

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA JUHANT

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI
ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA JUHANT

PRIMERJAVA REZULTATOV DOLOČANJA FOLIKLE
STIMULIRAJOČEGA HORMONA V POLNI KRVI IN PLAZMI Z
AVTOMATIZIRANO IMUNOKEMIJSKO METODO

COMPARISON OF THE RESULTS FOR DETERMINATION OF FOLLICLE
STIMULATING HORMONE IN WHOLE BLOOD AND PLASMA WITH
AUTOMATED IMMUNOCHEMICAL METHOD

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI
ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za Farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. Praktični del sem opravljala v Centru znanja na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Zahvala

Najprej bi se rada zahvalila svojemu mentorju prof.dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. za vse predloge in nasvete pri pisanju diplomske naloge. Še posebej za ves trud in čas, ki je bil potreben, da sem se končno lotila pisanja diplomske naloge pri katerem je imel prof.dr. Joško Osredkar mag. farm., spec. med. biokem. resnično veliko potrpljenja.

Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Simonu Žaklju ter asist. dr. Roku Frlanu za pregled moje diplomske naloge.

Prav posebna zahvala pa gre moji družini in vsem prijateljem, ki so mi pomagali tako fizično kot psihično pri izdelavi diplomske naloge. Brez Vas mi nikakor ne bi uspelo. Verjeli ste vame, bolj kot sama vase... Zato resnično hvala za Vse in hvala Vam ker ste.

Posebna zahvala gre tudi mojemu partnerju in hčeri, ki sta poskrbela, da sem v težkih situacijah premagala strah ter z njuno pomočjo vse težko naredila lažje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof.dr. Joškom Osredkarjem, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, september 2016

Vesna Juhant

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Član diplomske komisije: asist. dr. Rok Frlan

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	II
KAZALO TABEL.....	II
KAZALO GRAFOV	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM KRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. Testiranje ob pacientu.....	1
1.1.1. Kaj je testiranje ob pacientu – POCT?	1
1.1.2. Zakaj se odločiti za POCT?	2
1.1.3. Standardi in predpisi.....	2
1.1.4. Uporaba POCT testiranja	3
1.1.5. Odločanje o uporabi POCT	4
1.1.6. Prednosti in slabosti POCT analiz	5
1.1.7. Osnovne zahteve za POCT analizador	6
1.1.8. Tehnologija za POCT	7
1.1.9. Tehnološka inovacija	7
1.1.10. Specifični tipi POCT analizadorjev	8
1.2. Endokrini sistem in hormoni.....	8
1.2.1. Folikle stimulirajoči hormon – FSH.....	9
1.3. Metode določanja FSH.....	10
1.3.1. Merjenje FSH	11

2.	NAMEN DELA	12
3.	MATERIALI IN METODE.....	13
3.1.	Opis skupine pacientov in kontrolnega materiala	13
3.2.	Opis priprave vzorca	13
3.3.	Opis metode s katero so bili določeni parametri	13
3.3.1.	Materiali	15
3.3.2.	Opis postopka analize.....	16
3.4.	Opis izračunov.....	16
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	Ponovljivost znotraj serije.....	21
4.2.	Ponovljivost izven serije.....	22
4.3.	Pridobitek dodatka – Recovery test.....	25
4.4.	Linearnost pri redčenju.....	28
4.5.	Korelacija, regresija ter ujemanje rezultatov vzorcev polne krvi in plazme	29
5.	RAZPRAVA.....	34
6.	SKLEP.....	36
7.	Literatura	37

KAZALO SLIK

Slika 1:	Primerjava alfa in beta podenote pri gonadotropnih hormonih (17).....	10
Slika 2:	Analizator PATHFAST.....	14
Slika 3:	Prikaz principa analizatorja	15

KAZALO TABEL

Tabela I:	Rezultati meritev ponovljivosti znotraj serije	21
-----------	--	----

Tabela II: Izračunani rezultati za ponovljivost znotraj serije	22
Tabela III: Rezultati meritev ponovljivost izven serije	23
Tabela IV: Izračunani rezultati za ponovljivost izven serije	25
Tabela V: Pridobitev dodatka z nizkimi koncentracijami FSH	25
Tabela VI: Pridobitek dodatka s srednjimi koncentracijami FSH.....	26
Tabela VII: Pridobitek dodatka z visokimi koncentracijami FSH.....	27
Tabela VIII: Linearnost pri redčenju vzorca plazme z visoko koncentracijo FSH.....	28
Tabela IX: Rezultati meritev heparinizirane plazme in heparinizirane polne krvi.....	29
Tabela X: Izračunani rezultati iz meritev heparinizirane plazme (metoda X) in heparinizirane polne krvi (metoda Y)	31

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikaz odstotka izkoristka pri redčenju FSH z nizko koncentracijo	26
Graf 2: Prikaz odstotka izkoristka pri redčenju FSH s srednjo koncentracijo.....	27
Graf 3: Prikaz odstotka izkoristka pri redčenju FSH z visoko koncentracijo.....	28
Graf 4: Linearnost pri redčenju.....	29
Graf 5: Primerjava rezultatov med heparinizirano plazmo in heparinizirano polno krvjo .	32
Graf 6: Ujemanje dveh matriksov z uporabo Bland-Altmanovega testa.....	33

POVZETEK

Testiranje ob pacientu je laboratorijsko testiranje, ki se ga izvaja izven laboratorija, po navadi ob pacientu. Prednost testiranja ob pacientu pred klasičnim testiranjem v laboratoriju je v tem, da vzorca ni potrebno transportirati v laboratorij, za analiziranje se uporabi polna kri, zato centrifugiranje ni potrebno. Na podlagi teh razlogov, se pridobi na času, ki je zelo pomemben na urgenci pri obravnavi pacientov z ogroženimi življenjskimi znaki. Rezultat analize je tako pridobljen hitreje in s tem tudi takojšnje zdravljenje pacienta.

Folikle stimulirajoči hormon spada med gonadotropine in je glikoprotein. Pri ženskah vpliva na jajčnike, saj spodbuja rast foliklov jajčnika. Pri moških pa vpliva na testise, kjer stimulira razvoj semenčic.

Raziskavo smo opravljali na analizatorju PATHFAST, ki temelji na kemiluminiscentni metodi s patentirano Magtration® tehnologijo. Analizator je majhen in preprost za uporabo. Sodi v skupino namiznih analizatorjev, ki se ga lahko transportira kamorkoli, tudi v prostor, kjer je pacient in analizo lahko izvedeno kar ob njem.

Namen diplomske naloge je preveriti delovanje aparata ter primerjati rezultate v heparinizirani plazmi z rezultati v heparinizirani polni krvi in s tem ugotoviti ali lahko z uporabo analizatorja PATHFAST analiziramo folikle stimulirajoči hormon, namesto v plazmi, kar v polni krvi.

Najprej smo določili natančnost metode z meritvijo ponovljivosti v seriji in izven serije, točnost metode s pridobitvijo dodatka in območje linearnosti metode.

Potem smo izmerili koncentracije v plazmi in polni krvi ter iz dobljenih rezultatov izračunali, kakšna je moč povezave med obema matriksoma.

Po končanih meritvah s pridobljenimi rezultati in izračuni smo ugotovili, da aparat deluje ustrezno, saj daje dovolj natančne in točne rezultate. Pri korelaciji med plazmo in polno krvjo smo dokazali, da med njima obstaja zelo močna povezava, kar pomeni, da so rezultati pridobljeni v heparinizirani plazmi in heparinizirani polni krvi zelo primerljivi med seboj. S tem dokazujemo, da za analiziranje folikle stimulirajočega hormona na analizatorju PATHFAST lahko uporabimo polno kri in tako dobimo dobljeni rezultat hitreje, kot bi ga pri klasični laboratorijski analizi.

Ključne besede: testiranje ob pacientu, folikle stimulirajoči hormon, analizator PATHFAST

ABSTRACT

Point-of-care testing is laboratory testing performed outside laboratory, usually at the bedside. Compared to standard laboratory testing, point-of-care testing has the advantage of obviating the need for transporting the specimen into a laboratory, and the analysis is performed using whole blood, so there is no need for centrifugation. This helps reduce the time needed at the emergency department when managing patients with compromised vital signs. The analysis results are thus obtained much faster, allowing for immediate patient treatment.

Follicle-stimulating hormone is a glycoprotein from the gonadotropin group. In women, it affects the ovaries by stimulating the growth of ovarian follicles. In men, it affects the testicles by stimulating the development of sperm.

Our research was performed at the PATHFAST analyzer, which is based on chemiluminescent method using the patented Magtration® technology. The analyzer is small and easy to use. It is a benchtop analyzer that can be taken anywhere, including the patient room, and enables bedside testing.

The purpose of this graduation thesis is to check the instrument's operation and compare the results obtained using heparinised plasma with those obtained using heparinised whole blood, and to establish whether the PATHFAST analyzer can be used to determine the follicle-stimulating hormone using whole blood instead of plasma.

First, the precision of the method was determined by measuring within- and between-series repeatability, the accuracy of the method was determined using the recovery test, and the linearity range of the method was established.

Then, the levels in plasma and whole blood were measured, and the results obtained were used to calculate the strength of association between the matrices.

Once the measurements were completed, and results obtained and calculated, it was established that the instrument functions correctly and provides sufficiently precise and accurate results. The correlation between plasma and whole blood was demonstrated to be strong, i.e. the results obtained in heparinised plasma and heparinised whole blood are comparable to a large extent. It was thereby demonstrated that whole blood can be used for measuring the follicle-stimulating hormone using the PATHFAST analyzer, which allows for faster results compared to standard laboratory analysis.

Keywords: point-of-care testing, analyzer PATHFAST, follicle stimulating hormone

SEZNAM KRAJŠAV

Ag – Antigen

ALP – Alkalna fosfataza

CLEIA – Kemiluminiscenčna encimska imunološka metoda

CRP – C reaktivni protein

EIA – Encimsko imunska metoda

ELISA – Encimski imunski test

FSH – Folikle stimulirajoči hormon

IRMA – Imunoradiometrijska tehnika

ISO – Mednarodna organizacija za standardizacijo (International Organization for Standardization)

LH – luteinizirajoči hormon

MAX – maksimum

MIN – minimum

POCT – Testiranje ob pacientu (Point of care testing)

Pt – Protitelesa

RIA – Radioimunski test

SZKKLM – Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino

UL – Uradni list

1. UVOD

1.1. Testiranje ob pacientu

Laboratorijem, ki preiskujejo biološke vzorce, pridobljene iz človeškega telesa pravimo medicinski laboratoriji. To so laboratoriji, ki pripomorejo k pridobitvi podatkov za postavitev diagnoze, terapije in preventivnega zdravljenja pacienta. K laboratorijski medicini spada tudi testiranje ob pacientu (POCT). Tu gre prav tako za dejavnost, kjer se za preiskave uporablja biološki material, ki izhaja iz človeškega telesa. S temi preiskavami pridobimo ustrezne informacije in so nam v pomoč pri diagnozi, prognozi ali spremljanju zdravljenja. POCT je del laboratorijske dejavnosti, ki se izvaja na drug način, na različnih krajih in z različnimi izvajalci. Tak način testiranja postaja vedno bolj atraktiven za medicinsko osebje, kot tudi za paciente same, ker je preprost za rokovanje in seveda tudi zaradi hitro pridobljenih rezultatov. Dostopnost le-tega je vedno večja, saj je napredek v tehnologiji zelo hiter (1). Testiranje ob pacientu je tako postalo eno izmed najhitrejših rasti na področju medicine, pri čemer letno raste med 10 % - 12 % (2). Laboratorijsko medicino bodo tako spremenile novosti selitve testiranja določenih laboratorijskih preiskav k pacientu, ker pridobljeni rezultati lahko vplivajo na takojšnje zdravljenje pacienta (3).

