



Uticaj dužine i temperature čuvanja kontrolnog seruma na stabilnost biohemijskih parametara

Danijela Fajin^a, Ivana Davidov^a, Zoran Ružić^a, Mira Majkić^a, Marko Cincović^a

^aUniverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Srbija

*Autor za kontakt: mcincovic@gmail.com

SAŽETAK

Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj temperature prilikom skladištenja uzoraka na vrednosti biohemijskih parametara. Za potrebu ovog rada je korišćen je goveđi kontrolni serum koji je čuvana na temperaturi od +4°C i +20°C tokom 6 dana. Praćena je stabilnost parametara funkcije jetre, bubrega, energetskog i metaboličkog statusa. Vršena je analiza koncentracije ALB, TPROT, UREA, NEFA, GLU, BHB, CHOL, TGC, TBIL, AST, Ca i P, uz procenu maksimalno dozvoljene nestabilnosti (MPI) za svaki parametar. Uočeno je da parametri imaju različit stepen stabilnosti prilikom skladištenja na različitim temperaturama. Zabeleženo je da je čuvanje na +4°C značajno povećalo stabilnost većine ispitivanih analita. Analiti među kojima su ALB, TPROT i UREA su pokazali bolju stabilnost na nižoj temperaturi, za razliku od BHB, CHOL i AST koji su pokazali odstupanja već nakon 2-3 dana čuvanja na +20°C. Promene u vrednosti metabolita su bile mnogo značajnije kada se uzorak čuva na +20°C (temperatura spoljnjeg sredine) u odnosu na temperaturu +4°C (temperatura frižidera) za parametre ALB, UREA, GLU, NEFA, CHOL i TGC. Posmatrajući poslednji, šesti dan ogleda vrednosti metabolita prilikom čuvanja na sobnoj temperaturi u odnosu na temperaturu frižidera u odnosu na prvi dan bila je: ALB 84,5:98,3%; TPROT 98,6:99,1; UREA 119,3:88,5; GLU 72,6:82,6; NEFA 132,5:115,1; BHB 108,7:104,6; CHOL 88,3:97,9; TGC 80,1:98,1; TBIL 89,6:90,2; AST 82,3:89,4; Ca 100,2:99,5; P 105,9:104,7. U ovom istraživanju potvrđen je značaj uticaja temperature na biohemijske analite tokom skladištenja uzoraka te ukazuje na potrebu kontrole temperature sredine u kojoj se čuvaju uzorci.

Ključne reči:

biohemijski parametri, serum, termostabilnost.

Uvod

Stabilnost uzoraka zavisi od očuvanosti njihovih fizičko-hemijskih osobina, na koje mogu uticati način rukovanja, uslovi transporta, naročito temperatura kao i kasnije čuvanje. Najkasnije dva sata nakon uzimanja krvi, potrebno je centrifugiranjem odvojiti serum ili plazmu od eritrocita, pri čemu je važno da se prethodno formiraju stabilni krvni ugrušci, što zavisi od vrste epruveta koje se koriste (Flores et al., 2020; Nordin et al., 2024). Na sobnoj temperaturi odvojeni uzorci ostaju postojani oko osam sati, dok se na 2-4 °C mogu čuvati do 48 časova. Po isteku tog perioda serum je potrebno zamrznuti na -20 °C (Zhou i sar., 2024).

