

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA KAVČIČ (KERT)

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA KAVČIČ (KERT)

PRIMERJAVA AVTOMATIZIRANIH METOD ZA IZVEDBO
PRESEJALNEGA TESTIRANJA ZA DOWNOV SINDROM V DRUGEM
TROMESEČJU NOSEČNOSTI

COMPARISON OF AUTOMATED METHODS FOR EXECUTION OF
SCREENING TEST FOR DOWN SYNDROME IN THE SECOND
TRIMESTER OF PREGNANCY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Aleša Jerina, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.. Praktični del sem izvedla na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, v laboratoriju za analizo hormonov in tumorskih markerjev.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Alešu Jerinu, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za strokovno pomoč in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge ter za uslišanje mojih želja.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na oddelku v laboratoriju za analizo hormonov in tumorskih markerjev, ki so mi vedno priskočili na pomoč.

Hvala tudi mojim najbližjim, ki so mi ves čas stali ob strani in me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izvedla pod mentorstvom doc. dr. Aleša Jerina.

Suzana Kavčič

Vsebine

POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1 UVOD	1
1.1 HORMONI	1
1.2 HORMONI V NOSEČNOSTI.....	1
1.2.1 Placentarni hormoni.....	1
1.2.2 Glavna serumska beljakovina ploda.....	5
1.3 NORMALNA NOSEČNOST.....	5
1.4 PATOLOŠKA NOSEČNOST	6
1.4.1 Kromosomske spremembe	7
1.5 DOWNOV SINDROM (DS).....	8
1.5.1 Vrste Downovega sindroma	8
1.5.2 Značilnosti Downovega sindroma.....	9
1.5.3 Pogostost Downovega sindroma	10
1.6 PRENATALNA DIAGNOSTIKA DOWNOVEGA SINDROMA	10
1.6.1 Neinvazivne metode	10
1.6.2 Invazivne metode.....	13
1.7 IMUNOKEMIJSKE TEHNIKE	14
1.7.1 Primer določanja antigenov s sendvič kemiluminiscenčno metodo.....	15
1.8 VREDNOTENJE IN ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI	15
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 PREISKOVANI VZORCI.....	18
3.2 MATERIAL (testna enota, reagenti, kalibratorji, kontrole).....	18
3.2.1 Določanje hCG	18
3.2.2 Določanje uE3	19

3.2.3	Določanje AFP	19
3.3	PRIPRAVA IN SHRANJEVANJE MATERIALA.....	20
3.4	NOVI ANALIZATOR IMMULITE® 1000.....	20
3.4.1	Razlika med starim in novim analizatorjem IMMULITE®	21
3.4.2	Princip metode.....	21
3.4.3	Postopek na analizatorju.....	22
3.4.4	Kalibracija analizatorja.....	24
3.4.5	Orientacijske referenčne vrednosti	25
3.4.6	Obdelava podatkov	25
4	REZULTATI.....	26
4.1	REZULTATI MERITEV hCG V SERUMSKIH VZORCIH NOSEČNIC IN KONTROLAH.....	26
4.2	REZULTATI MERITEV uE3 V SERUMSKIH VZORCIH NOSEČNIC IN KONTROLAH.....	29
4.3	REZULTATI MERITEV AFP V SERUMSKIH VZORCIH NOSEČNIC IN KONTROLAH.....	32
5	RAZPRAVA	35
6	SKLEP.....	38
7	LITERATURA.....	39

POVZETEK

Presejalni testi v drugem tromesečju nosečnosti so izredno pomembni, saj z njimi lahko pravočasno odkrijemo morebitno tveganje za prirojene nepravilnosti ploda. Tako lahko s pomočjo presejanja starosti, ultrazvočnih meritev nuhalne svetline in nosne kosti ter dvojnega, trojnega ali četvernega hormonskega testa ugotovimo, ali bi plod imel Downov sindrom. V našem primeru smo uporabili trojni hormonski test, s katerim lahko na podlagi ugotovljenih koncentracij človeškega horionskega gonadotropina, alfa-fetoproteina in nekonjugiranega estriola, izračunamo relativno tveganje za Downov sindrom.