1.1.1. Kaj je testiranje ob pacientu – POCT?

Definicija testiranja ob pacientu POCT (point-of-care testing) je laboratorijsko testiranje, ki se ga izvaja izven laboratorija, običajno ob pacientu ali v bližini pacienta, rezultati pa lahko vplivajo na takojšnje zdravljenje (1). To je testiranje po definiciji Standarda ISO 22870 »POCT near-patient testing: testing that is performed near or at the site of a patient with the result leading to possible change in the care of the patient« (1,4).

Izraz POCT zamenjuje različne sinonime, kot so:

- hitri testi
- hitri laboratorijski testi ob pacientu
- obposteljni testi
- analiza ob postelji
- analiza ob pacientu
- testi ob postelji
- testi ob pacientu

Vsi ti izrazi so definirani kot analiza izven tradicionalnega laboratorija, najpogosteje v bližini pacienta (1, 4, 5).

1.1.2. Zakaj se odločiti za POCT?

V preteklosti so se klinično-kemijske preiskave izvajale le v laboratoriju. Razvoj tehnologije z uporabo prenosnih inštrumentov in uvedba čipov je poskrbelo, da se je laboratorijsko testiranje preselilo bližje pacientu. Zato se v zdravstvenih ustanovah vedno pogosteje uporabljajo testiranja POCT z namenom hitrejšega pridobivanja rezultatov v primerjavi s centralnimi laboratoriji. S tem se izboljša kakovost oskrbe bolnikov ter takojšen začetek zdravljenja, kar je za bolnika zelo pomembno, še zlasti v enotah za nujno medicinsko pomoč, oddelkih z intenzivno terapijo, operacijskih sobah, intervencijskih enotah, ... Osnovni razlog za uvedbo POCT je torej ta, da je rezultat analize dostopen v zelo kratkem času in ne v tistem času, ki ga laboratorij potrebuje za izdajo rezultata, za kar bi lahko bilo ogroženo pacientovo zdravstveno stanje (1).

1.1.3. Standardi in predpisi

Kot že omenjeno, gre pri testiranju ob pacientu za analizo biološkega materiala, zato veljajo za POCT iste zahteve kakovosti kot za medicinski laboratorij, ne glede na to, kakšne postopke pri tem uporabljamo (1, 4). Za POCT se zahteva, da se izvaja v skladu s predpisi in standardi. Leta 2006 je Mednarodna organizacija za standardizacijo ISO (International Organization for Standardization) izdala standard ISO 22870; Point-of-care testing (POCT) – requirements for quality and competence. Standard ISO 22870 se uporablja pri izvajanju POCT v bolnišnicah, klinikah in zdravstvenih ustanovah, ki ponujajo ambulantno oskrbo. Na testiranje, ki ga pacienti opravijo sami, se standard ne nanaša, saj ni obvezen za paciente. Poleg tega standarda je potrebno hkrati upoštevati tudi zahteve standarda, ki velja za medicinske laboratorije ISO 15189; Medical laboratories – requirements for quality and competence (1). V Sloveniji je Ministrstvo za zdravje leta 2004 objavilo Pravilnik o pogojih, ki ureja organizacijo in delo medicinskih laboratorijev ter zahteve, katere morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. Izšel je v uradnem listu Republike Slovenije - UL št. 64/11.6.2004. Pravilnik piše o tem, da je za vpeljavo in kontrolo nad izvedbo testa ob pacientu odgovoren specialist ustrezne stroke iz medicinskega laboratorija (1, 6).

Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM) je izdalo Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu, v katerih so

zajete zahteve mednarodnih in slovenskih standardov. Namen teh priporočil je kvaliteta in kontrola pri izvajanju POCT, kjer opisujejo organizacijski in strokovni vidik sistema kakovosti POCT. Vključuje izbiro aparatov, verifikacijo delovanja, primerno izobraževanje izvajalcev, izvajanje meritev, kontrolo kakovosti ter beleženje rezultatov (1). Smiselno je omeniti tudi to, da je POCT del laboratorijske dejavnosti, tako da mora biti vedno pod nadzorom laboratorija (4).

1.1.4. Uporaba POCT testiranja

POCT testiranje se običajno izvede na majhnih, enostavnih in prenosnih napravah, ki jih lahko prenašamo iz oddelka na različne lokacije tudi izven večjih zdravstvenih ustanov. Tako se POCT uveljavlja na številnih lokacijah, kot so:

- dom pacienta
- delovno mesto pacienta
- lokacija, objekti, kjer preživljamo prosti čas
- lekarna
- zdravstveni dom
- diagnostika in center za zdravljenje
- ambulanta
- rešilec / helikopter
- urgencia
- sprejemna soba
- operacijska soba
- enota za intenzivno nego, oddelek (5).

Uporaba POCT je še zlasti pomembna na urgenci, kjer se zaradi predolgega čakanja na laboratorijske rezultate lahko podaljša čas obravnave pacienta in s tem tudi daljše odkrivanje diagnoze, ter kasnejše zdravljenje z ustrezno terapijo, ki pa je lahko tudi življenjskega pomena.

Prednosti uporabe POCT na urgenci:

- takojšnja dostopnost POCT,
- v zelo hitrem času dostopni rezultati,
- takojšen začetek zdravljenja,
- pomoč pri odločitvah na triaži (srčni markerji, CRP),
- krajši čas obravnave pacienta,

- rezultati so na voljo tudi na terenu (7).

Z uporabo priročnih aparatov lahko ob pacientu analiziramo glukozo, osnovne analize urina, holesterol, hemoglobin, C-reaktivni protein (CRP), nekatera zdravila, označevalce za bolezni srca, koagulacijske teste. Tudi v mikrobiologiji jih uporabljajo za določanje streptokoka skupine A, infekcijske mononukleoze, *Helicobacter pylori*, virusa influence ter drog, (1,8)...

1.1.5. Odločanje o uporabi POCT

Potrebno je imeti pregled nad koraki, ki so pomembni pri ustvarjanju rezultatov diagnostičnih testov ter pri izvajanju dela, ki izhajajo iz odločitve na podlagi pridobljenih rezultatov. To lahko pripomore k:

- razumevanju potreb klinik za testiranje,
- opredelitvi logistike, povezane z izbiro testa, odvzemom vzorca in transportom,
- določanju ustrezne analizne metode ter njene karakteristike delovanja,
- ugotovitvi informacijskih izzivov povezane s sporočanjem rezultata testa v času, ko je to potrebno,
- izdelovanju poslovnega okvirja, za ustrezn način testiranja,
- razvijanju najboljšega delovnega okvirja za revizijo rezultatov,
- zmanjšanju administrativnega dela povezanega z zahtevo po izvedbi testa,
- izognitvi ali minimiziranju zamud pri celi vrsti postopkov testiranja:
 - z zbiranjem vzorcev v skladu s predpisanimi zahtevami,
 - s transportom vzorca od mesta odvzema do mesta testiranja,
 - z registracijo prejema vzorca,
 - z analizo vzorca,
 - z evidentiranjem rezultatov,
 - z oddajo rezultata do naročnika.

Ti koraki predstavljajo tveganje pri uporabi kateregakoli diagnostičnega testa. Na podlagi tega vidimo, da je POCT zelo ustrezna rešitev, ker preprečuje oz. zmanjšuje zamude v teh procesih ter hkrati zmanjšuje tveganja med posameznimi postopki, kot so:

- odvzete vzorca od napačnega bolnika,
- odvzete napačnega vzorca,
- napačna oznaka vzorca,
- izguba vzorca na poti do laboratorija,

- napačne označbe vzorca po prejemu v laboratoriju,
- opravljene napačne preiskave,
- poročanje napačnih rezultatov,
- neuspešno posredovanje rezultata do naročnika,
- časovna zamuda od naročila analize do same izvedbe le-te.

Na drugi strani pa obstajajo tudi tveganja povezana z uporabo POCT. Najpomembnejši med njimi so pomisleki o tehničnem delovanju inštrumenta, ki se uporablja, tako z vidika kakovosti inštrumenta, kot tudi o strokovni usposobljenosti uporabnika. Obstajajo tudi dvomi o kakovosti vzorca, načinu poročanja rezultatov, njihova interpretacija ter možnosti arhiviranja rezultatov analize.

Smernice o izvajanju POCT so sedaj široko na voljo, na način, ki skuša zmanjšati te težave. Najbolj zahtevna naloga v povezavi z izvajanjem POCT je danes verjetno uvedba sprememb v klinični praksi, da se čim bolje izkoristi hitrost, s katero se lahko dostavi rezultat preiskave (5).

1.1.6. Prednosti in slabosti POCT analiz

Najpomembnejša prednost testiranja ob pacientu je zagotovo ta, da so rezultati dosegljivi v zelo kratkem času, kar pripomore k hitrejšemu zdravljenju pacientov, hitrejši triazi pacientov ter zmanjšanjem sprejema pacientov v bolnišnicah (7, 8). Čas se pridobi tudi s tem, ko vzorca ni potrebno transportirati v laboratorij in ga ni potrebno predhodno obdelati, saj lahko uporabimo polno kri. Za analizo je dovolj majhen volumen vzorca.

Upravljanje z enostavnimi merilniki in zahtevnejšimi aparati je večinoma enostavno, zato lahko teste izvajajo osebe, ki niso strokovno usposobljene, lahko se jih izvaja tudi doma pri pacientu oz. jih izvajajo pacienti sami (8).

Prednost je tudi v tem, da so aparati navadno majhni, prenosni, ročni in jih brez težav prenašamo iz oddelka na različne lokacije (5).

Slabost rezultatov POCT je v ponovljivosti, pravilnosti in linearnosti analitskih metod ter v preveliki neenotnosti pri analiznih postopkih.

