izvedli sami, pač pa so jo vsakodnevno pri rutinskem delu opravili

zaposleni v laboratoriju. Pri tem so uporabljali komercialne kontrole proizvajalca reagentov.

Vsi rezultati meritev kontrol so bili znotraj območja sprejemljivosti, zato ne dvomimo v zanesljivost rezultatov testiranih vzorcev krvodajalcev.

4.5 VZORCI REDNIH KRVODAJALCEV

4.5.1 DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST

Virus hepatitisa B

Preglednica VI: Prikaz rezultatov testiranj na HBV med začetno reaktivnimi in ponovljeno reaktivnimi vzorci.

	Siemens				Abbott			
	Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju		Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju	
HBV	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Okužba	0	0	0	0	0	0	0	0
Ni okužbe	4	1.997	2	1.999	2	1.999	2	1.999

Legenda: R= število reaktivnih vzorcev, NR- število nereaktivnih vzorcev.

Glede na dobljene rezultate testiranj, smo lahko izračunali diagnostični specifičnosti, kot sledi:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(1997/1997+4)*100\% = \underline{99,80\%}$
(interval zaupanja: 99,76-100,00)
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(1999/1999+2)*100\% = \underline{99,9\%}$

Pri ponovljivem testiranju pa smo z obema analiznima sistemoma dva dodatna vzorca opredelili kot lažno pozitivna in ponovno izračunali diagnostični specifičnosti:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(1999/2+1999)*100\% = \underline{99,90\%}$
(interval zaupanja: 99,76-100,00)

- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(1999/2+1999)*100\% = \underline{99,90\%}$
(interval zaupanja: 99,76-100,00)

Virus hepatitisa C

Preglednica VII: Prikaz rezultatov testiranj prisotnosti HCV z začetno in ponovljeno reaktivnimi vzorci.

	Siemens				Abbott			
	Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju		Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju	
HCV	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Okužba	0	0	0	0	0	0	0	0
Ni okužbe	14	1.987	4	1.997	8	1.993	8	1.993

Legenda: R= število reaktivnih vzorcev, NR- število nereaktivnih vzorcev.

Pri testiranju vzorcev krvodajalcev na prisotnost HCV smo pri izračunu diagnostične specifičnosti za začetno reaktivne rezultate dobili naslednje vrednosti:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(1987/1987+14)*100\% = \underline{99,3\%}$
(interval zaupanja: 99,19-99,81)
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(1993/1993+14)*100\% = \underline{99,6\%}$

Pri ponovljeno reaktivnih rezultatih pa smo izračunali naslednje vrednosti:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(1997/4+1997)*100\% = \underline{99,80\%}$
(interval zaupanja: 99,68-100,00)
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(1993/8+1993)*100\% = \underline{99,60\%}$
(interval zaupanja: 99,39-99,91)

Virus HIV

Preglednica VIII: Prikaz rezultatov testiranja prisotnosti HIV začetno in ponovljeno reaktivnimi vzorci.

	Siemens				Abbott			
	Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju		Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju	
HIV	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Okužba	0	0	0	0	0	0	0	0
Ni okužbe	1	2.000	1	2.000	0	2.001	0	2.001

Legenda: R= število reaktivnih vzorcev, NR- število nereaktivnih vzorcev.

Izračun diagnostične specifičnosti glede na začetno reaktivne rezultate:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(2000/1+2001)*100\% = \underline{99,95\%}$
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(2001/0+2001)*100\% = \underline{100\%}$

Diagnostični specifičnosti, izračunani glede na ponovljeno reaktivne rezultate:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(2000/1+2000)*100\% = \underline{99,95\%}$
(interval zaupanja: 99,85-100,00)
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(2001/0+2001)*100\% = \underline{100\%}$

Treponema pallidum

Preglednica IX: Prikaz rezultatov testiranja prisotnosti *T.pallidum* z začetno in ponovljeno reaktivnimi vzorci.

	Siemens				Abbott			
	Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju		Začetno testiranje		Po ponovljenem testiranju	
TP	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Okužba	0	0	0	0	0	0	0	0
Ni okužbe	0	2.001	0	2.001	1	2.000	1	2.000

Legenda: R= število reaktivnih vzorcev, NR- število nereaktivnih vzorcev.

Na osnovi začetno izmerjenih reaktivnih rezultatov smo izračunali naslednje vrednosti diagnostičnih specifičnosti:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(2001/2001+0)*100\% = 100\%$
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(2000/1+2000)*100\% = 99,95\%$

Z upoštevanjem ponovljeno reaktivnih rezultatov pa smo dobili naslednje vrednosti:

- Diagnostična specifičnost (Siemens) = $(2001/2001+0)*100\% = 100\%$
- Diagnostična specifičnost (Abbott) = $(2000/1+2000)*100\% = 99,95\%$
(interval zaupanja: 99,85-100,00)

Ker so proizvajalci reagentov za oba analizna sistema le-te validirali tudi na skupini vzorcev krvodajalcev, smo lahko njihove rezultate v obliki izračunanih specifičnosti, neposredno primerjali z našimi, kar predstavljamo v Preglednici X.

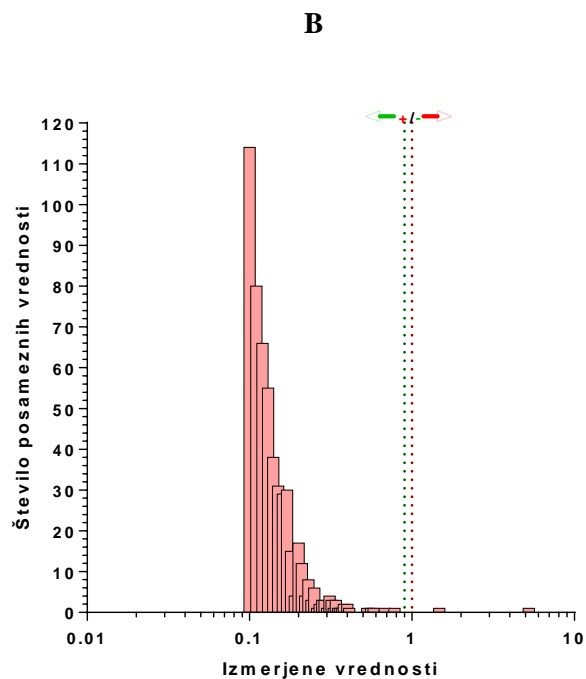
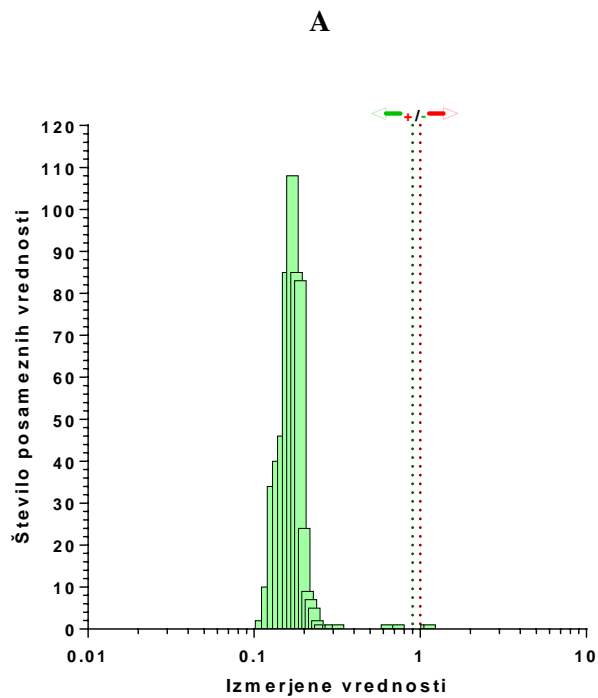
Preglednica X: Primerjava izračunanih specifičnosti med našimi rezultati in rezultati proizvajalcev.

Označevalec	Naši rezultati (%)		Rezultati proizvajalcev (%)	
	Abbott	Siemens	Abbott	Siemens
HBsAG	99,90	99,90	99,91	99,91
anti-HCV	99,60	99,80	99,60	99,90
Ag/Pt HIV	100,0	99,95	≥ 99,50	99,76
anti-TP	99,95	100,0	≥ 99,50	99,50

4.5.2 DODATNE STATISTIČNE PRIMERJAVE REZULTATOV

Virus hepatitisa B (HBsAg)

Izmed vseh testiranih vzorcev (N=2.001), smo izločili vse tiste, s katerimi smo dobili rezultate s predznakom <, pri čemer nam je za statistično obdelavo ostalo 548 parov rezultatov, določenih z vsakim od analizatorjev. Najprej smo z D'Agostino in Pearsonovim omnibus testom preverili ali se njihove vrednosti porazdeljevale normalno. Dobili smo vrednost $p < 0,0001$, kar pomeni, da se vrednosti niso porazdeljevale normalno. Takšen rezultat je pričakovan zaradi izločenih vrednosti s predznakom <, kar pomeni, da v analizo nismo uvrstili velik del nizkih vrednosti. Za lažjo predstavo kako so se vrednosti, ki smo jih uporabili v statistični analizi, porazdeljevale, smo izrisali frekvenčna histograma za oba analizna sistema (Slika 8). Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica prikazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka +/- označuje sivo oz. mejno področje, ki leži med obema omenjenima mejama, ki ga moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Abbott. Logaritemsko skalo na abscisi smo uporabili zaradi lažjega prikaza razporejenosti izmerjenih vrednosti.



Slika 8: Frekvenčna histograma posameznih vrednosti meritev istih vzorcev ($N = 548$), izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za HBsAg.

Legenda: pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka $+/-$ označuje sivo področje med obema omenjenima mejama, ki ga moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Abbott.

V naslednjem koraku smo preverjali razlike v aritmetičnih sredinah primerjanih meritev vzorcev oz. veljavnost naslednjih dveh hipotez:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ – rezultati meritev istih vzorcev z analiznima metodama dajeta primerljive vrednosti glede na interpretativno območje, zato sta enaki;

$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$ – analizni metodi ne dajeta primerljivih vrednosti, zato nista enaki.

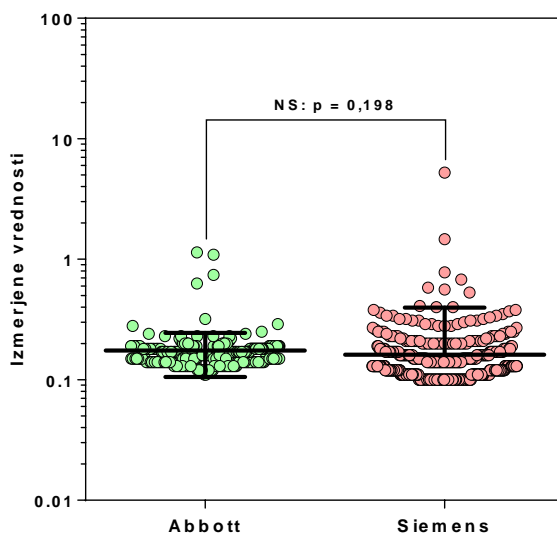
Primerjavo smo izvedli z dvostranskim neparnim t-testom (Preglednica XI).

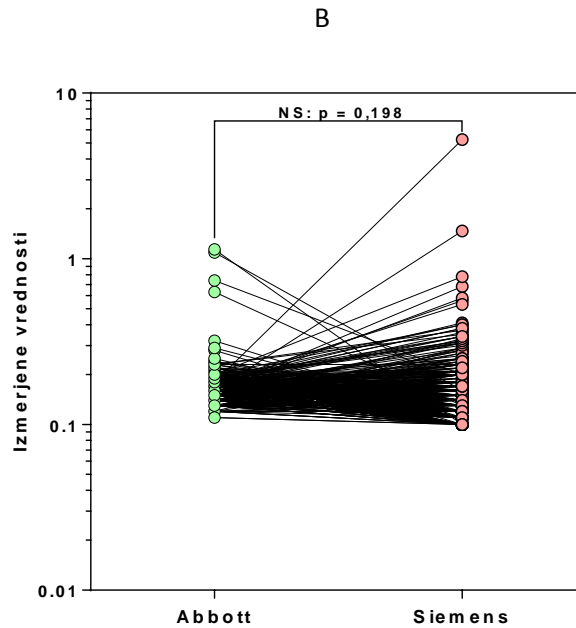
Preglednica XI: Rezultati dvostranskega neparnega t-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje meritev HBsAg, določenih z obema analiznima sistemoma.