Testovi stabilnosti izvođeni su kod različitih životinjskih vrsta i ljudi (Taylor et al., 2011; Oddo et al., 2012). Rosato i saradnici (2009) ispitivali su stabilnost biohemijskih parametara seruma pasa pri različitim temperaturama (25, 4, -4, -20, -70 °C) i vremenima čuvanja (12 h-90 d). Pratili su elektrolite, proteine, lipide, kreatinin, ureu i enzime. Metaboliti i minerali ostali su stabilni na -4 i -20 °C do 60, odnosno 30 dana. GGT i AST rano se menjaju na -70 °C; kreatin kinaza posle 60 d na -4 °C, GGT posle 30 d na -20 °C. Na temperaturama od -4 i -20 °C najbolje se čuvaju uzorci. Serum se često zamrzava i odlaže kako bi se kasnije mogao analizirati. Cray i saradnici (2009) sprovode istraživanje radi procene stabilnosti 17 analita u serumu pacova na temperaturi frižidera od 4°C i na temperaturi mržnjenja od -20°C i -70°C. Serum su bili analizirani nultog dana, a zatim 7., 30., 90., i 360. dana. Samo aktivnost kreatin kinaze je varirala za više od 10% nakon 7 dana odlaganja u frižideru. Promene u koncentraciji CO₂ su primećene 30. dana, a u aktivnosti alanil transferaze 90. dana, pri temperaturi zamrzavanja od -70°C. Uzorci seruma čuvanih u zamrzivačima sa i bez stvaranja leda na temperaturi od -20°C nisu pokazali značajne razlike do 90. dana skladištenja.

Prema Evropskoj federaciji kliničke hemije (EFLM), formirana je radna grupa za "Preanalitičku fazu" (WG-PRE), osnovana 2013. godine koja radi na unapređenju harmonizacije preanalitičke faze pisanjem uputstava i preporuka i edukacijom u zemljama članicama Evropske unije i drugim članovima udruženja (Nordin et al., 2024). Preporuke su neophodne i u veterinarskoj medicini jer su laboratorijski parametri veoma značajni u praksi i istraživačkom radu (Cincović i sar., 2023; Majkić i

sar., 2023; Krnjaić i sar., 2024). Cilj ovog rada je da se ispita stabilnost metabolita iz kontrolnih seruma čuvanih u temperaturnom režimu ambijentalne temperature i frižidera tokom šest dana.

Materijal i metode

U ovom istraživanju korišćeno je 30 uzoraka kontrolnog seruma, koji je prethodno pripremljen za potrebe oglada. Ovi uzorci su dobijeni mešanjem kontrolnih seruma sa najvišim i najnižim vrednostima u različitim procentualnim odnosima. Na taj način formirani su uzorci različitih koncentracija, koji sa aspekta matriksa i koncentracije koja je dobijena verno oponašaju najčešće vrednosti u realnim kliničkim uzorcima.

Metabolički parametri su određivani u svakoj nedelji uzorkovanja krvi. Korišćene su fotometrijske reakcije i fotometar proizvođača Rayto (Chemray120). Fotometriranje je vršeno na talasnoj dužini i u vremenskom intervalu prema specifikaciji proizvođača. Pre upotrebe svakog novog kita formirana je kalibraciona kriva, prema specifikaciji proizvođača. Korišćeni su standardni kitovi proizvođača Biosystem (Španija), Randox (UK) i/ili Pointe scientific (SAD). Za procenu energetskog statusa krava vršeno je ispitivanje koncentracije NEFA, BHB i glukoze. Metabolizam proteina procenjen je kroz koncentraciju ukupnih proteina, albumina, uree i amonijaka. Hepatični profil podrazumeva određivanje holesterol, trigliceridi, ukupni bilirubin i AST. Profil jona je ispitivan merenjem koncentracije Ca i P.

Uzorci su ostavljani na sobnoj temperaturi (+20°C) i na temperaturi frižidera (+4°C) i testirani su jednom dnevno tokom 6 dana čuvanja uzorka. Gomez-Rioja i saradnici (2023) u svom protokolu precizno su definisali tehničke procedure za merenje stabilnosti. Gubitak stabilnosti se procenjuje poređenjem mernih vrednosti dva uzorka dobijena od istog pacijenta i analizirana u različitim vremenskim tačkama - bazalno vreme/uzorak i vreme ispitivanja/uzorak. Razlike su izražene procentualnom devijacijom (PD%). MPI je izračunat $MPI = 0,5 \times (CVa + CVi)$. $PD\% < MPI$ za sve ispitanike ukazuje na to da nije došlo do značajnog gubitka stabilnosti unutar proučenog vremena skladištenja. Analitička varijacija, biološka varijacija i RCV određeni su prema podacima Kovačević i saradnika (2021), koji potiču iz iste laboratorije kao i naši rezultati. Statistički softver SPSS (SAD) je korišćen za obradu i analizu rezultata.