Različni proizvajalci aparatov uporabljajo za isti analit različne analizne metode, zato lahko nastane velika razlika med dobljenimi rezultati. Proizvajalec aparata mora podati podatke o morebitni omejitvi aparata, ki jih mora izvajalec analize upoštevati. Izvajalec mora biti prav tako seznanjen s tem, kateri metaboliti, zdravila, endogene snovi in ostali

fiziološki faktorji vplivajo na rezultate ter kako jih pravilno podati. To je pomembno zlasti zato, ker se za analizo lahko uporablja polna kri (8).

Aparat, ki bi ga potrebovali za določeno testiranje, običajno izberejo in kupijo osebe, ki nimajo ustreznega znanja in izkušenj iz tega področja in jim zahteve za usposabljanje ter dokumentiranje niso znane. Zaradi tega ne vedo ali je izbira primerna. Tako se v zdravstvenih ustanovah pojavijo številni aparati, ki so si med seboj sicer podobni, ampak se uporabljajo različni postopki in s tem dobljeni različni rezultati. Večkrat se pojavijo tudi težave pri primerjanju rezultatov analiz pridobljenih s POCT z rezultati pridobljenim v laboratoriju.

V takih primerih izvajalec analiz ne ve, kateri rezultat uporabiti in je tako prihranek časa in denarja izgubljen (1).

POCT teste pogosto izvajajo osebe, ki nimajo laboratorijske izobrazbe in zato tudi pomanjkljivo znanje. Potrebno je usposabljanje osebja, ki mora potekati tako s strani laboratorijskih strokovnjakov kot tudi proizvajalcev inštrumenta.

Ustrezno izobraženo osebje je pomembno, saj s tem zagotavlja kakovost in zanesljivost rezultatov (1).

Zato moramo izpostaviti, da testi ob pacientu spadajo med dopolnilne teste in nikakor ne med tiste, ki bi nadomestili analiziranje vzorca v centralnem laboratoriju (8).

1.1.7. Osnovne zahteve za POCT analizator

Uporabniki POCT analizatorja so v največji meri osebe, ki niso bile usposobljene za analitično delo in imajo zato pomanjkljivo znanje. Zaradi teh razlogov POCT naprave izpolnjujejo naslednje zahteve:

- aparat mora biti enostaven za uporabo, to pomeni, da moramo s kar najmanj koraki priti do zelenega rezultata,
- aparat in reagenti morajo omogočati lažji transport, hranjenje in uporabo vključno s kalibracijo,
- aparat mora dati primerljive rezultate s centralnim laboratorijem in v skladu s kliničnimi potrebami,
- aparat mora biti varen za shranjevanje, uporabo in odpad.

Najboljši aparati so tisti, pri katerih se večina korakov izvede avtomatsko med izvajanjem analize, kar pomeni manjše število korakov, ki jih mora opraviti oseba, ki dela z aparatom (5).

Poleg tega je zaželeno, da POCT analizatorji izpolnjujejo tudi te dodatne zahteve:

- pridobitev hitrih rezultatov (rezultati v minuti),
- prenos inštrumenta z reagentnimi kartušami za enkratno uporabo,
- eno ali dvostopenjski operacijski protokol,
- analiziranje vzorca v polni krvi ali v plazmi,
- preprosti delovni postopek,
- prilagodljivost v meniju testiranja,
- kvantitativni rezultati z ustrezno točnostjo in natančnostjo v primerjavi s centralnim laboratorijem,
- vgrajena kalibracija in nadzor kakovosti,
- shranjevanje reagentov na sobni temperaturi,
- shranjevanje rezultatov na trdi disk,
- opcija prenašanja podatkov,
- poceni inštrumenti,
- storitev, ki vključuje servisne dele (9).

1.1.8. Tehnologija za POCT

Analize razdelimo na kvalitativne in kvantitativne. Kvalitativna, kjer ugotavljamo ali je prisoten analit ter kvantitativna, kjer ugotavljamo koliko analita je prisotnega.

Analize običajno izvajamo v krvi ali urinu. Prednostni matriks za analizo je polna kri. Le redko pripravimo plazmo ali serum, ker to že pomeni centrifugiranje in podaljšan čas do rezultata. Pomembno je, da odvzamemo kri s pravilnim antikoagulantom in tudi, da je količina odvzete krvi zadostna. V primeru premajhne količine vzorca ali napačnega antikoagulanta so rezultati neuporabni.

(5).

1.1.9. Tehnološka inovacija

POCT aparati so se razvili zaradi napredka v številnih drugih tehnologijah, kot so detekcijske metode, prepoznavne metode, analiza tekočin in transdukcija.

Sodobne naprave so odpravile mnogo korakov, kot so brisanje vzorca na koncu predpisane periode reakcij, mešanje, pipetiranje, dodatek sekundarnega reagenta, spiranje ter merjenje časa. To so koraki, ki predstavljajo tveganje pri podajanju zanesljivega rezultata. Velik napredek sodobnih naprav je tudi v sposobnosti merjenja spektra signalov pri manjših

stroških, ki pa kljub temu omogočajo natančne in točne rezultate. Te naprave vključujejo procesorje zaslone, zaslone na dotik, fotocelice in spominske kartice (5.)

Sodoben razvoj je zato usmerjen predvsem v razširitev spektra testov in v izboljšave majhnih enostavnih aparatov, ki imajo omejeno analitično sposobnost, ne zahtevajo veliko laboratorijskega znanja, so robustni in neobčutljivi na neobvladljive vplive in motnje (1).

1.1.10. Specifični tipi POCT analizatorjev

POCT analizatorji temeljijo na tistih metodah, ki se uporabljajo v laboratoriju. Te metode so razdeljene v tri kategorije:

- ročni analizator
- ročni analizator s čitalcem
- namizni analizator

POCT analizatorji se lahko uporabljajo za merjenje posameznega analita ali kombinacijo analitov. Ročni analizatorji po navadi izmerijo le en analit, medtem ko analizatorji iz ostalih dveh skupin dopuščajo meritve več analitov. Možna prednost tega pristopa je, da se uporabnik šola le za en operacijski sistem. V primeru šolanja za več različnih operacijskih sistemov, predstavlja večje tveganje za napake s strani izvajalca analize (5).

1.2. Endokrini sistem in hormoni

Za preživetje organizma sta potrebna dva komunikacijska sistema, živčni in endokrini sistem. Živčni sistem deluje na principu signalov, ki se prenašajo po živcih (10). Ta skrbi za dogodke, ki v telesu potekajo hitro (11). V endokrinem sistemu pa so prenašalci hormoni, ki skrbijo za dolgotrajne procese in jih merimo v različnih časovnih intervalih oziroma v obdobjih (ura, mesec, leto) (10,11).

Endokrini sistem sestavlja vrsta žlez z notranjim izločanjem, ki proizvajajo hormone.

Hormoni so kemične snovi, ki se izločajo v kri in potujejo po celotnem organizmu do ciljnega organa. Usmerjajo pomembne procese za življenje, rast in razvoj (12, 13).

Beseda hormon izvira iz grščine (hormao) in pomeni prebuditi, poganjati, poslati (14).

Hormoni se tvorijo v endokrinih celicah, ki so razpršene po različnih tkivih ali pa se združujejo v žleze. Nastajajo tudi v nevrosekrecijskih celicah, ki tvorijo možganska jedra.

Poznamo več načinov delovanja hormonov oz. poti, po katerih hormoni pridejo do ciljnih celic ali tkiv:

- a) avtokrino delovanje, kjer hormon lahko deluje že v celici v kateri je nastal

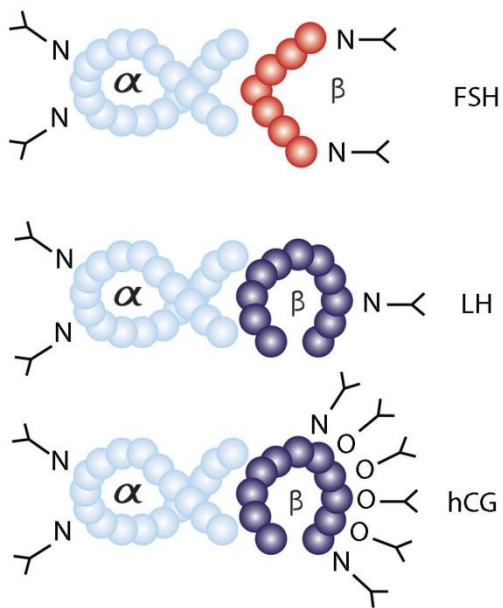
- b) parakrino delovanje, ko hormon prehaja v sosednje celice in uravnava njihovo delovanje
- c) lumokrino delovanje, kjer hormon potuje od mesta tvorbe do mesta delovanja po svetlini črevesja
- d) hormon se tvori v eni celici, se izloči in potuje po krvnem obtoku do ciljnega organa (13).

Glede na molekularno strukturo hormone ločimo:

- beljakovine in peptide (folikle stimulirajoči hormon (FSH), luteinizirajoči hormon (LH), inzulin, somatotropin...)
- steroide (aldosteron, kortizol, estradiol...)
- amine in produkte maščobnih kislin (adrenalin, noradrenalin...) (10,15).

1.2.1. Folikle stimulirajoči hormon – FSH

FSH spada med gonadotropine. Je glikoproteinski hormon, ki ga izloča hipofiza, natančneje prednji režanj ali adenohipofiza. Njegova molekulska masa je 33 000 daltona. FSH je sestavljen iz alfa podenote, ki je pri vseh gonadotropinih enaka ter iz beta podenote, ki pa ima drugačno edinstveno strukturo, zaradi katere se hormoni ločijo med seboj (slika1). Podenota alfa je sestavljena iz 92 aminokislin, beta podenota pa iz 111 aminokislin. Štiri nekovalentne vezi povezujejo podenoti med seboj, dve na alfa podenoto in dve na beta podenoto. Biološka aktivnost hormona je v β podenoti, ki pa sama po sebi brez α podenote ne deluje (15,16,17).



Slika 1: Primerjava alfa in beta podenote pri gonadotropnih hormonih (17)

Hipofizne gonadotropne celice izločajo gonadotropin FSH. Na površini celic so specifični receptorji za sproščevalni hormon gonadotropinov (LH-RH) in gonadne steroide. Število receptorjev za LH-RH se spreminja v različnih fizioloških stanjih, odvisno od načina izločanja LH-RH.

Delovanje FSH na celice granuloze folikla sproži sintezo estradiola, skupaj pa pripomoreta k delitvi granuloznih celic. FSH povzroča nastanek LH in PRL receptorjev na celicah granuloze, s tem pa omogoči delovanje LH na celice granuloze po ovulaciji do luteinizacije - nastanka rumenega telesca in sinteze progesterona.