Dvostranski neparni T-test	
Abbott $\bar{x} \pm SD$	0,1751 \pm 0,0694
Siemens $\bar{x} \pm SD$	0,1616 \pm 0,2360
p vrednost	0,1978
Signifikantno različno ($p < 0,05$) ?	NE
T vrednost, stopinje prostosti	t=1,289 df=1094
Število parov	548

Vrednost p je bila večja od stopnje tveganja α , zato smo sprejeli ničelno hipotezo, da rezultati meritev istih vzorcev z analiznima metodama dajeta primerljive vrednosti glede na interpretativno območje, zato sta enaki. Izračunali smo tudi 95% interval zaupanja, ki je bil med -0,0342 in 0,0071. Rezultate smo predstavili grafično (Slika 9).

A





Slika 9: Grafični prikaz primerjanih vrednosti meritev HBsAg določenih s posameznim analiznim sistemom v istih vzorcih (N = 548).

Legenda: (A) v obliki poudarjenih črt so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni (SD).
(B) povezanost meritev istih vzorcev.

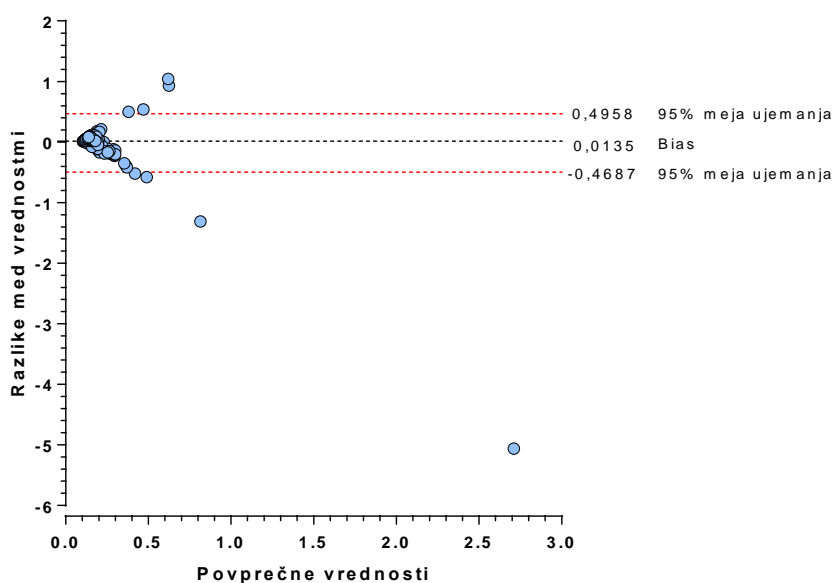
Na Sliki 9 vidimo razpored vrednosti meritev, ki je bolj homogen pri analiznem sistemu Abbott. Logaritemsko skalo na ordinati smo uporabili zaradi boljšega prikaza razporejenosti izmerjenih vrednosti. Oznaka NS pomeni statistično neznačilno razliko med povprečnima vrednostma merite (dvostranski neparni t-test). Iz Slike 9B lahko tudi razberemo, da se je le pri nekaj rezultatih posameznega vzorca vrednost enega analiznega sistema zelo razlikovala od vrednosti drugega. Tako ti, kot tudi rezultati predstavljeni za ostale označevalce okužb, so zgolj informativne narave, saj nismo statistično analizirali vseh meritev.

Z Bland-Altmanovim testom smo analizirali razlike povprečnih vrednosti rezultatov testiranja proti samim povprečnim vrednostim.

Preglednica XII: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri HBV; SD=standardni odklon.

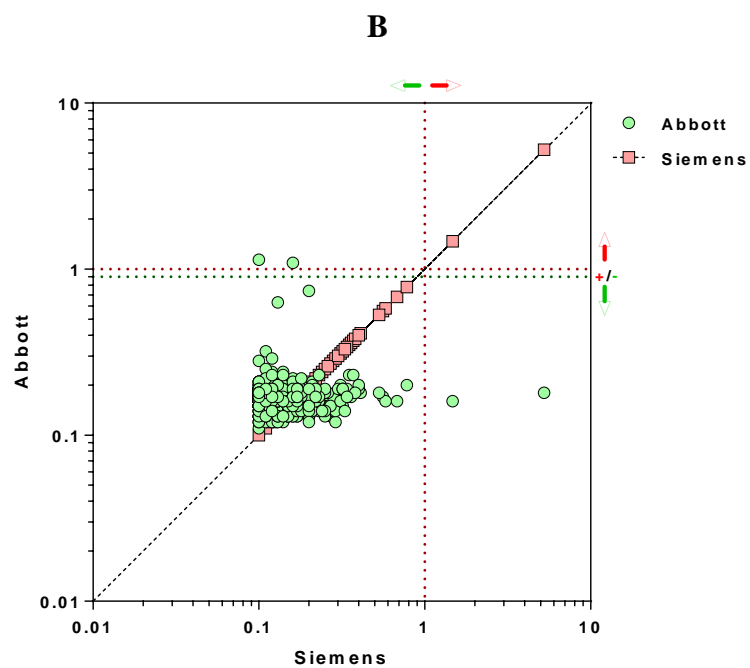
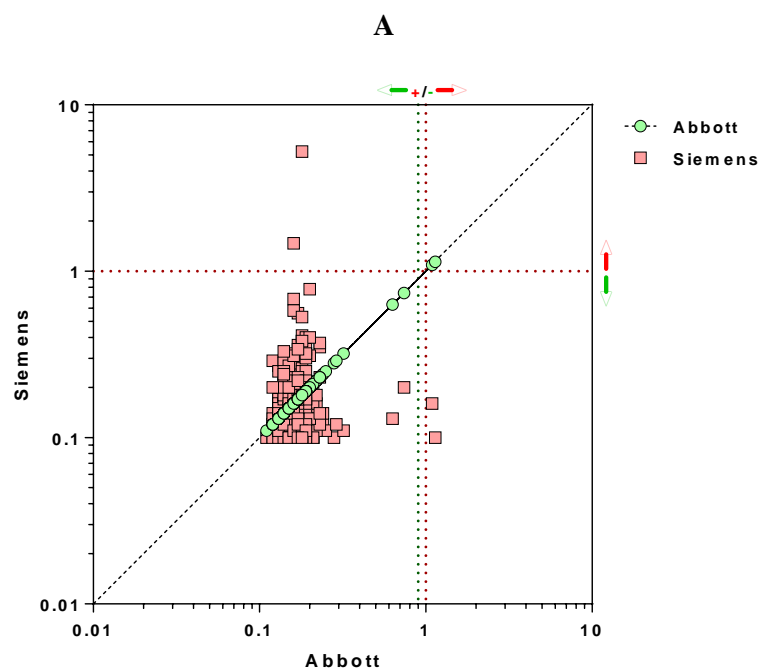
Povprečna vrednost odstopanja (bias)	0,0135
SD biasa	0,2461
95% interval ujemanja	od -0,4687 do 0,4958

Izračunana povprečna vrednost odstopanja je majhna in blizu vrednosti 0. 95% interval zaupanja je razmeroma ozek, na grafu pa vidimo, da sipanje okoli premice odstopanja ni preveliko, saj večina točk leži znotraj 95% meja zaupanja, zato lahko trdimo, da so primerjane meritve enakovredne. Torej so rezultati, izmerjeni z različnima analiznima sistemoma, primerljivi (Slika 10). Opazimo tudi, da se s povečevanjem povprečnih vrednosti meritev večajo tudi razlike med primerjanima meritvama, zato je tudi sipanje večje.



Slika 10: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev ($N = 548$), opravljenih z obema analiznima sistemoma za HBsAg.

Slika 11 prikazuje porazdelitev rezultatov posameznega analiznega sistema glede na drugega. Logaritemski skali na abscisi in ordinati smo uporabili za jasnejši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.



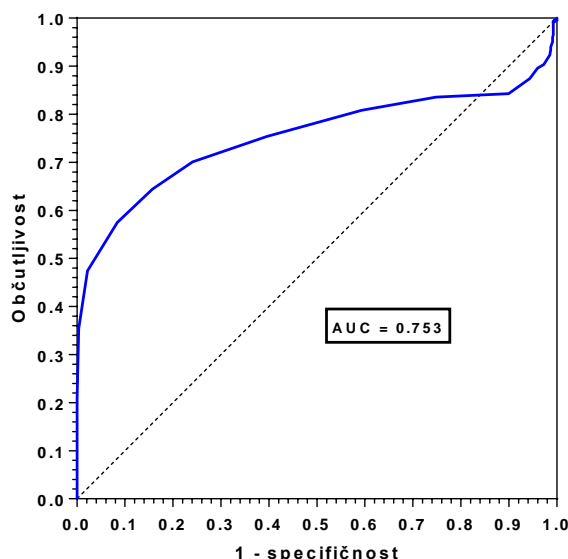
Slika 11: Grafični prikaz porazdelitev izmerjenih vrednosti istih vzorcev (N = 548) za HBsAg, izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede Abbott B – Abbott glede Siemens.

Legenda: Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka +/- označuje sivo področje med obema omenjenima mejama, ki ga moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Abbott. Logaritemski skali na abscisi in ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.

Na Grafu A, kjer zlati standard predstavlja analizni sistem Abbott, vidimo, da so rdeči simboli, ki predstavljajo vrednosti izmerjene z analiznim sistemom Siemens, dokaj zgoščeno in enakomerno razporejene ob liniji meritev analiznega sistema Abbott. Izstopa le nekaj posameznih vrednosti, ki pri obeh analizatorjih ležijo izven območja negativnih vrednosti. Podobno sliko vidimo tudi na Grafu B.

S krivuljo ROC smo ugotavljali diagnostično učinkovitost obeh primerjanih analiznih sistemov. S pomočjo površine pod krivuljo (AUC) lahko določimo diagnostično zanesljivost testa, pri čemer velja, da večja kot je AUC, boljša je uporabnost testa, in sicer kot sledi: 0,9-1=izvrsten test, 0,80-0,90=dober test, 0,70-0,80=srednje dober test in 0,60-0,70=slabši test (40).

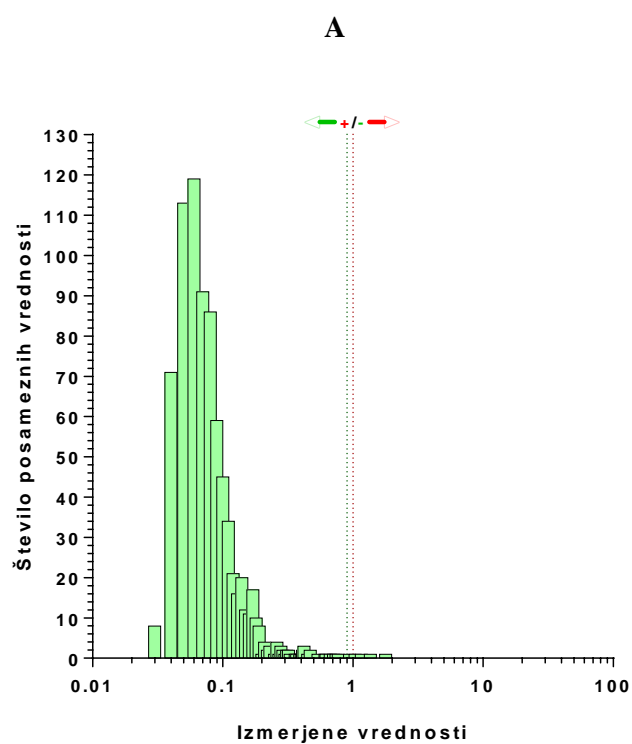
Površina pod krivuljo je znašala 0,753 (Slika 12), kar pomeni, da razpolagamo s srednje dobrim testom, ki pa je primeren za presejalno testiranje.