Rezultati

Analiza stabilnosti uzoraka i odstupanje vrednosti tokom šest dana ispitivanja prikazani su u Tabeli 1. Parametri proteina su pokazali sledeće osobine stabilnosti. ALB je bio stabilan 6 dana na 4°C, odnosno 3 dana na 20°C. TPROT su bili stabilni u uzorku u ispitivanom periodu na oba temperaturna režima. UREA je bila stabilna 5 dana na 4°C, odnosno 2 dana na 20°C. Vrednost uree je sa vremenom rasla. Može se reći da su ovo prilično stabilni parametri u navedena dva temperaturna režima. Parametri energetskog bilansa su takvi da su glukoza i NEFA vrlo malo stabilni u uzorcima, pa se analiza mora završiti u roku od dva do tri dana, dok je vrednost BHB bila mnogo stabilnija u oba temperaturna režima. Stabilnost GLU i NEFA postojala je tokom jednog dana na 20°C i tokom dva dana na 4°C. Dok je vrednost glukoze opadala, vrednost NEFA je rasla. BHB je pokazala stabilnost tokom svih dana na 4°C i tokom 4 dana na 20°C, a postojao je blagi trend porasta tokom vremena. Kada se radi o profilu hepatocita, stabilnost parametara je bila različita. Vrednost svih parametara je opadala tokom vremena. CHOL je bio stabilan 6 dana na 4°C, a u uslovima čuvanja na 20°C bio je stabilan 3 dana. TGC je bio stabilan 6 dana na 4°C, a u uslovima čuvanja na 20°C bio je stabilan 4 dana. TBIL je bio stabilan u svim vremenima ispitivanja i oba temperaturna režima tokom 5 dana. AST je bio stabilan 4 dana na 4°C, ali svega 2 dana na 20°C. Ca je bio stabilan 6 dana na 4°C kao i na 20°C. Stabilnost P bila je nepromenjena tokom 5 dana na oba temperaturna režima.

Tabela 1.

Odstupanje vrednosti parametara tokom 6 dana ispitivanja u dva različita temperaturna režima i trenutak kada je odstupanje veće od dozvoljene vrednosti (DA znači povećanu nestabilnosti - odbaciti rezultat).

Table 1.

Deviation of parameter values over 6 days of testing under two different temperature conditions and the moment when the deviation exceeds the allowable value (DA indicates increased instability - discard the result).

Parametar		1 dan	2 dan	3 dan	4 dan	5 dan	6 dan
ALB (g/L)	+20°C PD%	100	100	98,1	90,5	87,1	84,5
	PD%>MPI	NE	NE	NE	DA	DA	DA
	+4°C PD%	100	100	100	99,1	98,1	98,3
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TPROT (g/L)	+20°C PD%	100	100	100	100	99,5	98,6
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	+4°C PD%	100	99	100	101,1	98,9	99,1
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
UREA (mmol/L)	+20°C PD%	100	102,6	105,5	107,4	114,5	119,3
	PD%>MPI	NE	NE	DA	DA	DA	DA
	+4°C PD%	100	98	98,2	97,4	90,0	88,5
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	DA	DA
GLU (mmol/L)	+20°C PD%	100	95,5	84,2	80,3	78,1	72,6
	PD%>MPI	NE	DA	DA	DA	DA	DA
	+4°C PD%	100	98,6	91,6	88,6	84,3	82,6
	PD%>MPI	NE	NE	DA	DA	DA	DA
NEFA (mmol/L)	+20°C PD%	100	109,5	119,9	123,3	129,1	132,5
	PD%>MPI	NE	DA	DA	DA	DA	DA
	+4°C PD%	100	102,2	109,1	111,4	115,2	115,1
	PD%>MPI	NE	NE	DA	DA	DA	DA
BHB (mmol/L)	+20°C PD%	100	102,2	104,5	104,1	109,9	108,7
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	DA	DA
	+4°C PD%	100	101,2	102,2	101,3	103,2	104,6
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CHOL (mmol/L)	+20°C PD%	100	100	97,5	92,2	90,1	88,3
	PD%>MPI	NE	NE	NE	DA	DA	DA
	+4°C PD%	100	99,5	99,3	98,5	99,1	97,9
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TGC (mmol/L)	+20°C PD%	100	101,4	99,5	99,1	79,9	80,1
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	DA	DA
	+4°C PD%	100	100	99,5	98,9	99,3	98,1
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TBIL (μmol/L)	+20°C PD%	100	99	98	96,9	95,8	89,6
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	DA
	+4°C PD%	100	98,2	99,5	99,3	98,6	90,2
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	DA
AST (IU/L)	+20°C PD%	100	96,5	90,1	88,6	84,5	82,3
	PD%>MPI	NE	NE	DA	DA	DA	DA
	+4°C PD%	100	98,1	98,1	97,6	90,2	89,4
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	DA	DA
Ca (mmol/L)	+20°C PD%	100	99,7	100,6	100	99,5	100,2
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	+4°C PD%	100	100	100	1000,5	99,5	99,5
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	NE
P (mmol/L)	+20°C PD%	100	100,5	101,3	100,3	101,2	105,9
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	DA
	+4°C PD%	100	100	100	101,1	101,2	104,7
	PD%>MPI	NE	NE	NE	NE	NE	DA