FSH je odgovoren tudi za gametogenezo. Pri moških v testisih deluje na Sertolijeve celice, ki imajo specifične membranske receptorje za FSH. V Sertolijevih celicah spodbuja tvorbo beljakovine, ki veže androgene ter daje oporo za dozorevanje spermatozom. Vpliv FSH na dozorevanje semenčic omogoča vzdrževanje visoke koncentracije testosterona v semenskih kanalčkih.

Pri ženskah FSH in estradiol omogočata rast ter dozorevanje ovarijskega folikla.

V granuloznih in Sertolijevih celicah pospešuje aromatiziranje androgenov v estradiol (15).

1.3. Metode določanja FSH

Hormoni so v telesu prisotni v izjemno majhnih količinah, zato se za določevanje hormonov uporabljajo tehnike, ki temeljijo na visoki specifičnosti in občutljivosti, z uporabo reakcij antigenov (Ag) in protiteles (Pt). Tehnike za določevanje FSH so:

- radioimunske tehnike (radioimunski test – RIA, imunoradiometrijska tehnika – IRMA,
- encimskoimunske tehnike (imunoabsorpcijski test – ELISA),
- imunofluorescenčne tehnike (kemiluminiscenčna encimska imunološka metoda – CLEIA) (10, 18, 19).

1.3.1. Merjenje FSH

Merjenje FSH se v klasičnem laboratoriju izvaja večinoma v serumu ali v plazmi. Normalna raven FSH se razlikuje glede na to, v katerem obdobju menstruacijskega cikla se opravi meritev. Rezultate meritev podajamo v internacionalnih enotah na liter (IU/L).

Referenčne vrednosti FSH so:

- Ženske, folikularna faza: 2,8-11,3 IU/L
- Ženske, folikularna faza – 2-3. dan: 3,0-14,4 IU/L
- Ženske, ovulacija: 5,8-21 IU/L
- Ženske, luteinska faza: 1,2-9,0 IU/L
- Ženske, postmenopavza: 21,7-153 IU/L
- Moški: 0,7-11,1 IU/L (20).

2. NAMEN DELA

Namen te diplomske naloge je:

- primerjati rezultate koncentracije FSH z uporabo analizatorja PATHFAST v heparinizirani polni krvi in v heparinizirani plazmi ter podati rezultate o tem, kakšna je povezava med obema metodama
- za obe vrsti matriksa bomo izračunali:
 - ponovljivost rezultatov v seriji
 - ponovljivost rezultatov izven serije
 - točnost s pridobitvijo dodatka
 - linearnost

Te postopke bomo izvedli z določitvijo hormona FSH. Za testiranje bomo uporabili komercialno dostopen kontrolni material in pool vzorec, ki ga bomo pripravili iz vzorcev za rutinsko analizo hormona. Dobljene rezultate bomo statistično vrednotili s programom Excell ter z grafičnim prikazom statističnega programa MedCalc.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Opis skupine pacientov in kontrolnega materiala

V raziskavo smo vključili 59 zdravih žensk starih od 15 do 55 let. Za ponovljivost v seriji in izven serije smo uporabili tri različne pool vzorce plazme in tri vzorce polne krvi različnih koncentracij ter kontrolni material Precinorm (Roche - 11775863122 FSH).

3.2. Opis priprave vzorca

Alikvote polne krvi z antikoagulantom (heparinom) smo do analize hranili na $+2^{\circ}\text{C}$ do $+8^{\circ}\text{C}$ največ 6ur. Analize smo izvedli v roku dveh ur. Vzorce plazme smo dobili po centrifugiranju polne krvi na 2500 – 3000 obratih za 10 minut pri 4°C . Del plazme smo analizirali takoj, del pa shranili v 0,5 ml epice in jih zamrznili na -20°C do testiranja. Predhodno zamrznjene plazme smo odtalili na sobno temperaturo in jih pred analizo rahlo premešali. S tem smo zagotovili homogenost vzorca.

3.3. Opis metode s katero so bili določeni parametri

Raziskavo smo opravili na analizatorju PATHFAST (slika 2). Analizator spada v skupino namiznih POCT analizatorjev, ki je majhen, lahek, prilagodljiv ter ravnanje z njim je zelo enostavno s pomočjo treh korakov:

- vzorec prenesemo v kartuše z reagenti,
- kartuše z reagenti vstavimo v stojalo na analizatorju ter dodamo nastavke za pipete,
- pritisnemo gumb za start.

Ima ekran, preko katerega na dotik opravljamo z njim. Z vgrajenim računalnikom in tiskalnikom se dobljeni rezultati tudi natisnejo. Podatke lahko prenesemo v laboratorijski informacijski sistem.

Analizator lahko istočasno analizira šest enakih analitov in za to porabi le 17 minut ali pa manj kot 26 minut za analizo šestih različnih analitov.

S pomočjo senzorjev za prepoznavo vzorca fotometrično prepozna polno kri, plazmo ali serum. Pri polni krvi avtomatsko upošteva vrednost hematokrita v rezultatu. Nastavljena vrednosti hematokrita je 40 % (21).



Slika 2: Analizator PATHFAST

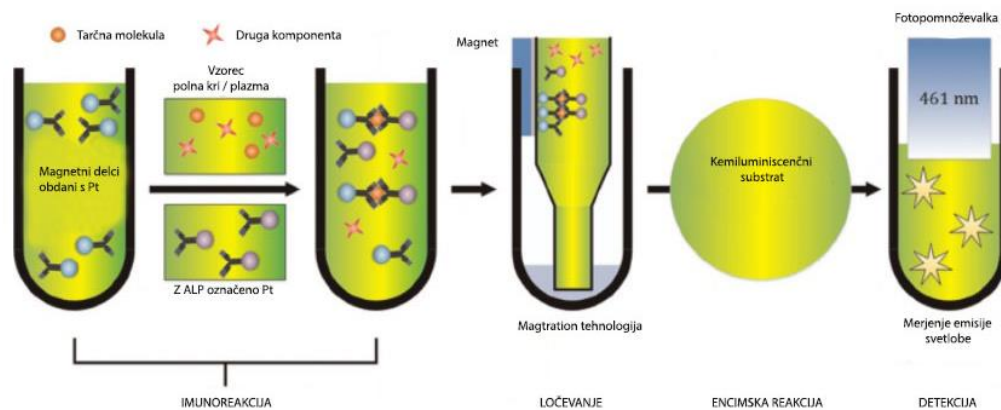
Analizator PATHFAST je popolnoma avtomatiziran imunološki analizator, ki temelji na kemiluminiscentni tehnologiji s patentirano tehnologijo Magtration® - ločitev vezane in nevezane frakcije pri posameznih korakih analize (21).

Princip metode

Princip metode poteka v štirih korakih (slika 3):

- Imunoreakcija: Vzorcju dodamo poliklonska Pt označena z alkalno fosfatazo (ALP) ter magnetne delce obdane s poliklonskimi Pt proti FSH. Po inkubaciji se protitelesa vežejo na različna mesta FSH, tvori se »sendvič« imunokompleks med encimsko označenimi Pt z magnetnimi delci prevlečeni s protitelesi.
- Ločevanje: Ločevanje poteka z uporabo tehnologije Magtration®, kjer se ločijo vezane in nevezane frakcije ter odstranijo nevezana protitelesa označena z encimom.
- Encimska reakcija: Očiščenemu imunokompleksu se doda kemiluminiscenčni substrat. Sledi kratka inkubacija, kjer aparat meri luminiscenco encimske reakcije.

- Detekcija: Meritev se izvaja pri 461nm. Signal izmerjene luminiscence je v povezavi s koncentracijo FSH v vzorcu izračunan s pomočjo umeritvene krivulje (22).



Slika 3: Prikaz principa analizatorja

Tipične značilnosti za analizator so:

- volumen vzorca: 100 μ L,
- princip meritve: kemiluminiscentna tehnologija s patentirano tehnologijo Magtration[®],
- čas meritve: 17 minut za šest vzorcev,
- primerni vzorci za testiranje: plazma in polna kri,
- temperatura meritve: 37,5 °C,
- valovna dolžina: 300 - 600 nm (22).

3.3.1. Materiali

Vsi materiali, reagenti, kalibratorji in kontrole so bili proizvedeni v proizvodnem obratu 1144, Ohwadasinden, Yachiyo, Chiba Japan under GMP.

Med raziskavo so se na analizatorju PATHFAST izvajala potrebna vzdrževalna dela (kontrola kakovosti sistema in kalibracija) ter potrebna čiščenja.

Pri delu na analizatorju smo uporabili reagentni komplet, ki je sestavljen iz kartuše z reagenti, kalibratorjev in raztopine za raztapljanje.

Kartuša z reagenti

Uporabili smo kartušo z reagentom z oznako 1151006015. Kartuša z reagenti ima 16 vdolbinic. Prva vdolbinica je namenjena za nanos vzorca, sedem vdolbinic je napolnjenih z

reagenti, ostalih osem pa je praznih. Vse vdolbinice, razen prve in desete, so prekrte z aluminijasto folijo, ki je označena s serijsko številko ter imenom analizirane snovi. Med samo analizo se aluminijasta folija preluknja s t. i. enoto za luknjanje, kar omogoča varen prehod konic nastavkov za pipete v reagentne vdolbinice. Kartuše z reagenti so že pripravljene za uporabo (21).

Kalibratorji in kontrolni material

Uporabljeni lot kalibratorjev (kalibrator 1 in kalibrator 2): R901

Kontrola: Precinorm (Roche - 11775863122 FSH)

Točne sestave reagentnih kartuš, kalibratorjev in kontrolnega materiala je proizvajalec patentiral in podatkov za to ni podanih.

Pripomočki:

- pipete, nastavki za pipete, centrifuga

3.3.2. Opis postopka analize

Najprej smo si pripravili vse potrebne pripomočke in materiale. Pred uporabo vzorcev, smo le-te rahlo premešali. Vzeli smo kartušo z reagenti za analiziranje hormona FSH, ki smo jo vstavili v le-temu namenjeno stojalo, ki je v analizatorju. Odpipetirali smo 100 μ L vzorca plazme ali polne krvi ter vzorec prenesli na kartušo z reagenti v vdolbinico za vzorec. Po nanosu vseh vzorcev smo analizatorju dodali še nastavke za pipete, ga s pokrovom zaprli ter pritisnili gumb start in s tem zagnali analizator. Pri poteku analize smo v sistem analizatorja ročno vnašali oznake vzorcev pacientov.

3.4. Opis izračunov

Po opravljenih meritvah smo dobljene rezultate statistično vrednotili z računalniškim programom Excel. Določili smo minimum in maksimum ter izračunali še ostale parametre:

- najmanjša izmerjena vrednost je **minimum** (MIN)
- največja izmerjena vrednost je **maksimum** (MAX)
- mediana ali središčnica je vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjšo vrednost, polovica enot pa večjo vrednost.