Koncentracije teh hormonov smo določali v serumih nosečnic in kontrolnem materialu, z imunokemijsko sendvič – kemiluminiscenčno metodo. Analize smo primerjalno izvedli na starejšem analizatorju IMMULITU[®] in na novem IMMULITU[®] 1000. Za isto metodo na dveh podobnih analizatorjih smo se odločili zato, da novi analizator pripravimo na pravilno delovanje.

Izmerjene koncentracije hormonov smo primerjali statistično in grafično, z linearno regresijo in s korelacijskim koeficientom. Ugotovili smo, da med primerjanimi rezultati ni bilo veliko razlik. Pri meritvah koncentracije človeškega horionskega gonadotropina smo z novim analizatorjem dobili nekoliko višje vrednosti, v primerjavi s starejšim. Vzroki za to bi lahko bili nihanje temperature ali manjše napake pri pipetiranju. Pri meritvah koncentracij nekonjugiranega estriola smo na začetku z novim analizatorjem dobili prevelike razlike rezultatov glede na pričakovane, zato smo prve vzorce zavrgli. Nato smo opravili kalibracijo in meritve izvedli na novih vzorcih. Pri določanju koncentracij alfa-fetoproteina pa smo dobili pričakovano primerljive rezultate z obema analizatorjema.

Po kalibracijah in pravilno izvedenimi ustreznimi kontrolami ter dodatnim testiranjem novih vzorcev smo ugotovili, da novi analizator IMMULITE[®] 1000 zagotavlja s starim primerljive in tudi zanesljive rezultate.

Ključne besede: Downov sindrom, človeški horionski gonadotropin, alfa-fetoprotein, nekonjugiran estriol, analizator IMMULITE[®]

ABSTRACT

It is of vital importance that appropriate screening tests are performed in the second trimester of pregnancy, in order to detect a possible risk of congenital abnormality of fetus in time by combining screenings age, ultrasound measurements of nuchal scan and nasal bones as well as double, triple or quadruple hormone tests can help us determine the presence of Down syndrome in fetus. In our case, we used the triple hormonal test for calculating relative risk for Down syndrome by analyzing concentrations of human chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein and unconjugated estriol.

Concentrations of these hormones were determined in serum samples of pregnant women and in the control material using immunochemical sandwich chemiluminescence method. The analyses were performed on the old IMMULITE[®] and the new IMMULITE[®] 1000 analyzer. And the results obtained were mutually compared. We used the same analytical method on two similar analyzers, to prepare the new one to function properly.

The obtained concentrations of hormones were statistically and graphically compared by analyzing the slopes of lines and the correlation coefficients. We observed that there were not many differences between the results. When comparing the concentrations of human chorionic gonadotropin measured on both analyzers, we noticed that the new one gave slightly higher results than the old one. These minor discrepancies may have appeared due to variations in temperature or minor error in pipetting. The measurements of concentrations of unconjugated estriol with the new analyzer were more different compared to results expected, therefore we did not consider these samples. Therefore it was necessary to perform the calibration and perform re-measurements of new samples to get expected and comparable results. The measurements of serum alpha-fetoprotein were within the expected and comparable results between both analyzers.

After we have correctly carried out the calibration and additional tests of new samples, we found that the new IMMULITE[®] 1000 analyzer provides comparable and reliable results, as compared to the old one.