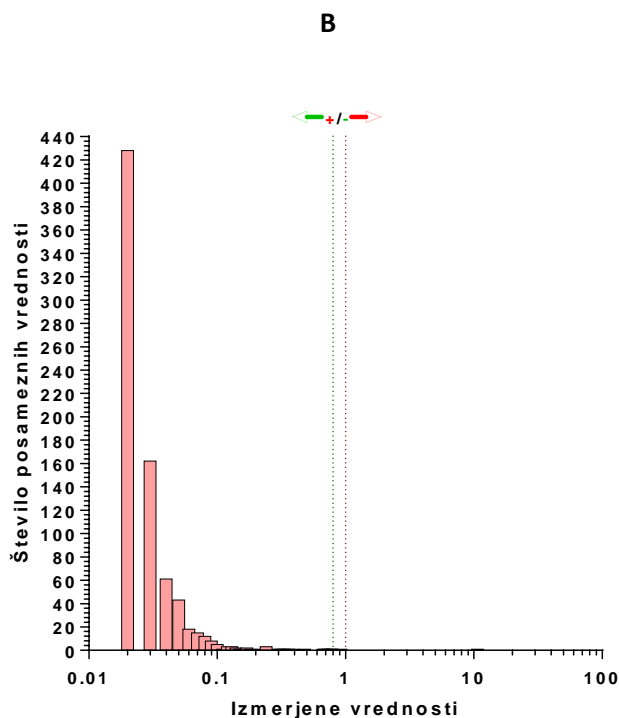


Slika 12: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določeni s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev (N = 548) opravljenih z analiznim sistemom Siemens, glede na analizni sistem Abbott za HBsAg.

Virus hepatitisa C (HCV)

Statistično smo obdelali 792 rezultatov vzorcev testiranih na prisotnost protiteles proti HCV. Pri preverjanju normalnosti porazdelitve meritev, smo dobili vrednost $p < 0,0001$, kar je manj od stopnje tveganja, in tako ugotovili, da se vrednosti ne porazdeljujejo normalno. Frekvenčna prikaza posameznih vrednosti, izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott in Siemens sta predstavljena na Sliki 13.





Slika 13: Frekvenčna histograma, ki prikazujeta število posameznih vrednosti meritev istih vzorcev ($N = 792$), izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za Pt anti-HCV.

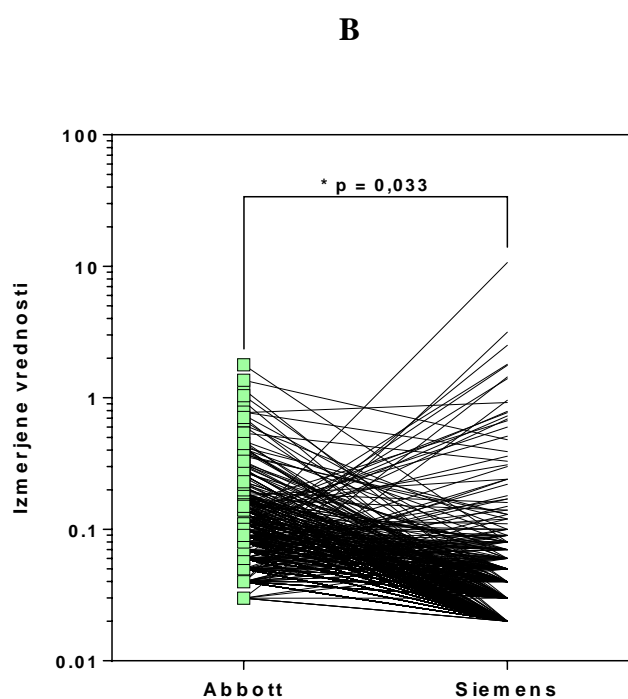
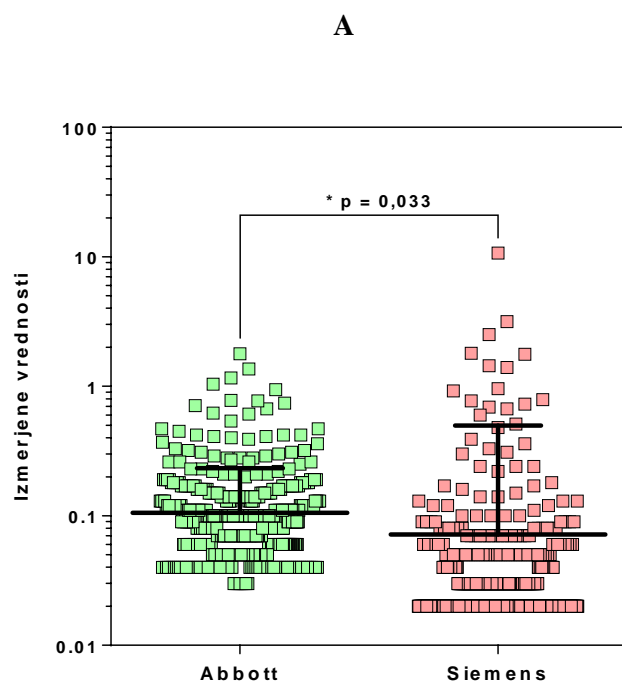
Legenda: vidimo, da so vrednosti, izmerjene z analizatorjem Abbott bolj homogeno porazdeljene (Slika 10 A) kot tiste, ki smo jih določili z analiznim sistemom Siemens (Slika 10 B). Poleg tega je bila povprečna vrednost meritev, določenih z analiznim sistemom Abbott večja od tiste, ki smo jo izračunali v primeru uporabe analiznega sistema Siemens. To potrjujejo tudi nadaljnje statistične analize.

Preglednica XIII: Rezultati dvostranskega neparnega T-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje meritev protiteles anti-HCV, določenih z obema analiznima sistemoma.

Dvostranski neparni T-test	
Abbott $\bar{x} \pm SD$	0,1054 \pm 0,1282
Siemens $\bar{x} \pm SD$	0,0717 \pm 0,4262
p vrednost	0,0331
Signifikantno različno ($p < 0,05$) ?	DA
T vrednost, stopinje prostosti	t=2,132 df=1583
Število parov	792

S t-testom smo določili vrednost $p=0,033$, kar je manj od stopnje tveganja α , zato lahko ničelno hipotezo zavržemo in sprejmemo alternativno, kar pomeni, da se povprečni

vrednosti primerjanih meritev statistično značilno šibko razlikujeta, pri tem smo izračunali 95% intervala zaupanja od -0,0647 do -0,0027. Rezultati so grafično predstavljeni na Sliki 14.



Slika 14: Grafična prikaza primerjanih vrednosti meritev protiteles anti-HCV določenih s posameznim analiznim sistemom v istih vzorcih (N = 792).

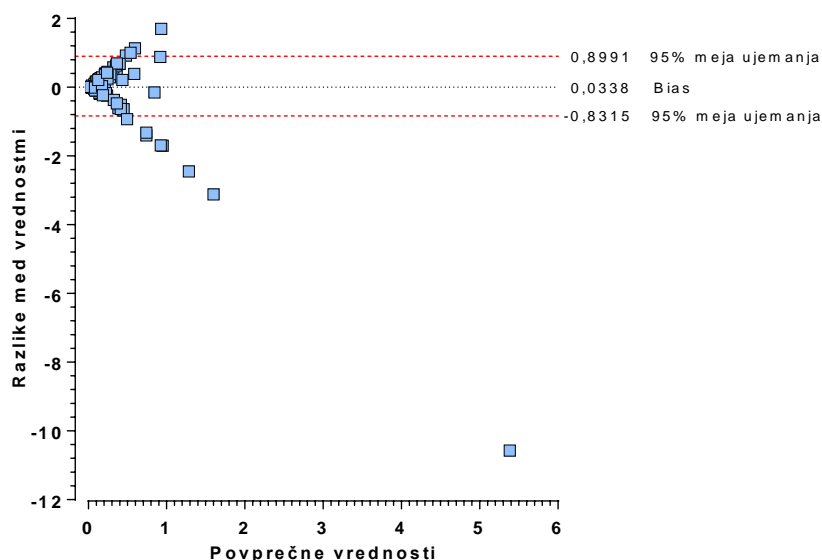
Legenda: (A) v obliki poudarjenih črt so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni (SD).
 (B) povezanost meritev istih vzorcev.

Logaritemsko skalo na ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti. Na Sliki 14 vidimo, da je v primeru analiznega sistema Siemens sipanje rezultatov večje kot pri analiznem sistemu Abbott. Oznaka * pomeni, da se povprečni vrednosti meritev s t-testom med seboj statistično značilno šibko razlikujeta ($p = 0,033$). Na Sliki 14B lahko vidimo, da se je le pri enem rezultatu vrednost posameznega vzorca enega analiznega sistema izstopajoče razlikovala od vrednosti drugega.

Izsledki Bland-Altmanovega testa so zbrani v Preglednici XIV in grafično predstavljeni na Sliki 15.

Preglednica XIV: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri HCV; SD=standardni odklon.

Povprečna vrednost odstopanja (bias)	0,0338
SD biasa	0,4415
95% interval ujemanja	od -0,8315 do 0,8991

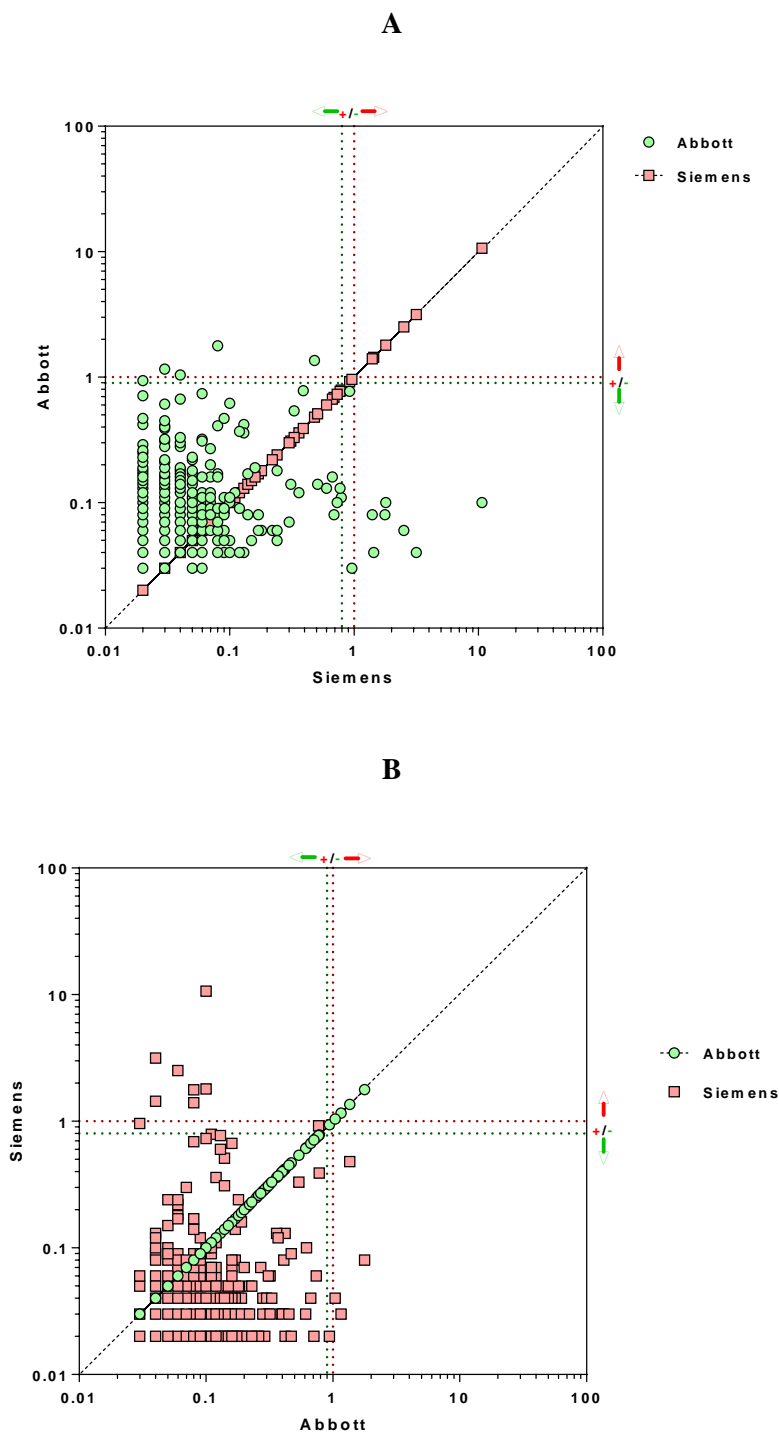


Slika 15: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev ($N = 792$), opravljenih z obema analizatorjema za anti-HCV.