Iz dobljenih rezultatov smo z uporabo enačbe 1 za plazmo in polno kri izračunali vsoto meritev vseh spremenljivk

Enačba 1

$$\sum x_i = x_1 + x_2 + x_3 + \dots x_n$$

x_i – vsota vseh meritev spremenljivk

x_n – število meritev

Iz vsote vseh spremenljivk smo nato za plazmo in polno kri izračunali povprečje ali povprečno vrednost z uporabo enačbe 2. Povprečje je mera za srednjo vrednost (SR.VR.) statistične spremenljivke

Enačba 2

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$$

\bar{x} – povprečna vrednost

x_i – vsota vseh meritev spremenljivk

n – število meritev

Standardni odklon

Standardni odklon ali standardna deviacija (S) nam da podatek o tem, za koliko so vrednosti statističnih enot odstopile od povprečja, oz. podatek o meri za razpršenost porazdelitve vrednosti. Standardni odklon smo izračunali z enačbo 3 (23).

Enačba 3

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

S – standardni odklon

x_i – vsota vseh meritev spremenljivk

\bar{x} – povprečje

N – število meritev

Koeficient variacije

Koeficient variacije je količnik standardnega odklona in povprečne vrednosti, podan v procentih (enačba 4). Daje nam podatek o razpršenosti statističnih enot okrog povprečnih vrednosti in s tem pove, kako ponovljivi so naši rezultati. Nižji, ko je koeficient variacije, boljša je ponovljivost dobljenih rezultatov (23).

Enačba 4

$$KV\% = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

Pridobitek dodatka – Recovery test

Točnost metode preverimo z uporabo pridobitve dodatka. Analizo naredimo tako, da znani koncentraciji dodamo točno znano količino analita. Izmerimo koncentracijo pred dodatkom analita in po dodatku analita ter izračunamo, če razlika v izmerjenih koncentracijah ustreza količini dodanega analita. Izračunali smo jo po enačbi 5 (24).

Enačba 5

$$X = \frac{\text{izmerjena vrednost}}{\text{pričakovana}} * 100$$

X = izkoristek

Korelacijski koeficient

Pearsonov korelacijski koeficient je mera linearne povezanosti med dvema spremenljivkama. Vrednosti koeficienta so lahko med - 1 in 1, le takrat lahko govorimo o linearni povezavi med spremenljivkami. Kadar pa so vrednosti koeficienta okoli 0, pa govorimo o tem, da spremenljivki med seboj nista povezani oz. ne korelirata med seboj.

Moč povezanosti med dvema spremenljivkama nam pokaže lestvica vrednosti koeficienta:

Vrednost koeficienta -> Moč povezanosti

- 0,00 -> ni povezanosti
- 0,01-0,19 -> neznatna povezanost
- 0,20-0,39 -> nizka/šibka povezanost
- 0,40-0,69 -> srednja/zmerna povezanost
- 0,70-0,89 -> visoka/močna povezanost
- 0,90-0,99 -> zelo visoka/zelo močna povezanost

- 1,00 -> popolna (funkcijska) povezanost

Pearsonov korelacijski koeficient nam torej pove, kakšna je povezanost med dvema spremenljivkama, ne pove nam pa podatka, kakšen je vpliv ene spremenljivke na drugo. Povezavo med polno krvjo in plazmo smo izračunal po enačbi 6 (25, 26).

Enačba 6

$$r = \frac{\sum (X_i - X_x) * \sum (Y_i - X_y)}{\sqrt{\sum (X_i - X_x)^2 * \sum (Y_i - X_y)^2}}$$

X_i – posamičen izmerjeni rezultat polne krvi

X_x – povprečna vrednost od izmerjenih rezultatov polne krvi

Y_i – posamičen izmerjeni rezultat plazme

X_y – povprečna vrednost od izmerjenih rezultatov plazme

Regresija

Passing in Bablok regresijo uporabljamo za primerjanje dveh metod in medsebojnega odnosa med njima ter pri neznanih podatkih variance ali o njeni nekonstantnosti. Postopek je robusten pri prisotnosti ene ali nekaj zunaj ležečih meritev. Pogoji za uporabo regresije je široko koncentracijsko območje in linearnost med dvema metodama.

Passing in Bablog regresija ustreza parametrom a in b pri linearni enačbi, enačba 7.

Enačba 7

$$y = a + b x$$

a – odsek na ordinatni osi

b – naklon premice

Rezultate podajamo tako, da se izračuna 95 % interval zaupanja za a in b. Kadar ima odsek znotraj intervala zaupanja vrednost 0 in kadar je naklon znotraj tega intervala 1, lahko trdimo, da sta si metodi primerljivi v koncentracijskem območju in med njima ni signifikantnih razlik (27).

Bland - Altman test

Bland – Altman test je statistična metoda, ki nam grafično prikaže primerjavo dveh metod, kjer vidimo sipanje rezultatov, glede na dovoljene meje pri 95 % intervalu zaupanja. Za

izračun se uporabi povprečje vrednosti vseh parov ter razlike vseh parov meritev. V grafičnem prikazu na absciso nanesemo povprečje vrednosti parnih meritev, na ordinato pa pripadajoče razlike. Določimo razliko povprečnih vrednosti parov meritev ter s tem podamo njihovo variabilnost. Podani 95 % interval zaupanja pri zgornji in spodnji meji nam v primeru ozkega razpona pove, da sta si metodi med seboj primerljivi (28).

4. REZULTATI

Preverjali smo ponovljivost znotraj in izven serije, točnost in linearnost metode ter kakšna je korelacija rezultatov v plazmi in polni krvi. Vse rezultate smo statistično obdelali v programu Excel in jih vrednotili z različnimi izračuni ter parametri.

4.1. Ponovljivost znotraj serije

Za določanje ponovljivosti znotraj serije smo uporabili tri različne pool vzorce plazme in tri vzorce polne krvi različnih koncentracij ter jih merili z dvajsetkratnimi ponovitvami pri istih pogojih. Dobljeni rezultati v tabeli I, nam povedo, kako natančna je metoda pri več ponovitvah istega vzorca znotraj serije.

Tabela I: Rezultati meritev ponovljivosti znotraj serije

Plazma 1	Plazma 2	Plazma 3	Polna kri 1	Polna kri 2	Polna kri 3
FSH (IU/L)	FSH(IU/L)	FSH(IU/L)	FSH(IU/L)	FSH(IU/L)	FSH(IU/L)
5.70	22.9	158	4.68	30.3	147
5.42	22.8	156	4.55	28.5	141
4.91	23.9	157	4.93	29.3	145
5.07	23.8	172	4.70	33.0	141
5.38	21.6	165	4.85	34.5	142
4.84	24.7	174	4.82	28.5	145
5.44	23.2	169	4.65	30.0	144
5.25	22.1	153	4.62	33.2	141
4.98	25.0	147	4.78	30.8	143
5.13	22.7	164	4.55	31.7	143
5.68	22.8	168	4.35	29.3	145
5.31	24.9	150	4.72	29.7	140
5.30	23.0	158	4.95	29.3	146
5.30	21.0	169	4.65	28.3	143
4.79	22.5	152	4.57	30.8	147

5.26	22.6	155	4.67	29.8	152
5.70	21.4	176	4.80	29.3	148
4.84	22.5	150	4.65	30.7	148
5.41	25.0	155	4.57	28.0	144
5.31	21.1	159	5.15	33.5	140

Izračuni:

Iz rezultatov meritev smo za vsak vzorec podali najmanjšo in največjo meritev ter izračunali srednjo vrednost, standardno deviacijo in koeficient variacije. Izračuni so podani v tabeli II.

Tabela II: Izračunani rezultati za ponovljivost znotraj serije

	Plazma 1	Plazma 2	Plazma 3	Polna kri 1	Polna kri 2	Polna kri 3
MIN (IU/L)	4.79	21.0	147	4.35	28.0	140
MAX (IU/L)	5.70	25.0	176	5.15	34.5	152
SR.VR. (IU/L)	5.25	23.0	160	4.71	30.4	144
S (IU/L)	0.280	1.25	8.66	0.176	1.86	3.17
KV %	5.3	5.4	5.4	3.7	6.1	2.2
N	20	20	20	20	20	20

4.2. Ponovljivost izven serije

Za določevanje ponovljivosti izven serije smo izvajali meritve štirikrat dnevno v dvajsetih dneh. Uporabili smo 3 kontrolne vzorce različnih koncentracij. Dobljeni rezultati v tabeli III nam povedo, kako natančna je metoda v različnih serijah, pri različnih pogojih.

Tabela III: Rezultati meritev ponovljivost izven serije

DAN	Kontrolni vzorec 1(IU/L)		Kontrolni vzorec 2(IU/L)		Kontrolni vzorec 3(IU/L)	
1	4.96	5.44	22.5	22.1	169	162
	4.95	5.40	24.0	22.8	163	169
2	5.00	5.14	21.9	21.5	168	166
	5.05	4.99	23.7	25.4	173	177
3	4.98	5.04	24.6	23.2	158	173
	4.87	5.38	21.8	23.0	175	177
4	5.29	5.12	22.2	25.0	163	161
	5.36	5.23	22.2	21.6	159	186
5	4.86	4.88	21.2	21.5	162	154
	4.89	5.15	24.3	22.7	156	180
6	4.96	4.66	24.4	22.0	162	165
	5.25	4.93	21.0	21.3	161	151
7	4.88	5.07	22.0	21.2	161	155
	4.97	5.04	21.3	21.5	148	154
8	4.79	4.90	22.9	22.7	164	161
	4.75	5.23	21.5	21.2	175	175
9	4.91	4.95	21.7	20.6	161	152
	5.00	4.93	21.9	21.6	159	164
10	4.67	4.84	22.5	21.4	156	154
	4.66	4.68	22.0	21.8	164	157
11	4.73	4.90	21.0	20.7	157	156
	4.89	4.93	20.8	21.1	164	147

12	5.17	4.97	22.0	21.5	143	161
	4.66	4.82	21.2	23.6	158	158
13	4.83	4.85	22.8	21.9	160	164
	5.01	5.23	21.6	20.8	160	158
14	4.97	4.85	21.1	22.1	157	144
	5.00	4.99	22.0	22.1	169	159
15	4.70	4.85	20.8	21.5	167	147
	4.61	5.00	21.3	22.6	161	154
16	4.68	4.64	20.5	20.2	157	157
	4.88	5.02	21.7	21.4	157	152
17	5.00	5.00	22.3	24.7	162	153
	4.89	5.07	22.5	22.3	152	155
18	4.83	4.90	21.8	20.6	158	157
	5.04	4.96	21.1	21.0	154	154
19	4.58	4.62	20.6	21.9	163	160
	4.92	5.30	22.3	21.2	160	161
20	5.10	5.11	22.6	22.4	156	155
	4.44	4.83	21.2	22.6	155	155

Izračuni:

Iz rezultatov meritev smo za vsak vzorec podali najmanjšo in največjo meritev ter izračunali srednjo vrednost, standardno deviacijo ter koeficient variacije. Izračuni so podani v tabeli IV.