Key words: Down syndrome, human chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein, unconjugated estriol, analyzer IMMULITE[®]

SEZNAM OKRAJŠAV

AC – amniocenteza

AFP – alfa-fetoprotein

Ag – antigen

CVS – biopsija horionskih resic (ang. Chorionic Villus Sampling)

DHT – dvojni hormonski test

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DS – Downov sindrom

ELISA – encimski imunski test (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FSH – folikle stimulirajoči hormon

hCG – človeški horionski gonadotropin

HDL – lipoprotein z visoko gostoto (ang. High Density Lipoproteins)

KC – kordocenteza

LH – luteinizirajoči hormon

LOD – meja zaznave (ang. Limit Of Detection)

LOQ – meja določljivosti (ang. Limit Of Quantification)

NK – nosna kost

NS – nuhalna svetlina

PAPP-A – nosečniški plazemski protein A

Pt – protitelo

RIA – radio imunski test (ang. Radioimmunoassay)

THT – trojni hormonski test

TS – translokacije

TSH – ščitnico stimulirajoči hormon

uE3 – nekonjugiran estriol

UKC – univerzitetni klinični center

1 UVOD

1.1 HORMONI

Izraz hormon izvira iz grške besede hormao, ki pomeni prebuditi, poganjati, poslati. Nastaja v eni celici nato pa se izloči in potuje po krvi do ciljnega organa. Hormoni so del velikega komunikacijskega sistema v organizmu. Sporočila se namreč v telesu prenašajo na dva načina: po živčnem sistemu, kjer signali potujejo po živcih in po endokrinem sistemu, kjer so njihovi prenašalci topni hormoni. Ti prenašajo informacijo zaradi svojih unikatnih kemičnih struktur, ki jih zaznavajo in vežejo specifični receptorji, izraženi na ali v ciljnih celicah. Na celičnih membranah se hormoni vežejo na svoje receptorje po načelu ključ-ključavnica. Vezava na receptor v celici sproži biokemično reakcijo. Nekateri hormoni (npr. steroidi) pa lahko vstopijo v celice. Tam se vežejo na citoplazemse receptorje ter tvorijo komplekse, ti pa nato prehajajo v celična jedra in aktivirajo DNA (1, 2).

Funkcije hormonov lahko okvirno razdelimo na več kategorij, kot so: razmnoževanje, določanje spola, rast in razvoj, vzdrževanje notranjega okolja ter uravnavanje presnove in oskrbe s hranili. Delimo jih glede na mesto nastanka in načina delovanja ter kemijsko zgradbo (1, 2).

1.2 HORMONI V NOSEČNOSTI

1.2.1 Placentarni hormoni

Placenta se dokončno razvije v tretjem mesecu nosečnosti. Nastane tako iz plodovega kot materinega tkiva in prevzame številne naloge med nosečnostjo. Preko nje se plod preskrbuje s hrano in kisikom, odplavlja pa njegove odpadne snovi. Poleg tega ščiti plod pred škodljivimi mikroorganizmi in tvori ter sprošča hormone, ki vzdržujejo stanje nosečnosti. Hormoni, ki se v tem času pojavijo v izobilju, so človeški horionski gonadotropin, estrogeni, progesteron in človeški horionski somatomotropin (1, 6).

Človeški horionski gonadotropin – hCG

HCG je član družine glikoprotenskih hormonov, med katere sodijo tudi: luteinizirajoči hormon (LH), folikle stimulirajoči hormon (FSH) in ščitnico stimulirajoči hormon (TSH). Njegova struktura je zelo podobna FSH. Zgrajen je iz polipeptidnih verig alfa in beta.

Veriga alfa je enaka tudi v vseh ostalih peptidnih hormonih hipofize. Beta veriga pa se od podenotne verige v LH razlikuje v dodatnih tridesetih aminokislinah na njenem C-terminalnem delu verige (1, 7, 8,).

HCG nastaja v trofoblastu, ki je del placente, v katerem so prekurzorske celice, ki na četrty dan po oploditvi jajčeca diferencirajo v zunanje celice blastociste. Po implantaciji oplojenega jajčeca, hCG kmalu vstopi v krvni obtok, zato ga lahko zaznamo z nosečnostnimi testi. Glavna naloga hCG je spodbujanje rumenega telesca v jajčniku, da v prvih 7 – 9 tednih nosečnosti izloča vse večje količine progesterona in estrogenov, vse dokler posteljica ni dovolj razvita, da prevzame to funkcijo (1, 7).