Vrednost odklona oziroma biasa je 0,0338, kar pomeni, da je odstopanje majhno, zato lahko trdimo, da dobimo z obema analiznima sistemoma primerljive vrednosti meritev, pri

čemer je večina le-teh znotraj 95% mej ujemanja. S povečanjem povprečnih vrednosti se razlike med primerjanimi meritvami povečujejo, s tem pa tudi njihova nehomogenost.

Grafično smo predstavili tudi porazdelitve rezultatov meritev določenih s posameznim analiznim sistemom, glede na tiste, ki smo jih izmerili z drugim (Slika 16).

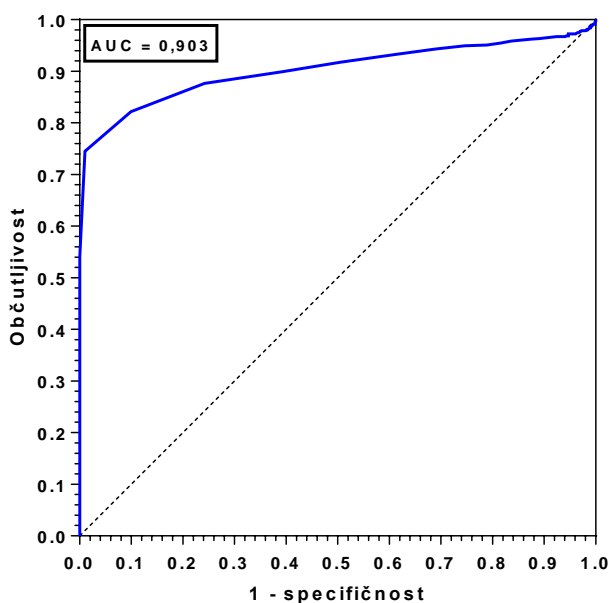


Slika 16: Grafični prikaz porazdelitev vrednosti istih vzorcev (N = 792) za HCV izmerjenih s primerjanimi analiznima sistemoma: A – Siemens glede na Abbott, B – Abbott glede na Siemens.

Legenda: Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaki +/- označuje sivi področji med obema omenjenima mejama, ki ju moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznima sistemoma Abbott in Siemens. Logaritemski skali na abscisi in ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.

Tu na obeh grafih vidimo, da vrednosti meritev obeh analiznih sistemov precej sipajo okrog zvezne linije in jih v obeh primerih kar nekaj leži v področju, ki predstavlja pozitiven rezultat testa.

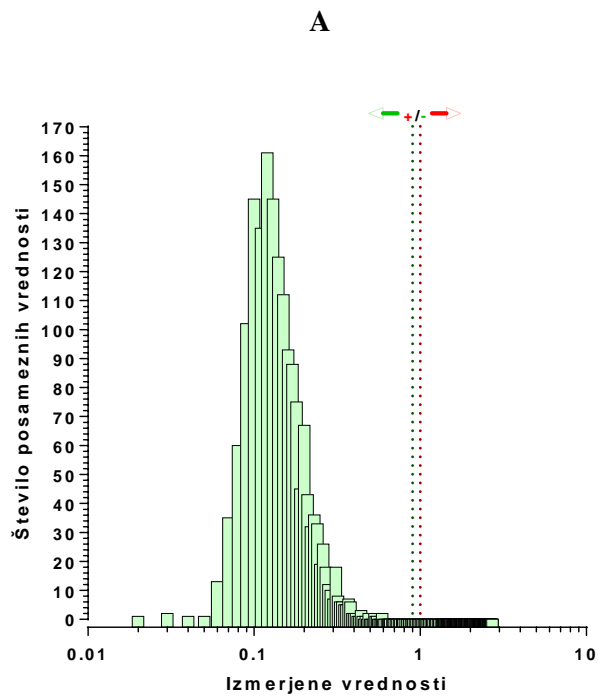
Z določitvijo krivulje ROC in vrednosti AUC (0,903) (Slika 17) smo ugotovili, da je novi test (Siemens) izvrsten in diagnostično zanesljiv.



Slika 17: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določeni s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev (N = 792), opravljenih z analiznim sistemom Siemens, glede na analizni sistem Abbott za anti-HCV.

Virus HIV (Ag/Pt HIV)

Statistično smo lahko analizirali 1.724 meritev vzorcev. S testom za preverjanje normalnosti porazdelitve izmerjenih vrednosti, smo določili vrednost $p < 0,0001$, kar pomeni, da ni šlo za normalno porazdelitev. Frekvenčna prikaza posameznih vrednosti meritev izmerjenih na sistemih Abbott in Siemens sta predstavljena na Sliki 18.



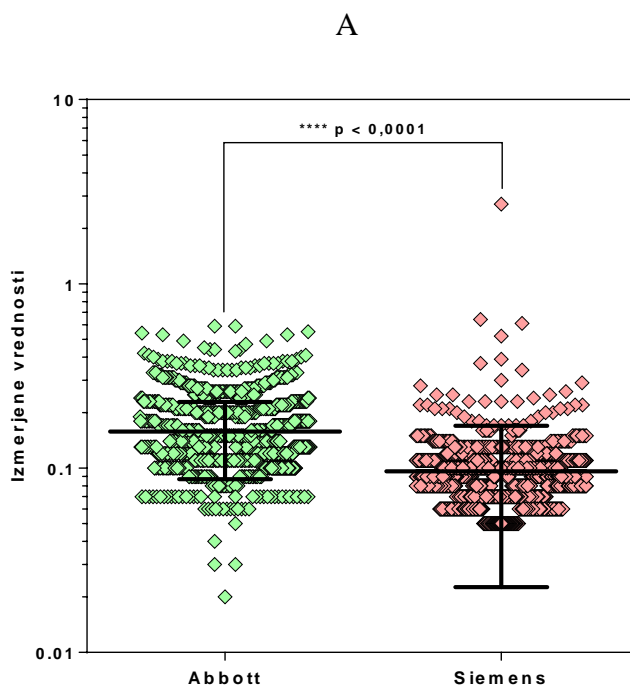
Slika 18: Frekvenčna histograma, ki prikazujeta število posameznih vrednosti meritev istih vzorcev ($N = 1.724$), določenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za Ag/Pt HIV. Legenda: Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka +/- označuje sivo področje med obema omenjenima mejama, ki ga moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Abbott. Logaritemsko skalo na abscisi smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.

Na sliki vidimo, da je povprečna vrednost meritev izmerjenih z analiznim sistemom Siemens manjša od tiste, ki smo jo določili v primeru uporabe analiznega sistema Abbott. V nadaljevanju smo izvedli t-test (Preglednica XV).

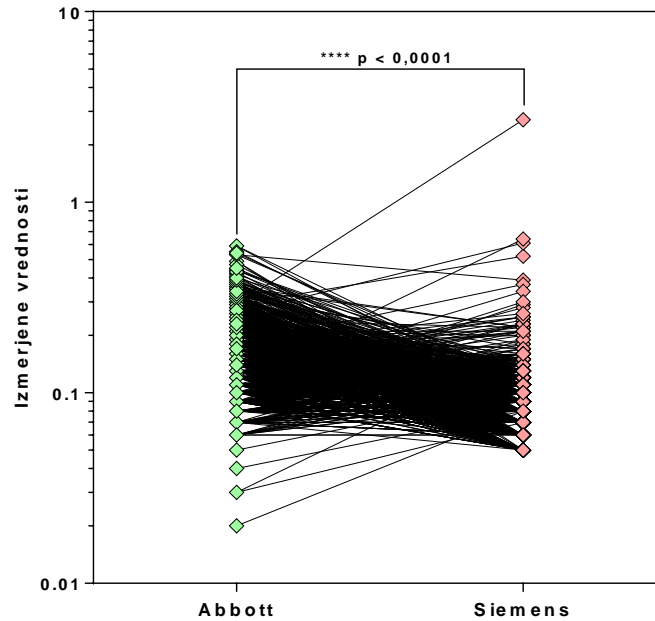
Preglednica XV: Rezultati dvostranskega neparne t-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje meritev Ag/Pt HIV, določenih z obema analiznima sistemoma.

Dvostranski neparni T-test	
Abbott $\bar{x} \pm SD$	0,1577 \pm 0,0707
Siemens $\bar{x} \pm SD$	0,0961 \pm 0,0735
p vrednost	< 0,0001
Signifikantno različno (p < 0,05) ?	DA
T vrednost, stopinje prostosti	t=25,07 df=3446
Število parov	1724

Pri t-testu smo dobili vrednost $p < 0,0001$, kar je manj od stopnje tveganja α , zato smo ničelno hipotezo zavrgli ter sprejeli alternativno, in sicer da analizni metodi v določenem diagnostičnem območju ne dajeta primerljivih vrednosti. Pri tem smo določili tudi 95% interval zaupanja, in sicer od -0,0664 do -0,0057. Rezultate smo predstavili na Sliki 19.



B



Slika 19: Grafična prikaza primerjanih vrednosti meritev Ag/Pt HIV v istih vzorcih (N = 1.724). Legenda: Na grafu A so v obliki poudarjenih črt prikazane tudi srednje vrednosti in standardne napake, pri čemer sta spodnja dela standardnih napak v obeh skupinah meritev izven uporabljene skale, zato nista prikazana. Logaritemsko skalo na ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti. Oznaka **** pomeni, da se povprečni vrednosti meritev, ki smo ju testirali z dvostranskim neparnim t-testom med seboj močno statistično značilno razlikujeta ($p < 0,0001$).

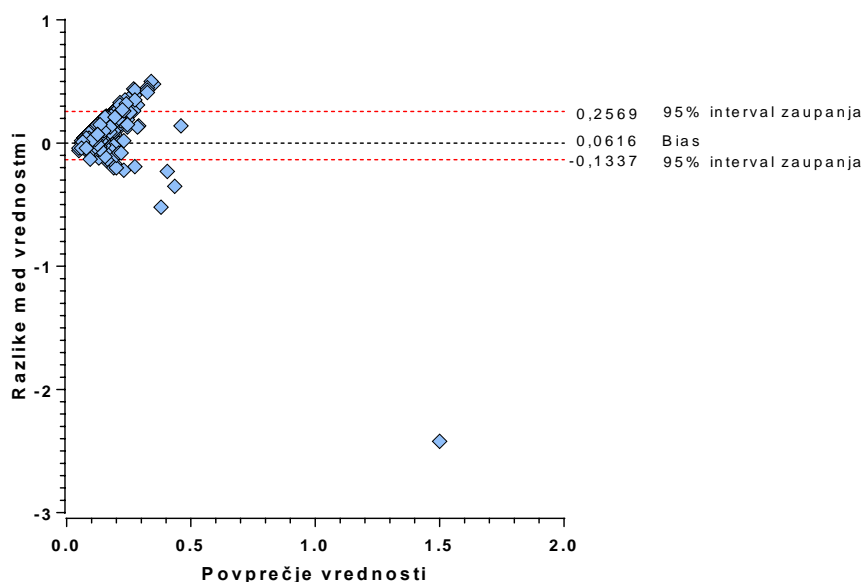
Vidimo, da so vrednosti izmerjene s posameznima analiznima sistemoma razporejene razmeroma homogeno, nekaj več sipanja je pri nižjih vrednostih meritev, določenih z analiznim sistemom Abbott. Med meritvami, izmerjenimi z analiznim sistemom Siemens pa je večje sipanje pri njihovih višjih vrednostih. Na Sliki 19B vidimo, da se je le pri enem rezultatu vrednost posameznega vzorca enega analiznega sistema zelo razlikovala od vrednosti drugega.