Diskusija

Varijabilnost dobijenih rezultata i njihova dijagnostička vrednost u velikoj meri su u skladu sa kategorizacijom koju opisuje Van Saun (2000). Klinički laboratorijski uzorci uzeti od krava poslužili su kao osnova za ispitivanje, ali ostaje potreba da se identični, standardizovani uzorci analiziraju pod različitim uslovima sredine radi preciznije procene. Vrednosti metabolita, njihova dinamika i obim promena uglavnom se poklapaju sa prethodnim radovima koji su proučavali stabilnost uzoraka u različitim populacijama ljudi i životinja (Jones 1985a, b; Donnelly et al., 1995; Tanner et al., 2008; Ehsani et al., 2008; Moe et al., 2018). Koncentracija NEFA je bila očuvana pri 4 °C u toku brzog transporta u laboratoriju, ali se stabilnost značajno smanjivala već nakon 12-24 h kod produženog transporta i u prisustvu preanalitičkih faktora. Pri -20 °C, NEFA je ostao stabilan tokom celog perioda ispitivanja. Stokol i Njadam (2005) su utvrdili da NEFA ostaje stabilan 72 h na 4 °C u odvojenoj plazmi ili serumu, a da je na -20 °C stabilnost još izraženija, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. BHB je u svim uslovima i vremenskim tačkama zadržao stabilnost, što potvrđuju i raniji autori. Kod ovaca i ljudi NEFA pokazuje porast koncentracije tokom vremena na +4 °C (Menéndez et al., 2001; Morris et al., 2002). Kalcijum (Ca) je ostao stabilan bez obzira na preanalitičke faktore, način čuvanja i vreme uzorkovanja, što je potvrdio i Bach i saradnici (2021). Ipak, degradacija uzoraka tokom vremena dovodi do opadanja pojedinih analita. Klinički značaj određenog procenta uzoraka utvrđen je za AST, NEFA, BHB, TBIL i Ca, pri čemu je u prethodnom testu stabilnosti već bio istaknut značaj TBIL (Flores i sar., 2020).

Kughapriya i Elanchezhian (2019) uporedili su uzorke čuvane na sobnoj temperaturi 2 i 4 h i uočili značajne promene glukoze, uree, kreatinina, albumina, ukupnog bilirubina i ukupnih proteina, dok holesterol i trigliceridi nisu značajno varirali. U našem ogledu pokazan je pad glukoze već posle jednog dana na +20 °C, odnosno dva dana na +4 °C, što se slaže sa rezultatima Kughapriya i Elanchezhian (2019). Urea je rasla tokom skladištenja, posebno na sobnoj temperaturi, takođe u skladu sa njihovim zapažanjima. Albumin je kod nas bio stabilan 6 dana na +4 °C i 3 dana na +20 °C, što se razlikuje od njihovih podataka o promenama već posle 4 h. Ukupni proteini ostali su stabilni u našem ogledu, dok su pomenuti autori našli blage promene; slično, za bilirubin naši nalazi ne beleže značajne promene, dok oni izveštavaju o padu posle 4 h. Holesterol i trigliceridi u oba rada pokazuju stabilnost.