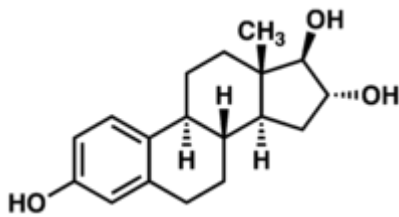
HCG se pojavi v krvi približno 11 dni, v urinu pa približno 12 do 14 dni po spočetju. Njegova vrednost se postopoma povečuje do konca prvega tromesečja. Na splošno se raven hCG podvoji vsakih 48 – 72 ur. Po podatkih iz literature je v prvem mesecu nosečnosti vrednost hCG v krvi približno 2.000 mIU/mL. Najvišjo koncentracijo doseže v tretjem mesecu nosečnosti. Ta znaša 100.000 mIU/mL, nato pa se postopoma zmanjšuje. Po rojstvu otroka njegova koncentracija v krvi hitro upade in v dveh nadaljnjih tednih doseže vrednost < 5 mIU/mL (9).

Spremljanje vrednosti hCG je zelo pomembno diagnostično orodje za oceno vitalnosti zarodka. V primeru, ko je koncentracija hCG nizka ali visoka, jo je potrebno preveriti v roku 48 – 72 ur, da ugotovimo kakšna je stopnja njegovega spreminjanja. Nizka raven tega hormona lahko napreduje v morebiten splav, slabe jajčne celice ali pa zunajmaternično nosečnost. Visoka raven pa lahko pomeni večplodno ali pa molarno nosečnost, ki je posledica genetske napake (1, 9).

Znanstveniki so preučevali ali so meritve hCG v materinem serumu potencialno uporabne za presejalno testiranje prisotnosti Downovega sindroma (DS). Ugotovili so, da njegove visoke ravni v drugem tromesečju, ki so približno dvakrat višje od medianih vrednosti določenih pri nosečnicah z zdravimi otroki, ustrezen kazalnik prisotnosti DS (1).

Estrogeni

Estrogeni so skupaj s progesteronom poglavitni ženski spolni hormon. Trije osnovni estrogeni pri ženskah so estron, estradiol in estriol. Največ med estrogeni je estriola, pri ženskah, ki niso noseče, pa ga je zelo malo (1, 10).



Slika 1: Struktura estriola, ki ima v primerjavi z drugima dvema estrogenoma tri hidroksilne skupine (10).

Estrogeni nastajajo in se izločajo iz jajčnikov, v manjši količini tudi iz skorje nadledvične žleze, med nosečnostjo pa iz placent. Prisotni so tudi v moških modih. Rastoči jajčni folikli, ki se razvijejo v rumeno telesce, proizvajajo vedno večje količine estrogenov, kar sproži ovulacijsko fazo. Ti hormoni imajo torej ključno vlogo v procesu ovulacije in pomagajo pripraviti telo na nosečnost. Sodelujejo tudi v gradnji sluzničnega endometrija (sprememba materničnega vratu in nožnice), pospešujejo izločanje kakovostne rodovitne sluzi materničnega vratu, ki pomaga pri zaščiti in gibanju spermijev skozi rodila ter sprožijo proizvodnjo LH (10, 11).

Estrogeni delujejo preko receptorjev, izraženih v maternici, vagini in prsih, hipotalamusu in hipofizi. Med puberteto povzročajo razvoj spolnih organov in sekundarnih spolnih znakov. Poleg tega, da delujejo na spolni razvoj, pomagajo tudi pri dojenju po nosečnosti in pozitivno vplivajo na strukturo kosti, kože, krvne vrednosti maščob (zmanjšanje tveganja za aterosklerozo, zaradi povečanja koncentracije HDL v plazmi) in metabolizem beljakovin (12).