Rezultati Bland-Altmanovega testa so predstavljeni v Preglednici XVI in na Sliki 20.

Preglednica XVI: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri HIV; SD=standardni odklon.

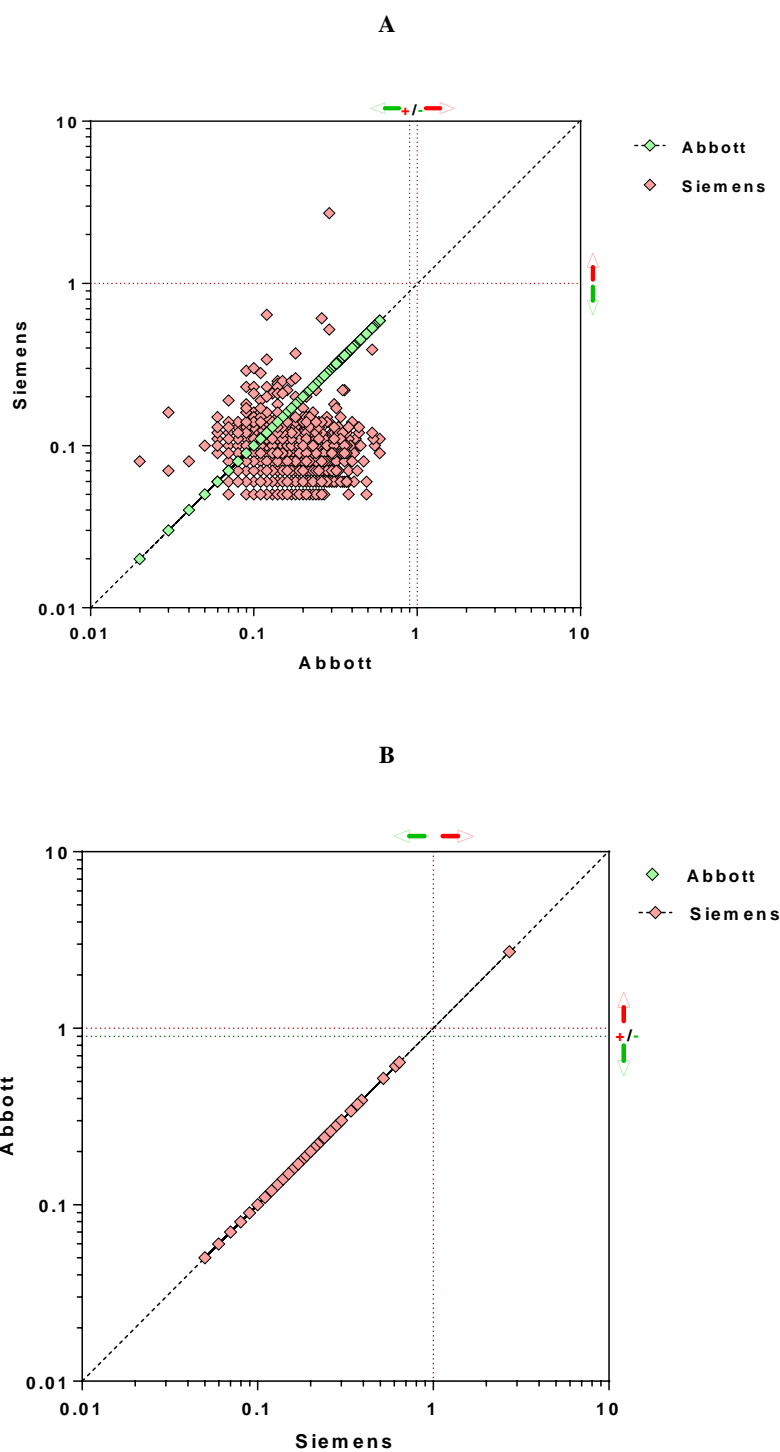
Povprečna vrednost odstopanja (bias)	0,0616
SD biasa	0,0997
95% interval ujemanja	od -0,1337 do 0,2569

Vrednost odstopanja oziroma biasa je 0,0616, kar pomeni, da dobimo z obema analiznima sistemoma primerljive vrednosti meritev, pri čemer je večina točk na grafu znotraj 95% intervala zaupanja, ki je tudi ustrezno ozek.



Slika 20: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev (N = 1.724), opravljenih z obema analiznima sistemoma za Ag/Pt HIV.

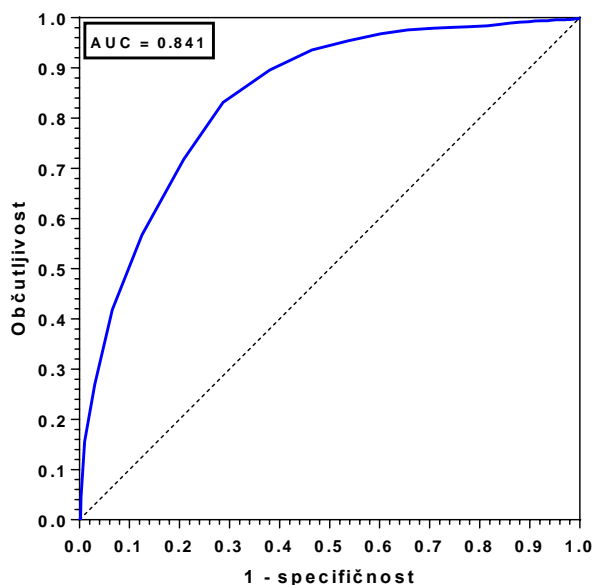
Z grafično predstavitevijo porazdelitev vrednosti meritev, izmerjenih s posameznim analiznim sistemom, glede na tiste, določene z drugim, smo želeli prikazati njihove položaje znotraj in izven območja negativnih rezultatov (Slika 21).



Slika 21: Grafični prikaz porazdelitev vrednosti istih vzorcev ($N = 1.724$) za Ag/Pt HIV, izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede na Abbott, B – Abbott glede na Siemens. Legenda: Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka \pm označuje sivo področje med obema omenjenima mejama, ki ga moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Abbott. Logaritemski skali na abscisi in ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.

Vidimo, da leži večina vrednosti na obeh grafih v območju negativnih rezultatov in da je njihova razporeditev dokaj strnjena.

V nadaljevanju smo izpisali še krivuljo ROC in izračunali površino pod njo (AUC) (Slika 22).



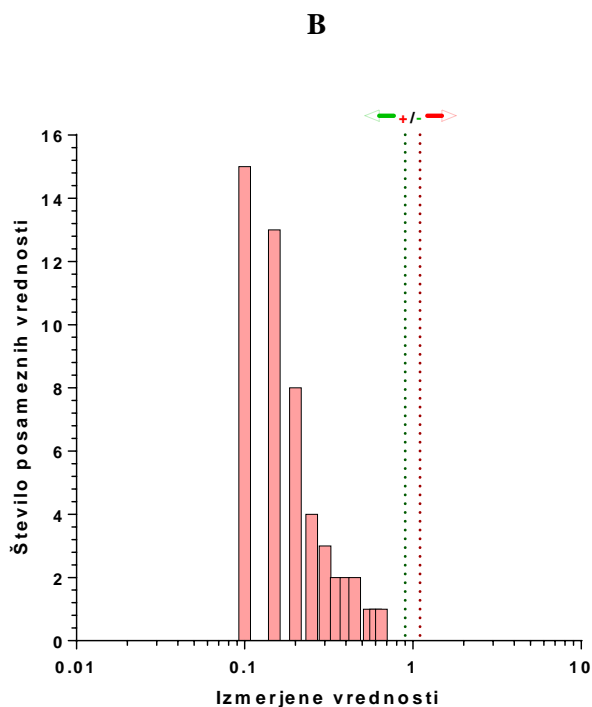
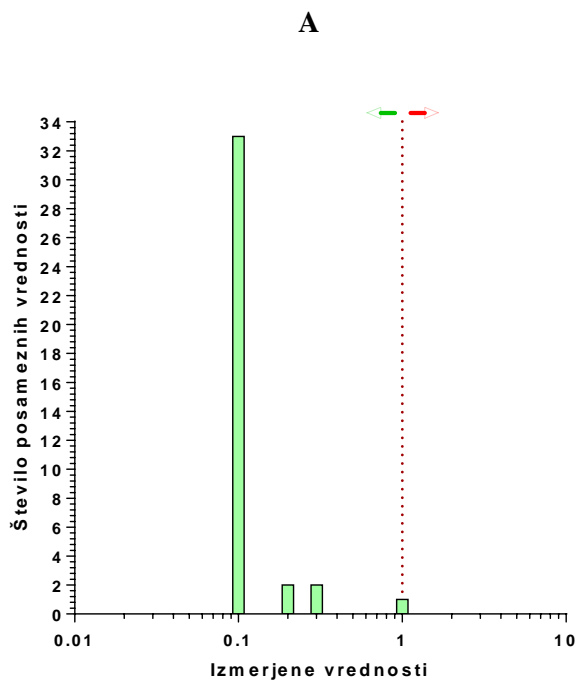
Slika 22: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določeni s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev ($N = 1.724$), opravljenih z analizatorjem Siemens, glede na analizator Abbott za Ag/Pt HIV.

Oblika krivulje ter vrednost AUC, ki je 0,841, kažeta na dober in diagnostično zanesljiv test, ki ustreza zahtevam za presejalno testiranje.

Treponema pallidum (anti-TP)

Po izločitvi meritev s predznakom \leq , smo lahko statistično analizirali 52 rezultatov testiranja na prisotnost protiteles proti *T.pallidum*. Z D'Agostino in Pearson omnibus testom normalnosti, s katerim smo preverjali ali se primerjane vrednosti porazdeljujejo normalno, smo dobili vrednost $p < 0,0001$, kar je manj od stopnje tveganja, kar pomeni, da vzorci niso normalno porazdeljeni. Frekvenca posameznih vrednosti izmerjenih na sistemih Abbott in Siemens smo predstavili na Sliki 23. Vidimo, da je bila večina meritev določenih z analiznim sistemom Abbott blizu ali enakih vrednosti 0,1, ki predstavlja negativen rezultat. Tudi na grafu, ki predstavlja frekvenčno porazdelitev rezultatov, izmerjenih z

analiznim sistemom Siemens vidimo, da je največ meritev blizu vrednosti 0,1 in 0,2 (področje negativnih rezultatov).



Slika 23: Frekvenčna histograma, ki prikazujeta število posameznih vrednosti meritev istih vzorcev (N = 52), izmerjenih z analiznima sistemoma Abbott (A) in Siemens (B) za anti-TP.

Legenda: Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka +/- označuje sivo področje med obema omenjenima mejama, ki ga

moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Siemens. Logaritemsko skalo na abscisi smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.