Tabela IV: Izračunani rezultati za ponovljivost izven serije

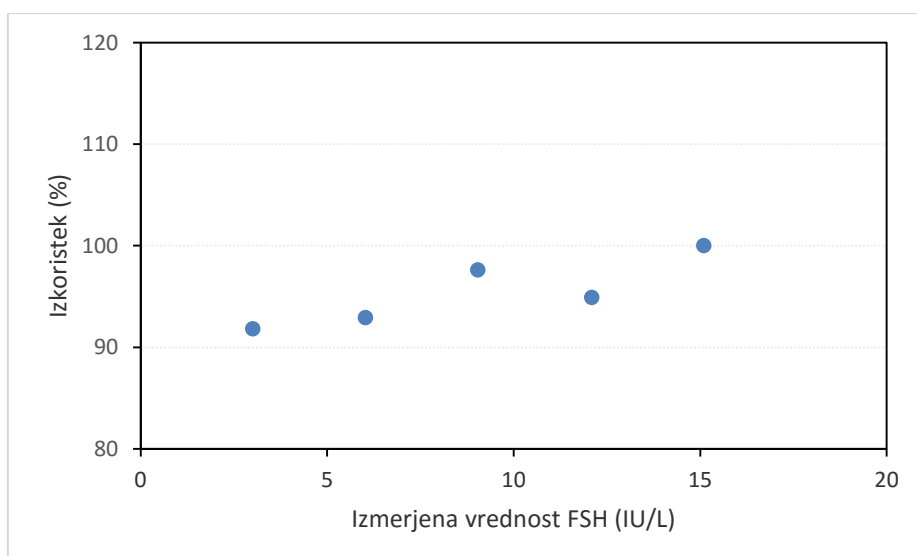
		Kontrolni vzorec 1	Kontrolni vzorec 2	Kontrolni vzorec 3
MIN	(IU/L)	4.44	20.2	143
MAX	(IU/L)	5.44	25.4	186
SR.VR	(IU/L)	4.95	22.0	160
S	(IU/L)	0.201	1.10	8.04
KV %		4.1	5.0	5.0
N		40	40	40

4.3. Pridobitek dodatka - Recovery test

Pri pridobitku dodatka smo uporabili tri različne plazma vzorce, z nizkimi, srednjimi in visokimi koncentracijami FSH ter jih redčili s serumi z nizkimi koncentracijami FSH (nosečnic) in vse analizirali trikrat. Izmerjenim vrednostim smo izračunali povprečno vrednost, teoretično vrednost ter odstotek izkoristka. Odstotek izkoristka nam pove ali razlika v izmerjenih vrednostih ustreza količini dodanega FSH. V naslednjih tabelah in grafih so prikazani rezultati testa pridobitka dodatka (izkoristek) in sicer za nizke koncentracije (tabela V, graf 1), srednje koncentracije (tabela VI, graf 2) in visoke koncentracije (tabela VII, graf 3).

Tabela V: Pridobitev dodatka z nizkimi koncentracijami FSH

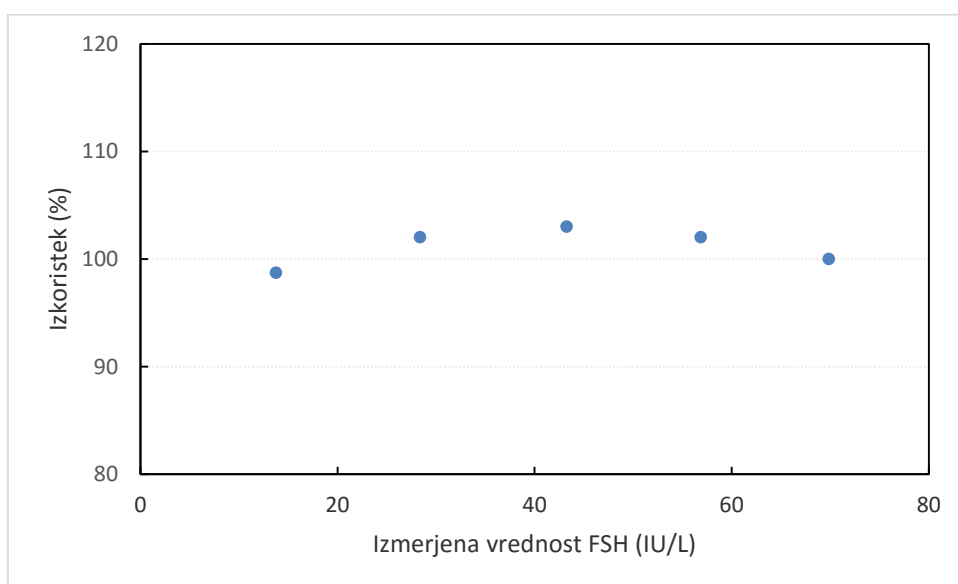
PLAZMA 1							
Faktor redčenja		Izmerjena koncentracija FSH (IU/L)				Teoretična koncentracija FSH(IU/L)	Izkoristek %
Nizek	Visok	Meritev 1	Meritev 2	Meritev 3	SR.VR.		
0.0	1.0	14.8	15.1	15.3	15.1	15.1	100
0.2	0.8	11.4	11.0	11.9	11.4	12.1	94.9
0.4	0.6	9.38	8.97	8.13	8.83	9.04	97.6
0.6	0.4	5.33	5.63	5.84	5.60	6.03	92.9
0.8	0.2	2.80	2.80	2.70	2.77	3.01	91.8
1.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-



Graf 1: Prikaz odstotka izkoristka pri redčenju FSH z nizko koncentracijo

Tabela VI: Pridobitek dodatka s srednjimi koncentracijami FSH

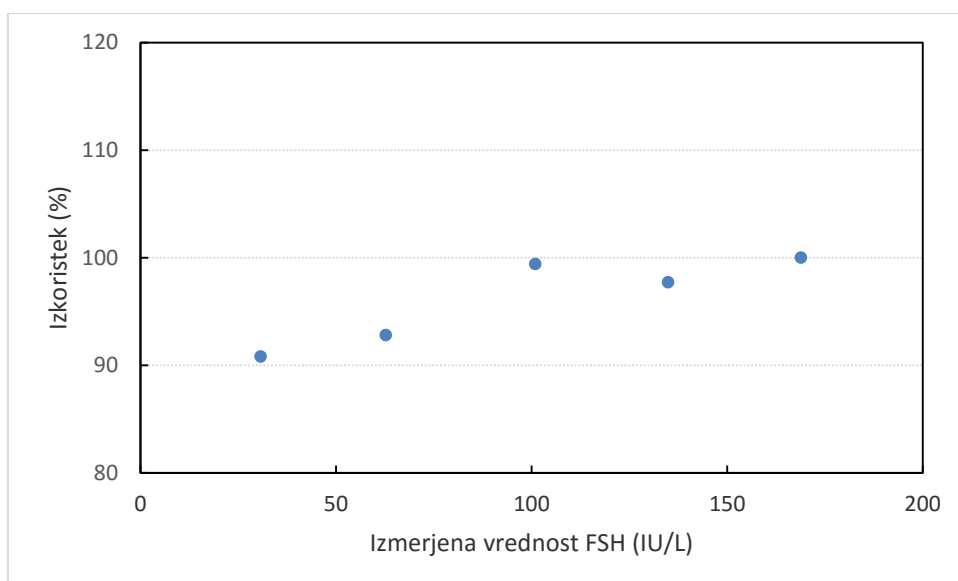
PLAZMA 2							
Faktor redčenja		Izmerjena koncentracija FSH (IU/L)				Teoretična koncentracija FSH (IU/L)	Izkoristek %
Nizek	Visok	Meritev 1	Meritev 2	Meritev 3	SR.VR.		
0.0	1.0	68.3	70.0	71.5	69.9	69.9	100
0.2	0.8	57.0	57.9	55.7	56.9	55.9	102
0.4	0.6	42.6	44.0	43.2	43.3	42.0	103
0.6	0.4	28.2	28.8	28.2	28.4	28.0	102
0.8	0.2	13.8	14.0	13.6	13.8	14.0	98.7
1.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-



Graf 2: Prikaz odstotka izkoristka pri redčenju FSH s srednjo koncentracijo

Tabela VII: Pridobitek dodatka z visokimi koncentracijami FSH

PLAZMA 3							
Faktor redčenja		Izmerjena koncentracija FSH (IU/L)				Teoretična koncentracija FSH(IU/L)	Izkoristek %
Nizek	Visok	Meritev 1	Meritev 2	Meritev 3	SR.VR.		
0.0	1.0	177	176	155	169	169	100
0.2	0.8	135	135	135	135	135	99.7
0.4	0.6	101	98.9	103	101	102	99.4
0.6	0.4	61.0	61.9	65.6	62.8	67.7	92.8
0.8	0.2	29.8	33.1	29.4	30.8	33.9	90.8
1.0	0.0	0.004	0.001	0.002	0.002	0.002	-



Graf 3: Prikaz odstotka izkoristka pri redčenju FSH z visoko koncentracijo

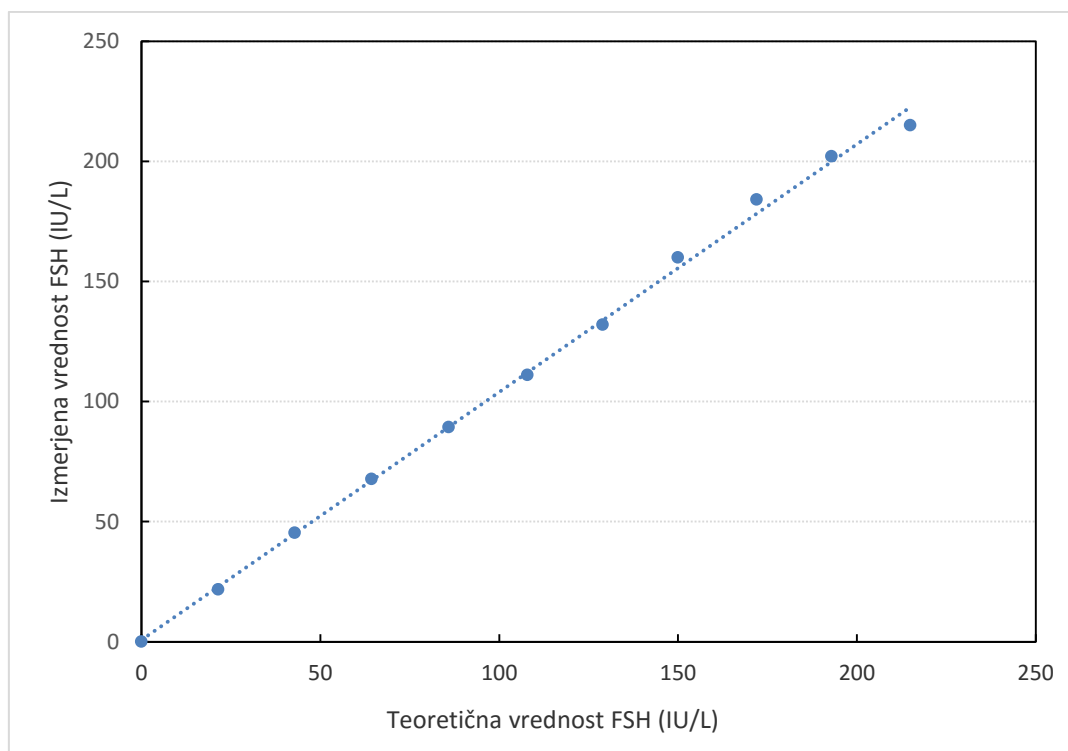
4.4. Linearnost pri redčenju

Pri linearnosti redčenja smo uporabili vzorec plazme z visoko koncentracijo FSH ter ga po korakih redčili s serumom z nizko koncentracijo FSH (nosečnice). Vzorec plazme smo analizirali trikrat ter izračunali povprečno vrednost, teoretično vrednost in odstotek izkoristka, prikazano v tabeli VIII. Graf 4 pa nam prikazuje premico odvisnosti.