- ***Nekonjugiran estriol (uE3)***

Večina estriola nastane v tretjem tromesečju nosečnosti. Je skupni proizvod ploda in posteljice. Nastaja pri predhodniških celicah zarodkovih jeter in posteljici. Pri prehodu skozi placentu se hitro presnavlja do konjugiranih oblik (in sicer sulfatov in glukuronidov), predvsem v jetrih matere. Od celotnega estriola je v cirkulaciji predstavlja komaj 9% prost nekonjugiran estriol. V urinu najdemo izključno konjugirani estriol, nekonjugirani pa se nahaja le v krvnem obtoku matere. Med razvojem ploda se povečuje tudi proizvodnja estriola, zato se njegova koncentracija v krvi v zadnjem tromesečju poveča kar trikratno. Skladno s tem se njegova količina ustrezno povečuje tudi v urinarnem traktu. Najvišjo raven doseže v 36. tednu nosečnosti, po 40. tednu pa njegove koncentracije počasi upadajo, in sicer za približno 12% na teden (13).

Koncentracije uE3 se med normalno nosečnostjo povečujejo s približno 4 nmol/L v 15. tednu nosečnosti do približno 40 nmol/L ob porodu. Pri nosečnicah s plodom z DS pa v drugem tromesečju ravni uE3 dosežejo 75% vrednosti, ki jih izmerimo v normalni nosečnosti. Ti podatki temeljijo na raziskavi 77 prizadetih in 385 normalnih nosečnosti (1).

Progesteron

Progesteron je steroidni hormon, ki sodeluje pri ženskem menstruacijskem ciklusu in pri nosečnosti. Spada v skupino hormonov, imenovanih progestogeni, za katere je značilno osnovni skelet z 21 – ogljikovih atomov (14).

Tako kot estrogeni se tudi progesteron tvori v jajčnikih. Na začetku nosečnosti ga v manjših količinah izloča rumeno telesce, v velikih količinah pa posteljica. Malo ga nastaja v nadledvični žlezi tako pri ženskah kot pri moških, pri slednjih pa ga nekaj proizvedejo tudi testisi (1, 15).

V nosečnosti se ob koncu prvega tromesečja začnejo pojavljati velike količine progesterona, kar se nadaljuje vse do otrokovega rojstva. Raven progesterona v nosečnosti je 10 – krat višja kot pri ženskah, ki niso noseče. Hormon povzroči razvoj celic decidue v endometriju maternice, ki jo tako pripravi na implantacijo, spodbuja sproščanje gladkih mišic, predvsem v maternici in prebavnem traktu, preprečuje, da bi prišlo do spontanega splava, pomaga pri razvoju zigote (poveča izločanje v jajcevodih in maternici), priskrbi primerne hranilne snovi za razvoj morule in blastociste ter spodbuja razvoj žlez v dojkah (1, 16).

Z laboratorijskimi preiskavami koncentracije progesterona ugotavljamo ali gre za neplodnost, kaj se dogaja z ovulacijo, kakšna so tveganja za spontani splav, lahko pa na ta način spremljamo tudi delovanje jajčnikov in placente med nosečnostjo (17).

Preglednica I: Pregled hormonov in njihovih funkcij med nosečnostjo (5).

Endokrine žleze	Hormoni	Delovanje
Hipotalamus	Oksitocin	Spodbuja krčenje maternice pri porodu in izločanje mleka pri doječih materah.
Adenohipofiza	FSH	Izzove rast jajčne celice v jajčnem foliklu, poveča izločanje estrogena iz foliklov.
	LH	Vpliva na jajčnike tako, da povzroči ovulacijo; povzroča nastanek rumenega telesca in izločanje progesterona.
	Prolaktin	Pospešuje nastanek mleka v mlečnih žlezah.