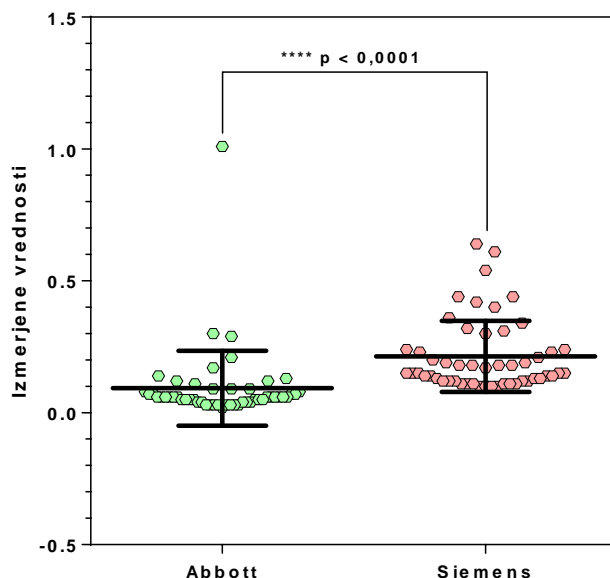
Rezultate smo nadalje, tako kot pri ostalih testiranih označevalcih okužb, primerjalno testirali s t-testom (Preglednica XVII).

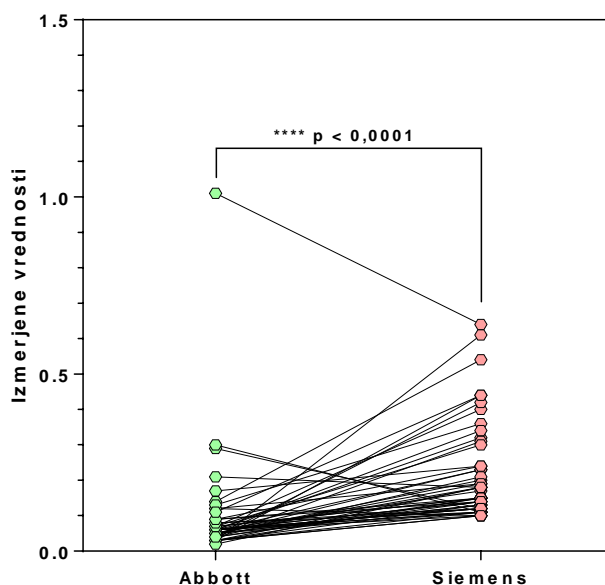
Preglednica XVII: Rezultati dvostranskega neparne T-testa, ki smo ga uporabili za primerjalno vrednotenje protiteles anti-*T.pallidum*, določenih z obema analiznima sistemoma.

Dvostranski neparni T-test	
Abbott $\bar{x} \pm SD$	0,0931 \pm 0,1419
Siemens $\bar{x} \pm SD$	0,2135 \pm 0,1345
p vrednost	< 0,0001
Signifikantno različno (p < 0,05) ?	DA
T vrednost, stopinje prostosti	t=4,439 df=102
Število parov	52

S t-testom smo določili vrednost $p < 0,0001$, kar je manj od stopnje tveganja α , zato smo ničelno hipotezo zavrgli in sprejeli alternativno, in sicer, da analizni metodi v določenem diagnostičnem območju ne dajeta primerljivih vrednosti. Določili smo tudi 95% interval zaupanja, in sicer od 0,0666 do 0,1742. Rezultati smo predstavili tudi grafično, na Sliki 24.

A



B

Slika 24: Grafična prikaza primerjanih vrednosti meritev protiteles proti *T.pallidum* v istih vzorcih (N = 52).

Legenda: Na grafu A so v obliki poudarjenih črt prikazane tudi srednje vrednosti in standardne napake, pri čemer sta spodnja dela standardnih napak v obeh skupinah meritev izven uporabljene skale, zato nista prikazana. Logaritemsko skalo na ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti. Oznaka **** pomeni, da se povprečni vrednosti meritev, ki smo ju testirali z dvostranskim neparnim t-testom med seboj močno statistično značilno razlikujeta ($p < 0,0001$).

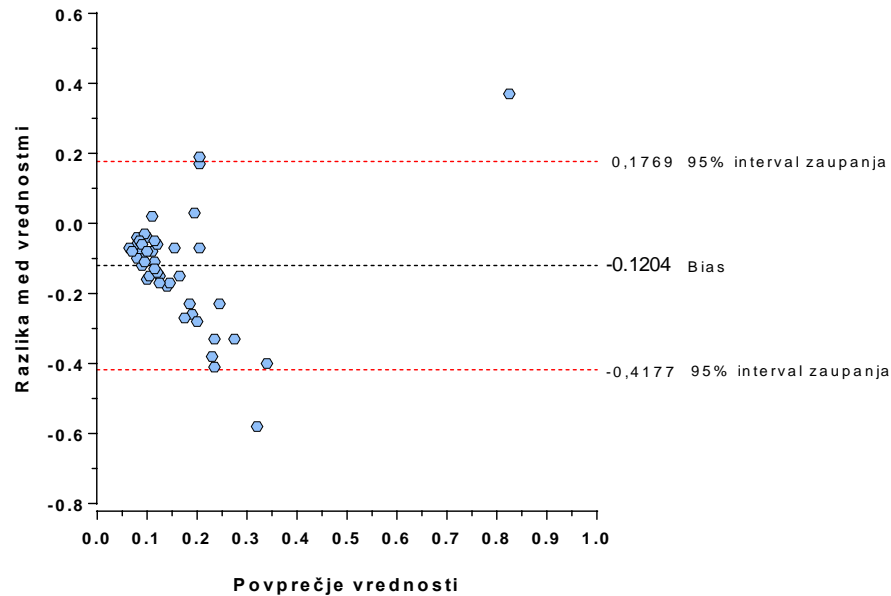
Na Sliki 24A vidimo, da so rezultati pri analiznem sistemu Siemens bolj homogeno razporejeni kot pri Abbott-u, vendar je v zgornjem delu pri Siemensu sipanje večje. Na Sliki 24B pa vidimo, da se vrednosti posameznega vzorca enega analiznega sistema niso bistveno razlikovale od vrednosti drugega.

Rezultate, dobljene z obema analiznima sistemoma smo primerjalno vrednotili tudi z Bland-Altmanovim testom (Preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Rezultati Bland-Altmanovega testa pri TP; SD=standardni odklon.

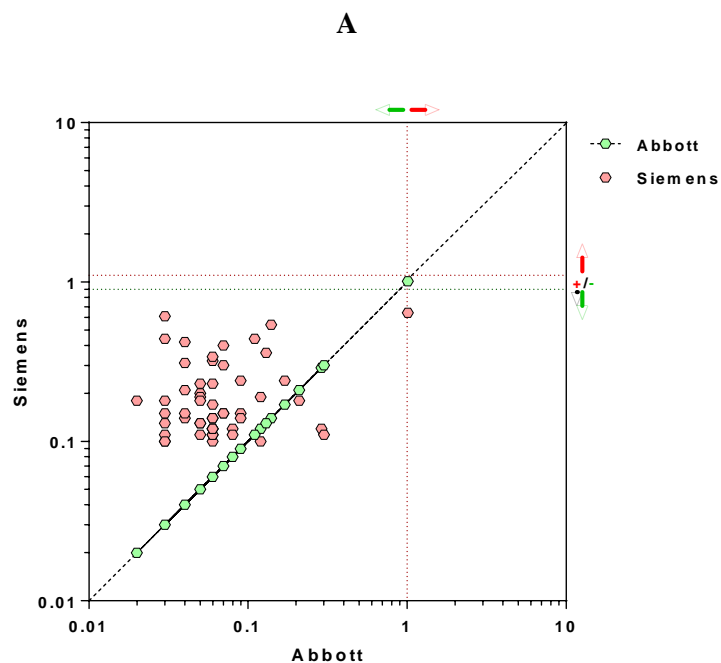
Povprečna vrednost odstopanja (bias)	-0,1204
SD biasa	0,1517
95% interval ujemanja	-0,4177 do 0,1769

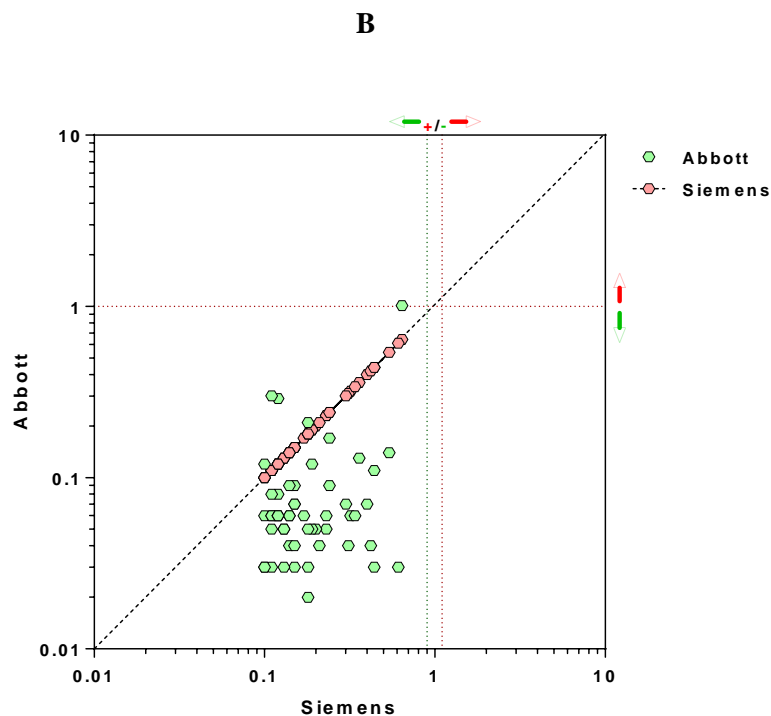
Vrednost odstopanja oziroma biasa je 0,1204, kar pomeni, da smo z obema analiznim sistemom dobili primerljive vrednosti meritev, pri čemer je bila večina točk na grafu znotraj 95% meja zaupanja (Slika 25). Razlike med vrednostmi pa so bile najbolj strnjene pri nižjih povprečnih vrednostih meritev.



Slika 25: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje primerjavo med razlikami in povprečnimi vrednostmi meritev istih vzorcev ($N = 52$) za anti-TP, opravljenih z obema analiznima sistemoma.

Slika 26 predstavlja grafično porazdelitev meritev vzorcev, izmerjenih z enim analiznim sistemom, glede na meritve istih vzorcev, opravljene z drugim.

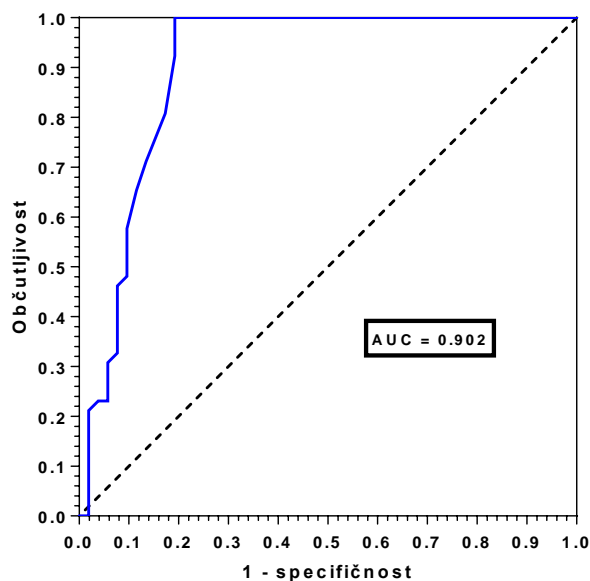




Slika 26: Grafični prikaz porazdelitev vrednosti istih vzorcev ($N = 52$), izmerjenih s primerjanima analiznima sistemoma: A – Siemens glede na Abbott, B – Abbott glede na Siemens za anti-TP. Legenda: Pokončna zelena prekinjena črta in zelena puščica nakazujeta mejo in področje negativnih vrednosti, pokončna rdeča prekinjena črta in rdeča puščica pa mejo in področje pozitivnih vrednosti. Oznaka +/- označuje sivo področje med obema omenjenima mejama, ki ga moramo upoštevati pri rezultatih meritev, opravljenih z analiznim sistemom Siemens. Logaritemski skali na abscisi in ordinati smo uporabili za boljši prikaz razporejenosti izmerjenih vrednosti.