Mujamdar i Guha Thakurta (2019) su ispitivali tri temperature (18-22 °C, 4-8 °C i 37 °C) i zaključili da su urea, kreatinin i natrijum stabilni 24 h, dok glukoza u plazmi i kalijum pokazuju značajne varijacije već posle 12 h, naročito na višim temperaturama. Naše merenja potvrđuju trend opadanja glukoze, posebno posle 1 dana na +20 °C i 2 dana na +4 °C. Urea je bila stabilna 5 dana na +4 °C i 2 dana na sobnoj temperaturi, uz porast koncentracije, što je delimično u skladu sa njihovim zaključkom o 24-časovnoj stabilnosti.

Van Balveren i saradnici (2016) ističu da glukoza i bikarbonati u litijum-heparin uzorcima premašuju dozvoljene greške bez obzira na temperaturu, pri čemu je glukoza stabilna do 4 h na +4 °C, dok natrijum-fluorid kao antikoagulans produžava stabilnost, ali već za 6 h na +20 °C vrednosti izlaze iz granica. Natrijum, kalijum, kalcijum i LD prelaze limite već pri čuvanju na +4 °C i +8 °C. I mi smo registrovali pad glukoze pri čuvanju na višim temperaturama, što potvrđuje njihove nalaze. Kod nas su kalcijum i fosfor ostali stabilni, dok su oni za fosfor našli prekoračenje posle 8 h na višim temperaturama.

Prema Pandey i saradnicima (2023), fosfor varira pri 2-8 °C i 37 °C zbog hidrolize fosfatnih estara, kreatinin je stabilan na nižim temperaturama, ali ne i na 37 °C, dok urea gubi stabilnost na +37 °C; nestabilnost je uočena i za mokraćnu kiselinu, ukupne proteine i AP, a AST je izrazito nestabilan. Naši podaci pokazuju stabilan fosfor tokom 5 dana na obe temperature i AST stabilan 4 dana na +4 °C i 2 dana na +20 °C, što se delimično razlikuje od rezultata koje su našli Pandey i saradnici (2023). I u našem i u navedenom istraživanju urea pri višim temperaturama gubi stabilnost.

Rendle et al., (2009) kod konja su zabeležili konstantan pad glukoze i porast LDH i magnezijuma, dok su AST i urea rasli tokom 72 h, a bilirubin opadao prva 24 h. Mi smo takođe našli pad glukoze i postepen porast uree. Sa druge strane postojale su i određene razlike u našem ogledu pa je tako AST ostao stabilan 4 dana na +4 °C i 2 dana na +20 °C, što delimično odudara.

Roy i saradnici (2017) su na 2-8 °C za 24 h našli značajne promene glukoze, uree, kreatinina, LDH, ALT i AST, dok su hloridi, kalcijum, kalijum, natrijum, bilirubin, albumin, ukupni proteini, GGT i ALP bili stabilni. Naši rezultati potvrđuju pad glukoze i stabilnost albumina, ukupnih proteina i kalcijuma, ali se razlikuju po stabilnosti AST i uree.

Marjani (2008) je pokazao da vreme i temperatura ne utiču na ureu, mokraćnu kiselinu, kalcijum, ukupni protein, albumin, trigliceride i holesterol, dok glukoza opada posle 48 h na 4 °C i 24 h na 23 °C, a kreatinin i fosfor rastu. Mi smo zabeležili sličan pad glukoze i stabilnost većine parametara, ali bez porasta fosfora.