Ovariji	Estrogeni	Uravnavaajo razvoj in delovanje spolnih organov, rast maternice v nosečnosti, razvoj in ohranitev sekundarnih spolnih znakov.
	Progesteron	Sodeluje z estrogeni v menstrualnem ciklu in uravnava potek nosečnosti.
Rumeno telesce	Estrogen in progesteron	Je začasna indokrina žleza, njegova funkcija kasneje prevzame posteljica.
Posteljica	hCG, somatomamotropin	Ohranjajo rumeno telesce, prevzamejo njegovo funkcijo ter vzdržujejo nosečnost.
Ščitnica	Tiroksin	Povečana proizvodnja tiroksina je deloma posledica tireotropnega učinka hCG.

1.2.2 Glavna serumska beljakovina ploda

Alfa-fetoprotein (AFP)

AFP je eno verižni glikoprotein z molekulsko maso približno 70.000 daltonov. Nastaja v mešičkih prebavil in v jetrih fetusa. Nahaja se torej v plodovem serumu, njegova koncentracija pa se hitro zmanjša po rojstvu. Prisoten je tudi v plodovnici in materinem serumu, pri čemer pa obstaja koncentracijski gradient, in sicer je raven AFP v plodovem serumu 2.000 kIU/mL, v plodovnici je 20 kIU/mL in v materinem serumu 0,02 kIU/mL. V normalni nosečnosti koncentracija AFP doseže vrh v plodovem serumu v 14. tednu, v plodovnici v 34. tednu, v materinem serumu pa v 28. do 32. tednu nosečnosti. Pojava povišanih koncentracij AFP v serumih odraslih niso opazili le med nosečnostjo, temveč tudi pri nekaterih benignih in malignih boleznih (18).

Potrdili so tudi ugotovitve, ki so nakazovale, da je pri nosečnicah, ki nosijo otroka z DS, raven AFP nižja od medianih vrednosti pri tistih nosečih z zdravimi otroki. Med 14. in 21. tednom imajo nosečnice s plodom z DS, v serumu 72% normalnih vrednosti AFP (1).

1.3 NORMALNA NOSEČNOST

Nosečnost (gravidnost ali gestacija) je fiziološko obdobje nosečnice, vse od oplojene jajčne celice do poroda, ki traja približno 9 mesecev in ga delimo na tri tromesečja (5, 6).

Po oploditvi, to je po združitvi semenčice in jajčeca, nastane diploidni celični spojek (hibrid), ki se začne deliti. Kmalu nastane morula, ki vstopi v maternico in se še naprej deli, tako da nastane mehurčasta tvorba, napolnjena s tekočino, ki jo imenujemo blastocista. Ta se ugnezdi v maternično sluznico. Iz zunanje plasti blastociste nastane

zunanja zarodkova ovojnica, iz celic v notranjosti pa se razvije zarodek. Od 8. tedna dalje imenujemo nerojenega otroka, ki se razvija znotraj maternice, plod (fetus). Ta se prehranjuje, diha in izloča odpadne snovi preko posteljice, ki se dokončno razvije v 12. tednu in nato raste skupaj s plodom. Pomembna vloga posteljice je tudi izločanje hormonov. Pri starosti enega meseca v zarodku nastajajo mišice in žile. Med 3. in 4. tednom nosečnosti začne utripati srce, vidna pa so tudi pljuča in jetra. V 2. mesecu se oblikujejo glavni organski sistemi pa tudi brstiči za okončine. V 8. tednu se v plodu aktivirajo spolni kromosomi, ki definirajo njegov spol. V 2. tromesečju plod precej zraste. Tvoriti se začnejo deli okostja. V zadnjem tromesečju plod še bolj zraste in dokončno se izoblikujeta obtočilni in dihalni sistem (6).

1.4 PATOLOŠKA NOSEČNOST

O patološki nosečnosti govorimo, kadar pri nosečnici ali njenemu plodu obstaja tveganje za zdravje ali za življenje ogrožajočo situacijo. Stopnja tveganja je odvisna od narave patološke nosečnosti (19).