Tabela VIII: Linearnost pri redčenju vzorca plazme z visoko koncentracijo FSH

PLAZMA							
Faktor redčenja		Izmerjena koncentracija FSH (IU/L)				Teoretična koncentracija FSH(IU/L)	Izkoristek %
Nizek	Visok	Meritev 1	Meritev 2	Meritev 3	SR.VR.		
0.0	1.0	211	208	225	215	215	100
0.1	0.9	196	210	199	202	193	104
0.2	0.8	186	186	179	184	172	107
0.3	0.7	168	155	158	160	150	107
0.4	0.6	128	133	136	132	129	103
0.5	0.5	111	114	108	111	108	103
0.6	0.4	89.1	91.8	87.0	89.3	85.9	104
0.7	0.3	62.3	73.2	67.6	67.7	64.4	105
0.8	0.2	45.7	44.9	45.2	45.3	42.9	105

0.9	0.1	20.3	23.7	21.4	21.8	21.5	102
1.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-



Graf 4: Linearnost pri redčenju

4.5. Korelacija, regresija ter ujemanje rezultatov vzorcev polne krvi in plazme

Korelacija ali korelacijski koeficient predstavlja linearno povezanost dveh spremenljivk. V našem primeru smo za oceno korelacije uporabili Pearsonov korelacijski koeficient ter Passing in Bablok regresijo.

Za merjenje koncentracije smo uporabili 59 vzorcev plazme in 59 vzorcev polne krvi. Rezultati meritve so prikazane v tabeli IX, izračunani rezultati pa so prikazani v tabeli X.

Tabela IX: Rezultati meritev heparinizirane plazme in heparinizirane polne krvi

ANALIZATOR PATHFAST FSH (IU/L)		
Vzorec	Heparinizirana plazma	Heparinizirana polna kri
1	22.1	21.8
2	170	187
3	127	138
4	86.6	88.3
5	34.0	34.8
6	3.29	2.83

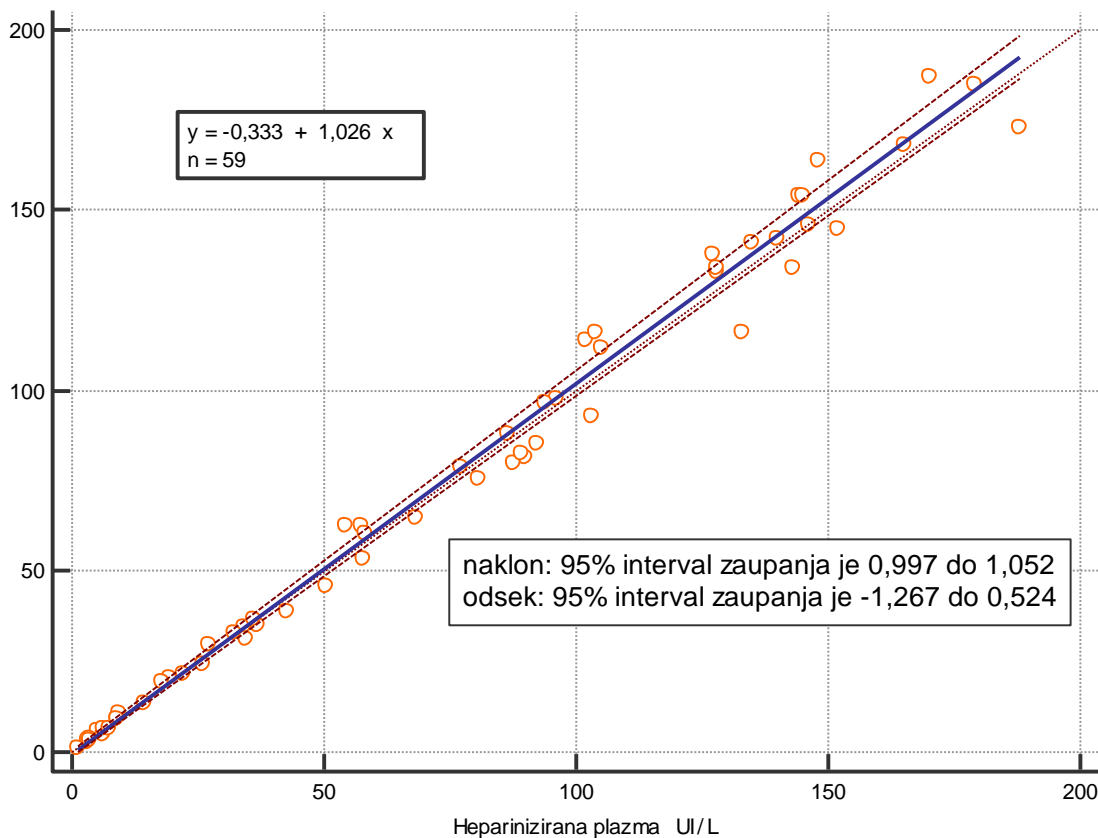
7	152	145
8	103	93.0
9	34.5	31.3
10	25.8	24.2
11	5.21	5.85
12	128	133
13	90.1	81.8
14	57.7	53.7
15	19.2	20.5
16	3.30	3.78
17	148	164
18	105	112
19	57.2	62.8
20	17.7	19.7
21	8.74	9.13
22	144	154
23	96.1	97.8
24	54.1	62.7
25	102	114
26	6.32	5.07
27	135	141
28	87.7	79.8
29	42.8	39.0
30	165	168
31	3.24	3.03
32	188	173
33	133	116
34	77.3	79.0
35	68.2	64.7
36	6.32	6.70
37	145	154
38	104	116
39	58.2	60.5
40	27.2	29.5
41	3.68	3.12
42	143	134
43	92.2	85.2
44	36.8	35.2
45	50.5	46.2
46	9.18	10.8
47	179	185

48	128	134
49	80.8	75.5
50	14.3	13.6
51	1.06	1.11
52	146	146
53	93.7	96.7
54	36.2	36.8
55	8.75	9.25
56	7.54	6.70
57	140	142
58	89.0	82.8
59	32.3	33.0

Tabela X: Izračunani rezultati iz meritev heparinizirane plazme (metoda X) in heparinizirane polne krvi (metoda Y)

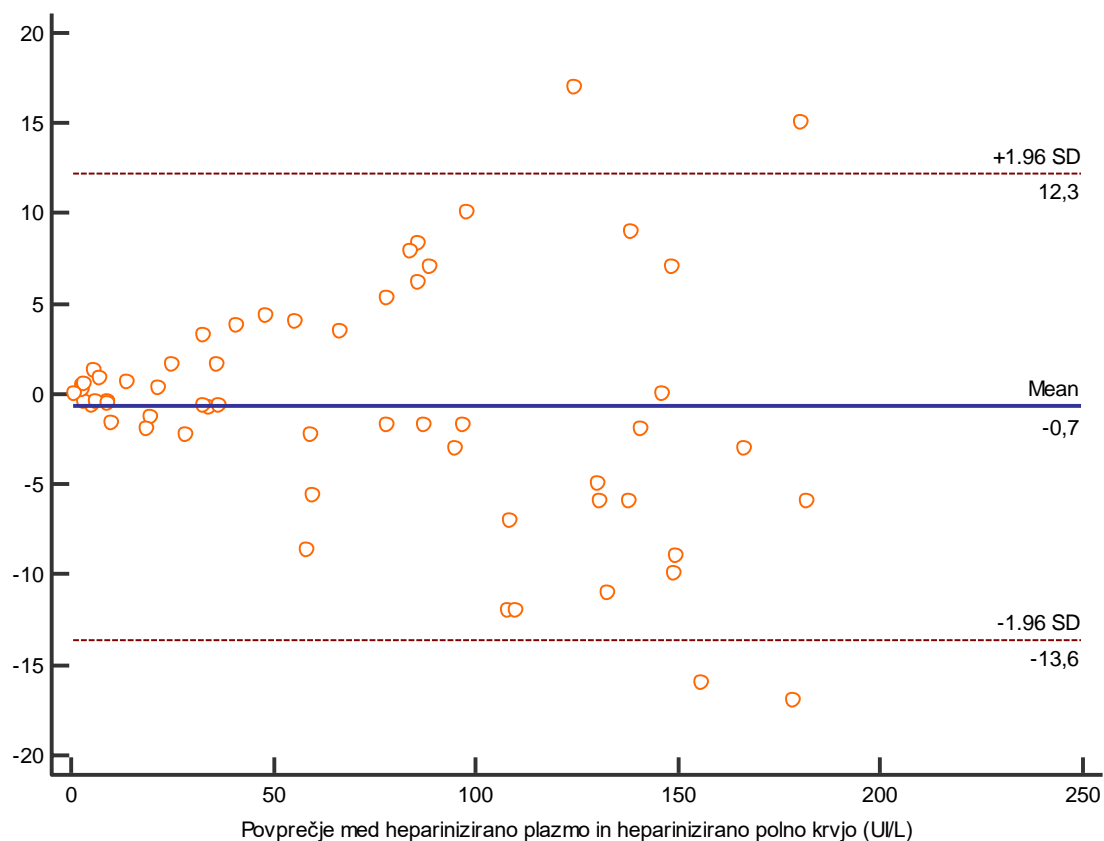
	Metoda X : ANALZATOR PATHFAST FSH Plazma	Metoda Y : ANALZATOR PATHFAST FSH Polna kri
N	59	59
SR.VR. (IU/L)	73.45	74.12
MEDIANA (IU/L)	68.2	64.7
MIN (IU/L)	1.06	1.11
MAX (IU/L)	188	187

Ujemanje rezultatov lahko izračunamo in prikažemo s Passing in Bablok regresijsko premico in z izračunanim korelacijskim koeficientom. Izračunani korelacijski koeficient je 0.993, ki nakazuje na zelo močno povezavo med obema matriksoma. Graf 5 pa nam prikazuje Passing in Bablok linearno premico rezultatov z dvema matriksoma s 95 % intervalom zaupanja.