Agina i saradnici (2007) utvrdili su da su natrijum i glukoza stabilni 72 h na 4 °C. U rezultatima ovog oglada utvrđena je bolja stabilnost glukoze na 4 °C nego na 20 °C, ali samo do 2 dana, što je delimično saglasno sa Agina i saradnicima (2007). Kada se radi o kalcijumu rezultati ovog oglada gde je utvrđena stabilnost tokom 6 dana se razlikuju od rezultata Agina i saradnika (2007) gde je stabilnost nađena samo u prvom danu ispitivanja.

Pahwa et al. (2021), našli su da su mokraćna kiselina, urea, trigliceridi i HDL stabilni 7 dana, ALP 15, a AST čak 30 dana na 0 i 4 °C; većina analita osim kalcijuma varirala je posle 3 dana na sobnoj temperaturi, a glukoza, fosfor i kreatinin treba odrediti u roku od 24-48 h. Rezultati dobijeni u ovom ogledu o nestabilnosti glukoze i stabilnosti uree i kalcijuma u velikoj meri se poklapaju sa Pahwa et al. (2021), iako je za AST nađena kraća stabilnost.

Eshar et al. (2018), kod kornjača su primetili porast AST, mokraćne kiseline, ukupnih proteina i kalijuma na 4 °C i -20 °C nakon 48 h, pri čemu su promene uglavnom bile u dozvoljenim granicama, osim za kalcijum i kalijum na -20 °C. Za AST je utvrđena stabilnost tokom 4 dana na 4 °C i 2 dana na 20 °C, što delimično odudara od nalaza Eshar et al. (2018), dok su ukupni proteini stabilni u oba istraživanja. Kalcijum je u ovom ogledu stabilan na svim ispitivanim temperaturama.

Moe et al. (2018), su utvrdili da vreme skladištenja snižava kalcijum, kreatinin i glukozu, a povećava albumin, GLDH, magnezijum, fosfor i ukupne proteine; temperatura utiče na većinu ovih parametara. Rezultati u ovom ogledu potvrđuju pad glukoze, ali kalcijum i fosfor pokazuju stabilnost, što se ne slaže sa Moe et al. (2018).

Zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju da kontrola temperature i dužina čuvanja predstavljaju ključni faktor za dobijanje validnih laboratorijskih rezultata, što se odnosi i na prečišćene kontrolne serume. Pravilnim rukovanjem i skladištenjem uzoraka doprinosi se smanjenju grešaka i unapređenju laboratorijske i dijagnostičke tačnosti.

Literatura

- Agina, O.A., Ikechukwu, P.J., Agina, B.C. 2017. Stability of some clinical biochemistry parameters in equine serum/plasma stored at refrigerator and room temperatures: A preliminary study. *Comparative Clinical Pathology* 26(3): 465-469.
- Bach, K.D., Neves, R.C., Stokol, T., McArt, J.A.A. 2020. Effect of storage time and temperature on total calcium concentrations in bovine blood. *Journal of Dairy Science* 103(2): 922-928.
- Cincović, M., Majkić, M., Spasojević J., Jožef, I., Mitrović J., Kovačević D., Kovačević, D. 2023. Stabilnost hematoloških parametara kod krava u uzorcima čuvanim pod različitim temperaturnim režimima. *Letopis naučnih radova / Annals of Agronomy* 47(1): 47-57.
- Cray, C., Rodriguez, M., Zaias, J., Altman, N.H. 2009. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 48(2): 202-204.
- Donnelly, J.G., Soldin, S.J., Nealon, D.A., Hicks, J.M. 1995. Stability of twenty-five analytes in human serum at 22 degrees C, 4 degrees C, and -20 degrees C. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine* 15(6): 869-874.
- Ehsani, A., Afshari, A., Bahadori, H., Mohri, M., Seifi, H.A. 2008. Serum constituents analyses in dairy cows: Effects of duration and temperature of the storage of clotted blood. *Research in Veterinary Science* 85(3): 473-475.
- Eshar, D., Avni-Magen, N., Kaufman, E., Beaufrère, H. 2017. Effects of time and storage temperature on selected biochemical analytes in plasma of red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *American Journal of Veterinary Research* 79(8): 852-857.
- Flores, C. F. Y., Pineda, Á. D. L. M. H., Bonilla, V. M. C., & Sáenz-Flor, K. 2020. Sample management: stability of plasma and serum on different storage conditions. *Ejifcc*, 31(1), 46.
- Flores, C.F.Y., Pineda, Á.D.L.M.H., Bonilla, V.M.C., Sáenz-Flor, K. 2020. Sample management: Stability of plasma and serum on different storage conditions. *EJIFCC* 31(1): 46-55.
- Gomez-Rioja, R., Von Meyer, A., Cornes, M., Costelloe, S., Vermeersch, P., Simundic, A. M., ... & Laboratory Medicine (EFLM) Working Group Preanalytical Phase (WG-PRE). 2023. Recommendation for the design of stability studies on clinical specimens. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 61(10): 1708-1718.
- Jones, D.G. 1985a. Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood. *Research in Veterinary Science*, 38(3): 301-306.
- Jones, D.G. 1985b. Stability and storage characteristics of enzymes in sheep blood. *Research in Veterinary Science* 38(3): 307-311.