Na obeh grafih vidimo, da so vrednosti meritev bolj ali manj oddaljene od linearne linije rezultatov analiznega sistema, ki so služili kot standard, kar je med drugim tudi posledica tega, da imata primerjana analiza sistema za ta označevalec nekoliko drugače postavljene diagnostično pomembne vrednosti.

Slika 27 prikazuje potek krivulje ROC in vrednost površine pod njo.



Slika 27: Krivulja ROC in vrednost površine pod krivuljo (AUC), določena s primerjavo vrednosti meritev istih vzorcev ($N = 52$), opravljenih z analiznim sistemom Siemens, glede na analizni sistem Abbott za anti-TP.

Vrednost AUC, je bila 0,9024, kar kaže na izvrsten test z dobro diagnostično zanesljivostjo in uporabnostjo.

5 RAZPRAVA

Že s primerjavo rezultatov testiranja posebnih skupin vzorcev, natančneje vzorcev MMD in bolnikov na dializi, smo ugotovili, da sta analizna sistema dokaj primerljiva v občutljivosti, saj sta oba zaznala le 1 HBV-pozitiven vzorec v skupini MMD, ki je bil tudi po potrditvenem testiranju reaktiven. Vse ostale vzorce pa sta opredelila kot negativne. Do razlik v rezultatih je prišlo pri testiranju vzorcev OČKL, in sicer pri določanju Ag/Pt HIV, kjer smo s sistemom Abbott 8 vzorcev opredelili kot lažno reaktivne ter pri določanju protiteles anti-TP, kjer smo z obema analiznima sistemoma zaznali nekaj reaktivnih, ki pa so bili v potrditvenem testiranju negativni. Menimo, da lahko različno (pato)fiziološko stanje bolnikov ter posledično različna sestava vzorcev krvi pomembno vplivata na rezultate testiranja s posameznim analiznim sistemom, na kar nas opozarjajo tudi proizvajalci v spremni dokumentaciji reagentov. Glede na rezultate testiranja posebne skupine vzorcev, smo največje razlike opazili pri vzorcih krvi možnih darovalcev roženice, odvzetih po smrti (OČKL). Ob pregledu dokumentacije proizvajalcev, ki je priložena reagentom smo ugotovili, da so bili tisti, ki smo jih uporabljali v analiznem sistemu

Abbott, za razliko od reagentov za analizni sistem Siemens, validirani tudi na vzorcih mrtvih darovalcev, odvzetih do 15 oz. 21,5 ur po smrti, odvisno od označevalca okužbe.

Ker smo občutljivost primerjanih testov težko določali le v populaciji vzorcev rednih krvodajalcev, ki pa nas je vseeno zanimala, smo to pomembno lastnost poskušali določiti z analizo različnih skupin vzorcev (pozitivni klinični vzorci, vzorci z določenim genotipom HBV, serokonverzijski paneli, itd.). Pri testiranju vnaprej znanih pozitivnih vzorcev odstopanj v občutljivosti nismo zaznali, saj sta oba analizna sistema vse vzorce opredelila kot reaktivne. Tudi pri testiranju vzorcev, ki so spadali v skupino proti HBV nedavno cepljenih krvodajalcev in redčene vzorce z genotipom A in D HBV, kjer smo ugotavljali razliko v občutljivosti določanja HBsAg, nismo zaznali bistvenih odstopanj v občutljivosti med analiznima sistemoma.

Pri genotipu D HBV smo z obema analiznima sistemoma uspešno zaznali in potrdili prisotnost HBsAg. V vzorcih z genotipom A pa je bila vrednost HBsAg v zadnji redčitvi, v kateri smo jo z analiznim sistemom Siemens še opredelil kot reaktivno, zelo nizka. Da bi preverili zanesljivost rezultatov bi morali narediti več ponovitev testiranj istih redčitev in številnejših vzorcev genotipov, da bi ugotovili, če je Siemens za določen genotip HBV občutljivejši kot Abbott.

Med testiranimi vzorci krvodajalcev, ki so bili pred njihovimi odvzemi nedavno cepljeni proti HBV, smo z analiznim sistemom Siemens enega opredelili kot negativnega (odvzem vzorca 7. dan po cepljenju). Glede na to, da so v teh vzorcih prisotne zelo nizke koncentracije HBsAg, lahko ugotovimo, da je bil v tem primeru za Ag HBV, analizni sistem Abbott občutljivejši, kar bi bilo potrebno preveriti z dodatnim testiranjem večjega števila vzorcev in v večih ponovitvah.

Pri testiranju zunanjih kontrol MCA ni bilo velikih razlik med rezultati določenimi s primerjanimi analiznima sistemoma. Ugotovili smo le, da smo z ADVIA Centaur XP (Siemens) zaznali nekoliko nižje koncentracije Ag/Pt HIV ter protiteles proti *T.pallidum*. Pri testiranju obeh serokonverzijskih panelov nismo zaznali razlik, le pri določanju protiteles anti-HCV smo z analiznim sistemom Abbott v primerjavi z analiznim sistemom Siemens en vzorec prej v serokonverziji opredelili kot reaktivnega. S testiranjem dodatnih panelov serokonverzijskih vzorcev, v katerih so koncentracije določenih Ag oz. Pt zelo nizke, bi lahko dodatno primerjali občutljivosti analiznih sistemov. V tem primeru so

opažene razlike v rezultatih meritev posledica splošne občutljivosti posameznega testa, še posebej pa razlik v sposobnostih uporabljenih reagentov za zaznavanje zelo nizkih koncentracij analitov (Ag in/ali Pt).

Poudariti moramo, da je bil izmed vseh testiranih 2.001 vzorcev krvi krvodajalcev le 1 pozitiven na HBV. Da je ta vzorec pozitiven smo ugotovili šele po testiranju NAT, saj v njem z nobenim od primerjanih analiznih sistemov nismo določili HBsAg. Tovrstne okužbe imenujemo prikriti hepatitis B (ang. occult hepatitis B infection – OBI) in jih lahko zaznamo le z molekulskimi tehnikami, saj je pri njih serološko presejalno testiranje na HBsAg nereaktivno. Glede specifičnosti je pomembno, da analizna metoda razlikuje med ciljnim in ostalimi analiti. Opazili smo, da smo z analiznim sistemom Siemens pri določanju HBsAg in anti-HCV več vzorcev opredelili kot začetno reaktivne, nato pa s ponovljenim testiranjem v duplikatu ugotovili, da so negativni, medtem ko jih je analizni sistem Abbott že pri prvem testiranju označil kot negativne. Nasprotno pa se je pri ponovljivo reaktivnih vzorcih za HBsAg in anti-HCV, ki so bili s presejalnim testom trikrat določeni kot reaktivni, a so bili v potrditvenem testiranju negativni, analizni sistem Abbott izkazal za slabšega kot Siemens. Za presejalne teste si v prvi vrsti želimo, da so čim bolj občutljivi, pri medsebojni primerjavi dveh testov pa seveda ne smemo zanemariti specifičnosti, ki je prav tako pomembna. S testiranjem populacije vzorcev rednih krvodajalcev smo torej lahko določili le specifičnost primerjanih analiznih sistemov, občutljivost pa na ta način težko določimo, saj so bili vsi vzorci na določane označevalce okužb negativni. Specifičnost primerjanih analiznih sistemov pri določanju vseh štirih označevalcev okužb je bila višja od 99,5%. Tudi s primerjavo naših rezultatov določanja specifičnosti z rezultati validacij, ki jih podajajo proizvajalci reagentov smo ugotovili, da so si le-ti dokaj podobni. Schmidt in sodelavci so neposredno primerjali specifičnosti reagentov in občutljivosti analiznih sistemov Elecsys Roche in Abbott PRISM/Architect za določanje označevalcev okužb s HBV, HCV in HIV (43). Testirali so približno 6.000 vzorcev krvi krvodajalcev, ki so na odvzem prišli prvič in 14.000 vzorcev krvi tistih, ki so kri darovali že večkrat. Vzorce so zbrali in testirali v krvodajalskih centrih v Avstriji, Nemčiji, Španiji in na Tajskem. Med vsemi testiranimi vzorci jih je bilo 93 potrjeno reaktivnih z obema analiznima sistemoma. Specifičnost obeh analiznih sistemov je bila >99,5% in je bila primerljiva med obema prej omenjenima skupinama testiranih vzorcev. Primerjavo so izvedli še z Bland-Altmanovim testom in ugotovili, da sta si sistema po

kakovosti enakovredna, poleg tega pa tudi, da sistem Elecsys Roche ustreza strogim kriterijem, ki so potrebni za izvajanje serološkega testiranja (43). Tudi Sommese in sodelavci so zastavili in izvedli podobno študijo kot mi, le da so za statistično analizo rezultatov uporabili tudi Cohenov koeficient kapa, s katerim lahko izračunamo ujemanja med dvema spremenljivkama. Primerjali so analizna sistema Cobas e411 Roche in Architect i200SR Abbott ter ugotovili, da sta v veliki meri primerljiva in ustrezna za izvajanje serološkega presejalnega testiranja krvodajalcev, pri čemer pa je bil analizni sistem Roche malo manj občutljiv za določanje označevalcev okužbe s HCV (44).

Za primerjalno statistično analizo smo lahko uporabili le rezultate brez predznakov »<<«. Med rezultati, ki smo jih iz statistične analize izključili je bilo pri vsakem določenem analitu tudi nekaj takih izključenih parov, ki pri analiznem sistemu Abbott niso imeli zelo nizkih rezultatov. Ti so bili pod mejo, ki opredeljuje vzorec kot reaktiven, razen v primeru določanja anti-HCV, kjer sta bila 2 vzorca reaktivna, a s potrditvenimi testi reaktivnosti nismo dokazali. Vzorec sipanja rezultatov med izključenimi in vključenimi v statistično analizo je bil primerljiv. Pri vseh analitih je bila največja izključitvena vrednost na analiznem sistemu Abbott, in sicer za HBsAg 0,58, pri anti-HCV sta bila 2 rezultata reaktivna, Ag/Pt HIV 0,87 in pri anti-TP 0,85.

Z izrisi krivulj ROC in določitvami površin pod njimi smo v vseh primerih ugotovili, da sta analizna sistema zelo primerna za presejalno testiranje vseh štirih označevalcev okužb. Ostala statistična testa, torej t-test in Bland-Altmanov test pa sta pokazala večje razlike med analiznima sistemoma. Izjema so bili le rezultati določanja HBsAg, kjer nismo dokazali statistično pomembne razlike med testoma. Zavedati se moramo, da so rezultati statističnih analiz zgolj informativni, saj smo analizirali po večini le manjši del vseh rezultatov in to vzorcev, ki so bili za določane označevalce okužb negativni.

S primerjanjem porazdelitev izmerjenih vrednosti za posamezen analit smo ugotovili, da je bila večina meritev znotraj področja negativnih rezultatov. Pri tem so bile vrednosti, izmerjene z analiznim sistemom Siemens, v primerjavi s tistimi, določenimi s sistemom Abbott, v povprečju različne (Slike: 8, 13, 18 in 23):

- HBsAg: $\bar{x}_{\text{Abbott}}=0,1751$; $\bar{x}_{\text{Siemens}}=0,1616$
- Pt anti-HCV: $\bar{x}_{\text{Abbott}}=0,1045$; $\bar{x}_{\text{Siemens}}=0,0717$
- Pt/Ag HIV: $\bar{x}_{\text{Abbott}}=0,1577$; $\bar{x}_{\text{Siemens}}=0,0961$

- Pt anti-TP: $\bar{x}_{\text{Abbott}}=0,0931$; $\bar{x}_{\text{Siemens}}=0,2135$

Poleg vseh podobnosti in razlik, ki smo jih odkrili z obdelavo rezultatov, pa smo lahko na novo vpeljani analizni sistem Siemens ADVIA Cenatur XP primerjali z uveljavljenim, obstoječim, rutinsko uporabljenim Abbott Architect tudi glede na način rokovanja z analiznim sistemom, hitrost procesiranja vzorcev in računalniški sistem. Ugotovili smo, da je uporaba obeh analiznih sistemov enostavna, prednost novega analiznega sistema Siemens pa je v tem, da lahko medtem ko analizni sistem analizira vzorce, uporabnik dodaja nove pomožne reagente in vodo ali odstranjuje odpad. Primerjani sistem Abbott določenih posegov med izvajanjem analiz ne dopušča.