Graf 5: Primerjava rezultatov med heparinizirano plazmo in heparinizirano polno krvjo

Ujemanje dveh metod (v našem primeru gre za dva matriksa) pa lahko prikažemo tudi z Bland - Altmanovim testom (graf 6) in sicer razlike in sipanje rezultatov znotraj meja $\pm 1,96$ SD. V tem območju je 95 % interval zaupanja.



Graf 6: Ujemanje dveh matriksov z uporabo Bland-Altmanovega testa

Graf 6 prikazuje povprečje razlik med obema matriksoma (- 0,7 - neprekinjena modra črta), zgornjo mejo intervala zaupanja (12,3 - prekinjena rdeča črta) ter spodnjo mejo intervala zaupanja (-13,6 - prekinjena rdeča črta).

5. RAZPRAVA

Namen te diplomske naloge je bil primerjati rezultate koncentracij v heparinizirani plazmi z rezultati v heparinizirani polni krvi z uporabo POCT analizatorja PATHFAST ter na podlagi tega raziskati kateri matriks je primernejši za merjenje FSH.

Najprej smo izračunali, kakšna je ponovljivost oz. natančnost znotraj serije. Za določanje ponovljivosti znotraj serije smo uporabili tri različne pool vzorce plazme in tri vzorce polne krvi različnih koncentracij. V enem dnevu, pri istih pogojih smo za vsak vzorec naredili dvajset ponovitev. Koeficient variacije, ki je merilo za nenatančnost metode, se za plazmo giblje med 5,3 % – 5,4 %, medtem ko je pri polni krvi med 2,2 % – 6,1 %. Vrednosti KV so pri vseh vzorcih plazme in polne krvi pod 10 %, kar nam pove, da je natančnost znotraj serije dobra.

Izračunali smo tudi ponovljivost oz. natančnost izven serije. Za določanje ponovljivosti izven serije smo uporabili tri vzorce plazme različnih koncentracij. V dvajsetih dneh, kjer so bili različni pogoji, smo za vsak dan naredili štiri meritve. Pri izračunu koeficienta variacije, ki je merilo za nenatančnost metode, vidimo, da so vrednosti KV od 4,1 % – 5,0 %. Vse vrednosti za KV so nizke, kar nam pove, da je natančnost izven serije dobra.

Pri pridobitvi dodatka v redčenju treh plazma vzorcev z različnimi koncentracijami smo izmerili koncentracijo in izračunali odstotek izkoristka. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da se po dodatku FSH izmerjene vrednosti od teoretičnih razlikujejo v območju $\pm 9\%$.

Linearnost redčenja nam pove, kakšna je linearnost metode. Za preverjanje linearnosti metode smo uporabili vzorec plazme z visoko koncentracijo FSH ter ga po korakih redčili s serumom z nizko koncentracijo FSH (nosečnice). Vzorec plazme smo analizirali trikrat ter izračunali povprečno vrednost, teoretično vrednost ter odstotek izkoristka. Primerjali smo razliko v koncentraciji izmerjene vrednosti od teoretične ter ugotovili, da analizator PATHFAST izmeri vzorce, ki imajo koncentracijo do 200 IU/L. V primeru, da je koncentracija večja od omenjene, je potrebno vzorec redčiti. V grafu 4 je prikazana linearnost redčenja, kje se lepo vidi, do katerega območja so izmerjene vrednosti še linearne.

Med seboj smo primerjali dva matriksa, koncentracijo FSH v heparinizirani plazmi ter heparinizirani polni krvi. Za merjenje smo uporabili 59 vzorcev plazme in 59 vzorcev polne krvi. Izračunani Pearsonov korelacijski koeficient je 0,993 kar nakazuje na zelo močno povezavo med obema matriksoma.

Passing in Bablok regresijska premica ima naklon 1,026 in odsek - 0,333. Intervali zaupanja pri 95 % zanesljivosti so pri odseku od - 1,267 do 0,524 in pri naklonu od 0,997 do 1,052. Iz tega ugotovimo, da sta vrednosti naklona in odseka vključeni, kar pomeni, da sta metodi pri koncentracijskem območju primerljivi, saj med njima ni signifikantnih razlik.

Pri Bland - Altmanovem testu nam graf 6 prikazuje sipanje rezultatov znotraj dovoljenih območij $\pm 1,96$ standardnim odklonom, kjer je 95 % rezultatov meritev. Vidimo, da je povprečje razlik med obema matriksoma - 0,70 UI/L, ki je nizko. To nam pove, da s heparinizirano plazmo dobimo manjše vrednosti kot s heparinizirano polno krvjo. Razpon 95 % intervala zaupanja je tudi nizek (od -13,6 UI/L do 12,3 UI/L). Prav tako opazimo, da so rezultati pri nizkih vrednostih koncentracij manj razpršene, kot pa pri višjih vrednostih koncentracije. Bland - Altmanov test nam prikazuje dobro ujemanje obeh metod oz. matriksov.

6. SKLEP

Analizator PATHFAST je pokazal dobro delovanje v praksi s preprostim rokovanjem z vzorcem.

Dobljeni rezultati nam dajejo naslednje ugotovitve:

- natančnost metode pri ponovljivosti znotraj serije je dobra, saj se rezultati koeficienta variacije v plazmi gibljejo med 5,3 % – 5,4 % in v polni krvi med 2,2 % – 6,1 %,
- natančnost metode pri ponovljivosti zunaj serije je tudi dobra, saj se rezultati koeficienta variacije za vse kontrolne vzorce gibljejo med 4,1 % – 5,0 %,
- točnost metode pri pridobitvi dodatka, nam je pokazala razliko v izmerjenih koncentracijah po količini dodanega FSH v območju ± 9 %,
- analizator PATHFAST nam je pokazal območje linearnosti metode do 200 IU/L,
- korelacija med plazmo in polno krvjo je pokazala zelo močno povezavo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom 0.993 in naklonom 1,026 ter dobro stopnjo ujemanja rezultatov med dvema matriksoma.

Z analiziranjem FSH v plazmi in polni krvi smo dobili primerljive rezultate, kar pomeni, da lahko za hitrejšo in enostavnejšo analiziranje uporabimo tudi polno kri. Vzorca nam tako ni potrebno transportirati v laboratorij, ampak ga lahko analiziramo tik ob pacientu. S tem tudi ni potrebna predhodna obdelava krvi, ker analiziramo polno kri in rezultat analize je tako pridobljen hitreje in to z rezultatom kar zraven pacienta.

Prednost tega, da hitreje pridemo do rezultata omogoči takojšen začetek zdravljenja. Prav tako se zaradi krajšega časa od naročila analize pa do rezultata, skrajša obravnava pacienta v ambulantni.

7. Literatura

- 1.) Prezelj M., Bratož S.,: Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT – Point of Care Testing), Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, Ljubljana, 2014.
- 2.) http://www.orchardsoft.com/files/white_paper_lab_poc_testing.pdf, (dostopano maj 2016)
- 3.) http://www.siedma.si/site/wp-content/uploads/2014/11/Posebna-izdaja-MD_Oct.14.pdf, (dostopano marec 2016)
- 4.) <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:x9DX6bIFFjoJ:www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:doc-F1VISJZG/67fe8b9d-028f-4146-bd49-6b694b287b79/PDF+&cd=1&hl=sl&ct=clnk&gl=si>, (dostopano marec 2016)
- 5.) Chrstopher P., Price, PhD, FRCPath, FACB: Point-of-Care Testing for Managers and Policymakers; From Rapid Testing to Better Outcomes, Washington, DC 2006
- 6.) <http://www.kikkb.si/POCT%20dejavnost%20KIKKB.pdf>, (dostopano februar 2016)
- 7.) <http://www.szum.si/media/uploads/files/urgentna%20medicina%202012.pdf>, (dostopano marec 2016)
- 8.) https://www.revija-vita.com/vita/69/Analiza_opravljen_izven_laboratorija, (dostopano februar 2016)
- 9.) <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:WaD5uKw6QxEJ:supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/1480+&cd=1&hl=sl&ct=clnk&gl=si>, (dostopano marec 2016)
- 10.) Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, Ljubljana, 2008: 16, 298-326.
- 11.) Schauer P, Schauer D, Kalčič D, Milčinski L, Marjanovič L, Musek J: Človeško telo, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1985: 56.
- 12.) Dekleva A, Širca A: Anatomija človeka, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1990: 34.
- 13.) Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D.: Interna medicina, tretja izdaja. Litterapicta, Ljubljana, 2005: 794-797.
- 14.) http://www.dr-flis.si/Kaj_so_hormoni, (dostopano oktober 2015)
- 15.) Kocijančič Andreja: Endokrinologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 37.

- 16.) https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-fsh-alpha-beta-protein_5925-fs, (dostopano november 2015)
- 17.) http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2358-04292015000300002, (dostopano april 2016)
- 18.) <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>, (dostopano oktober 2015)
- 19.) <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:IPtv1aGDu5YJ:https://www.scribd.com/doc/54830129/Imunokemijske-metode+&cd=1&hl=sl&ct=clnk&gl=si>, (dostopano april 2016)
- 20.) http://www2.kclj.si/nuklearna/Slike/RK-SEZ-07_SEZNAM%20REFEREN%C4%8CNIH%20VREDNOSTI%20ver13.pdf (dostopano maj 2016)
- 21.) http://pathfast.propublishing.de/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=70, (dostopano maj 2016)
- 22.) https://www.researchgate.net/figure/274384865_fig3_Fig-3-Mitsubishi-PATHFAST-s-principle-of-operations, (dostopano maj 2016)
- 23.) <http://www2.arnes.si/~mpavle1/mp/stat.html>, (dostopano maj 2016)
- 24.) Marc J.: Navodila in dnevniki za vaje iz klinične biokemije I, tretja dopolnjena izdaja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008:32.
- 25.) <http://www.benstat.si/blog/pearsonov-koeficient-korelacije>, (dostopano junij 2016)
- 26.) http://mi.medri.hr/assets/S4_Korelacija%20i%20regresija.pdf, (dostopano maj 2016)
- 27.) https://www.medcalc.org/manual/passing-bablok_regression.php, (dostopano junij 2016)
- 28.) <https://www.medcalc.org/manual/blandaltman.php>, (dostopano junij 2016)