- Kovačević, D., Cincović, M., Belić, B., Đoković, R., Majkić, M. 2021. Blood serum stability limit and maximum storage time of bovine samples. *Acta Scientiae Veterinariae*, 49.
- Krnjajić, S., Đoković, R., Majkić, M., Starić, J., Cincović, M. 2024. Uticaj frekvencije muže na povezanost mobilizacije lipida i pokazatelja funkcionalnog statusa jetre kod krava u laktaciji. *Letopis naučnih radova / Annals of Agronomy* 48(1): 1-8.
- Kughapriya, P., Elanchezhian, J.A. 2019. Stability of common biochemical analytes in serum when subjected to changes in storage conditions and temperature. *Indian Journal of Medical Biochemistry* 23(1): 178-181.
- Majkić, M., Cincović, M., Spasojević, J., Jožef, I., Blond, B., Kovačević, D. 2023. Kriva rezilijentnosti i kumulativni odgovor krava na toplotni stres. *Letopis naučnih radova / Annals of Agronomy* 47(1): 38-46.
- Marjani, A. 2008. Effect of storage time and temperature on serum analytes. *American Journal of Applied Sciences*, 5(8): 1047–1051.
- Menéndez, L.G., Fernández, A. L., Enguix, A., Ciriza, C., Amador, J. 2001. Effect of storage of plasma and serum on enzymatic determination of non-esterified fatty acids. *Annals of Clinical Biochemistry* 38(3): 252–255.
- Moe, M.O., Okstad, W., Berland, S., Framstad, T. 2018. Effects of storage duration and temperature conditions on biochemical analytes in porcine clotted, uncentrifuged blood samples. *Journal of Dairy & Veterinary Animal Research* 7(1): 00181.
- Morris, J.D., Fernandez, J.M., Chapa, A.M., Gentry, L.R., Thorn, K.E., Weick, T.M. 2002. Effects of sample handling, processing, storage and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. *Small Ruminant Research* 43(2): 157–166.
- Mujamdar, P., Guha Thakurta, T. 2019. Effect of storage time and temperature on hematological and biochemical parameters of blood. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)* 18(7): 10-15.
- Nordin, N., Ab Rahim, S. N., Wan Omar, W. F. A., Zulkarnain, S., Sinha, S., Kumar, S., Haque, M. 2024. Preanalytical errors in clinical laboratory testing at a glance: Source and control measures. *Cureus* 16(3): e57243.
- Oddoze, C., Lombard, E., Portugal, H. 2012. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical biochemistry* 45: 464-469.
- Pahwa, M.B., Menaka, K., Manish, R. 2021. Monitoring the effect of storage time and temperature on serum clinical biochemistry analytes. *Current Advances in Chemistry and Biochemistry* 2: 66–75.
- Pandey, I., Puppallwar, P., Dhotre, A., Sharma, A. 2023. Stability of routine biochemical parameters with temperature variation – A pilot study. *IJRAR - International Journal of Research and Analytical Reviews* 10(3): 542–548.
- Rendle, D. I., Heller, J., Hughes, K.J., Innocent, G.T., Durham, A.E. 2009. Stability of common biochemistry analytes in equine blood stored at room temperature. *Equine Veterinary Journal*, 41(5): 428–432.
- Rosato, P.N.R., Gama, F.G.V., Bruneto, M.A., Gomes, M.O.S., & Santana, A.E. 2009. Effects of storage time and temperature on biochemistry results from canine serum. Paper presented at the WSAVA 2009 Congress. Retrieved from <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=4253034&pid=22>
- Roy, J.E., Shanthi, B., Devi, A.J.M. 2017. Effect of storage on biochemical parameters. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*, 5(9): 622–625.
- Stokol, T., Nydam, D.V. 2005. Effect of anticoagulant and storage conditions on bovine nonesterified fatty acid and β -hydroxybutyrate concentrations in blood. *Journal of Dairy Science* 88(9): 3139–3144.
- Tanner, M., Kent, N., Smith, B., Fletcher, S., Lewer, M. 2008. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Annals of Clinical Biochemistry* 45(4): 375–379.
- Taylor, E.C., Sethi, B. 2011. Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. *British journal of biomedical science* 68:147-157.
- van Balveren, J. A., Huijskens, M. J., Gemen, E. F., Péquériau, N. C., Kusters, R. 2017. Effects of time and temperature on 48 routine chemistry, haematology and coagulation analytes in whole blood samples. *Annals of Clinical Biochemistry* 54(4): 448–462.
- Van Saun R. (2000). Blood profiles as indicators of nutritional status. In *Proceedings of the 18th Annual Western Canadian Dairy Seminar* (pp. 1–6). Red Deer, Alberta, Canada.
- Zhou, J., Fabros, A., Lam, S. J., Coro, A., Selvaratnam, R., Brinc, D., & Di Meo, A. (2024). The stability of 65 biochemistry analytes in plasma, serum, and whole blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 62(8), 1557-1569.