6 SKLEP

Na podlagi izkušenj in rezultatov, ki smo jih pridobili tekom vpeljave novega analiznega sistema ADVIA Centaur XP (Siemens) za serološko presejalno testiranje krvodajalcev na označevalce okužb s HBV, HCV, HIV in bakterijo *T.pallidum*, smo prišli do naslednjih sklepov:

- rokovanje z vpeljanim novim analiznim sistemom Siemens je enostavno, v primerjavi z obstoječim (Abbott) ima nekaj prednosti in slabosti;
- pri določanju diagnostične specifičnosti smo ugotovili minimalne razlike, pri čemer pa sta bili specifičnosti obeh analiznih sistemov pri vseh štirih označevalcih okužb višji od 99,5%;
- primerjana sistema sta ustrezno občutljiva, z dodatnimi testiranjema pa bi lahko natančneje preučili minimalne razlike, ki smo jih zaznali v njuni občutljivosti za določanje HBsAg in protiteles anti-TP;
- gledano v celoti statistično ugotovljene povezave med obema testoma niso bile izrazite pri tem pa smo pričakovano ugotovili, da je bilo sipanje rezultatov večje pri visokih in nizkih vrednostih.

Potrdimo torej lahko našo začetno hipotezo, da sta analiza sistema primerljiva in zato primerna za presejalno testiranje. Poleg statističnih analiz, podrobnih primerjav in validacij, ki nam zagotavljajo podatke o tem ali je posamezna metoda primerna za določen namen, je za novo vpeljano metodo oz. analizni sistem pomembno tudi to, da osebje, ki bo izvajalo testiranja z novim analiznim sistemom, ustrezno izobrazimo in usposobimo ter tako zagotovimo zanesljive in kakovostne rezultate meritev preiskovanih vzorcev.

7 LITERATURA

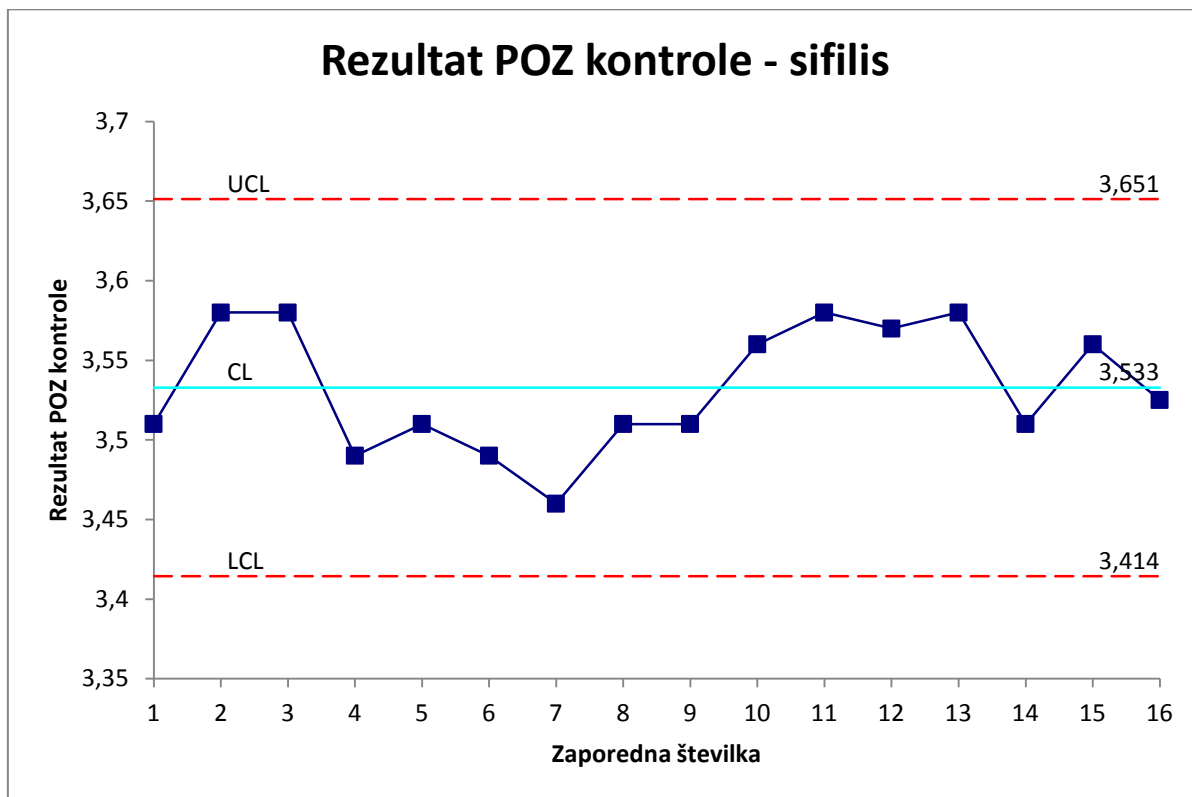
1. Levičnik-Stežinar S, Rahne-Potokar U: Presejanje krvodajalcev na označevalce okužb v Sloveniji v obdobju 1991-2010. Zdravniški vestnik, letnik 81, 2012; II-257-II-265.
2. Priporočilo o pripravi, uporabi in zagotavljanju kakovosti komponent krvi, 2002, Svet Evrope v Strasburgu, 8. izdaja. Zavod RS za transfuzijo krvi in Informacijsko dokumentacijski center Sveta Evrope pri Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani.
3. *Zakon o preskrbi s krvjo*. Uradni list Republike Slovenije št. 104/2006.
4. Sunbul M: Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* 2014; 5427–5434. Doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5427
5. Petrovec, M, Poljak M: *Medicinska virologija, Medicinski razgledi*, Ljubljana, 2011: 84, 98, 99, 105, 221, 240.
6. Tomažič J, Strle F: *Infekcijske bolezni, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo*, Ljubljana, 2014/2015: 360, 362, 368, 456-457.
7. Gubina M, Ihan A, *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi*, Ljubljana, 2002: 285-289.
8. Koren S: *Splošna medicinska virologija, Medicinski razgledi*, Ljubljana, 1998: 119, 126, 127, 137, 140, 142.
9. Chen W, Wu J, Zong C, Xu J, Xian H: *Chemiluminescent Immunoassay and Its Applications*. *Chinese journal of analytical chemistry* 2012; 3-10. Dostopno na www.sciencedirect.com.
10. Flanagan R, Taylor A, Watson ID, Whelpton R: *Fundamentals of analytical toxicology*, John Wiley and Sons Ltd, ZDA, 2008: 327.
11. Bustis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, 5th edition. Elsevier Saunders, St.Louis, ZDA, 2012: 379-395.
12. Ostanek B, Černe D: *Biomedicinska analitika I, učbenik za študente laboratorijske biomedicine*, Ljubljana, 2012.
13. Levičnik-Stežinar S, Nograšek P: Izplen presejalnega testiranja krvodajalcev s tehniko NAT v Sloveniji, *Zdravniški vestnik*, letnik 81, 2012; II-266-II-273.
14. Bland JM, Altman DG: *Measuring agreement in method comparison studies*, *Statistical Methods in medical Research*, 1999; 135-160. Doi: 10.1177/096228029900800204
15. Krsnik M: *Statistična primerjava dveh metod ob uvajanju novega testa*, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, zbornik, Ljubljana, 2010.

16. ICH Harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2. Dostopano na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf, julij 2015
17. McCallum K: Annual Validation and Verification of analytical methods, 2014: dostopano na: http://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Regulatory/Committees/Lab-Methods-and-Services/Presentations/2014_Annual-Validation_and_Verification_of_Analytical_Methods-Kristi%20McCallum.pdf, april, 2017.
18. Kotnik V: Imunološki priročnik, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 122-127.
19. <https://labtestsonline.org/notes/screening-test>, dostopano september 2015.
20. Levičnik-Stežinar S: Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije v letu 2015, Slovensko zdravniško društvo, Ljubljana, 2015.
21. Spremna dokumentacija MCA, 2015.
22. Fratnik Steyer A, Ozmeč M, Starič K, Rahne Potokar U, Levičnik Stežinar S: Določanje štirih označevalcev okužb pri krvodajalcih s Siemens ADVIA Centaur XP – primerjava dveh avtomatiziranih presejalnih sistemov, Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije, Slovensko zdravniško društvo, Ljubljana, 2015.
23. Priložena navodila proizvajalcev: Siemens ADVIA Centaur XP HBsAgII, 2013.
24. Priložena navodila proizvajalcev: Siemens ADVIA Centaur XP HCV, 2013.
25. Priložena navodila proizvajalcev: Siemens ADVIA Centaur XP HIV Ag/Ab Combo, 2013.
26. Priložena navodila proizvajalcev: Siemens ADVIA Centaur XP Syphilis, 2013.
27. Priložena navodila proizvajalcev: QConnect Blue, 2014.
28. <http://www.cclabs.in/cms.php?bid=19>, dostopano: november 2016.
29. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Operators Guide, 2011.
30. Priložena navodila proizvajalcev: Siemens ADVIA Centaur XP HBsAg Confirmatory, 2013.
31. Priložena navodila proizvajalcev: Architect system HBsAg Qualitative II, 2013.

32. Priložena navodila proizvajalcev: Architect system Anti-HCV, 2013.
33. Priložena navodila proizvajalcev: Architect system HIV Ag/Ab Combo, 2013.
34. Priložena navodila proizvajalcev: Architect system Syphilis TP, 2013.
35. <https://www.abbottdiagnostics.com/en-us/products/ARCHITECT-i2000SR.html>, dostopano: avgust 2015
36. <http://www.illexmedical.com/products.php?id=17>, dostopano: november 2016
37. ARCHITECT System Operations Manual (201837-110)
38. <https://www.westgard.com/lesson12.html>, dostopano: september 2016
39. https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_interpreting_results_contingen_2.htm, dostopano: april 2017
40. <http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/>, dostopano: september 2016
41. <https://www.medcalc.org/manual/roc-curves.php>, dostopano: oktober 2016
42. <http://www.cpdm.ufpr.br/documentos/ROC.pdf>, dostopano: november 2016
43. Schmidt M, Jimenez A, Mühlbacher A, Oota S, Blanco L, Sakuldamrongpanich T, Schennach H, Seifried E: Head-to-head comparison between two screening systems for HBsAG, anti-HBc, anti-HCV and HIV combination immunoassays in an international, multicentre evaluation study, *Vox Sang*, 2015; 109: 114–121. Doi:10.1111/vox.12259
44. Sommese L, Sabia C, Paolillo R, Parente D, Capuano M, Iannone C, Cavalca F, Schiano C, Vasco M, Rosaria De Pascale M, Casamassimi A, Napoli C: Screening tests for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus in blood donors: Evaluation of two chemiluminescent immunoassay systems, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2014, Volume 46; 660-664. Doi: 10.3109/00365548.2014.926564

8 PRILOGE

Priloga 1: Primer grafa Levey-Jennings za kontrolo pri določanju *T. pallidum*; analizni sistem Advia Centaur XP (Siemens).



Legenda: UCL=zgornja kontrolna meja (upper control limit), CL=kontrolna meja, LCL=spodnja kontrolna meja (lower control limit).