Influence of storage duration and temperature on the stability of biochemical parameters in control serum

Danijela Fajin^a, Ivana Davidov^a, Zoran Ružić^a, Mira Majkić^a, Marko Cincović^a

^aUniversity of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia

*Corresponding author: mcincovic@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the effect of storage temperature on the values of biochemical parameters. Bovine control serum was stored at 4 °C and 20 °C for six days. The stability of liver, kidney, energy, and metabolic function parameters was monitored. Concentrations of ALB, TPROT, UREA, NEFA, GLU, BHB, CHOL, TGC, TBIL, AST, Ca, and P were analyzed, with the maximum permissible instability assessed for each. Parameters exhibited different degrees of stability depending on temperature. Storage at 4 °C significantly improved the stability of most analytes. ALB, TPROT, and UREA were more stable at the lower temperature, whereas BHB, CHOL, and AST deviated after only 2–3 days at 20 °C. Changes in metabolite values were much greater when samples were stored at +20 °C (ambient temperature) than at +4 °C (refrigerator temperature) for ALB, UREA, GLU, NEFA, CHOL, and TGC. On day six, metabolite values at room temperature versus refrigerator temperature (relative to day one) were: ALB 84.5:98.3%; TPROT 98.6:99.1%; UREA 119.3:88.5%; GLU 72.6:82.6%; NEFA 132.5:115.1%; BHB 108.7:104.6%; CHOL 88.3:97.9%; TGC 80.1:98.1%; TBIL 89.6:90.2%; AST 82.3:89.4%; Ca 100.2:99.5%; P 105.9:104.7%. This study confirmed the significant impact of temperature on biochemical analytes during sample storage, highlighting the need to control the ambient temperature where samples are kept.

KEY WORDS

biochemistry parameters, serum, thermostability.

Rad primljen: 17.10.2025.

Ispravljen: 17.11.2025.

Prihvaćen: 21.11.2025.

Objavljen: 31.12.2025.