Patološka stanja so lahko posledica naslednjih dejavnikov:

- Nenormalnosti, ki se prenašajo z dedovanjem starševskih genov. To so dedne bolezni, prisotne že ob rojstvu. Lahko so posledica napak v dedovanju ali pa nepravilnosti v razvoju embrija. Pri prirojenih napakah, ki se prenašajo genetsko, je lahko vzrok npr. nepravilna struktura ali število kromosomov (DS, TS).
- Napake v razvoju ploda v času organogeneze (dismorfogeneza). Sem prištevamo vse razvojne anomalije, ki nastanejo v času embriogeneze v prvih 10. do 12. tednih in niso dedne, npr. kongenitalni hidrocefalus, kongenitalna katarakta. Lahko jih izzovejo različni virusi, rentgenski žarki, nekatera zdravila, atomsko žarčenje, kronične zastrupitve.
- Poškodbe ploda, ki nastanejo po 3. mesecu nosečnosti. To so različne deformacije, ki so posledica vplivov kužnih in toksičnih dejavnikov na plod. Do deformacij ploda lahko pride tudi zaradi pomanjkanja prostora v maternici. Sem prištevamo tudi posledico okužb, ki prizadenejo plod po 5. mesecu nosečnosti (1).

1.4.1 Kromosomske spremembe

Vsak človek ima v celičnem jedru 46 kromosomov, ki so zbrani v 23 parih. Dvainsajset parov homolognih kromosomov imenujemo avtosomi, 23. par pa predstavljata spolna kromosoma, ki sta heterosoma. Avtosomne kromosome ločimo po položaju centromera, glede na velikost in vzorce prog, ki se pojavijo po barvanju s posebnimi metodami. Kromosomske spremembe oz. mutacije, delimo glede na nepravilnosti v številu kromosomov in v njihovi zgradbi (20, 21).

Nepravilnosti v številu kromosomov

Temeljno število kromosomov v vrsti je haploidno in ga označujemo z n . Dve garnituri genov z istimi lastnostmi pa dajeta dvojno ali diploidno število kromosomov – $2n$. Kromosomska števila, ki so drugačna od normalnega, imenujemo heteroidna (20). Med to vrstne nepravilnosti sodijo:

- **Evplodija** – kromosomska števila, ki so mnogokratniki haploidnega števila (nap. kot triploidno ($3n$) ali tetraploidno ($4n$)).
- **Anevplodija** – število kromosomov se poveča ali zmanjša za enega ali dva kromosoma (npr. monosomija ($2n - 1$), trisomija ($2n + 1$)).
- **Mozaicizem** – posamezne celice imajo različno število ali zgradbo kromosomov; pogosto gre za numerične razlike, ki izvirajo iz nerazdvajanja v mitozii.
- **Himerizem** – celični populaciji, ki izvirata iz različnih zigot (20).

Nepravilnosti v zgradbi kromosomov

Pojavijo se zaradi prečnega preloma enega ali več kromosomov, čemur sledi ponovno združenje pretrganih koncev, pri tem pa se poškoduje linearno zaporedje dedne snovi (20). Med to vrstne nepravilnosti sodijo:

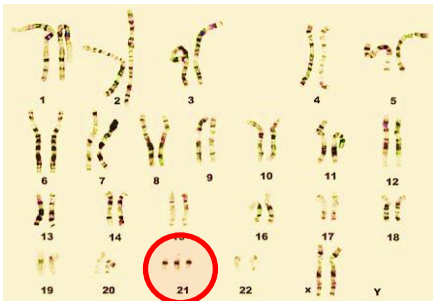
- **Delecije** – izguba dela kromosoma, ki je lahko končni ali vmesni segment.
- **Obročasti kromosomi** – delecija obeh končnih delov kromosoma in združitev pretrganih koncev v obroč s centromerom.
- **Inverzije** – zamenjava smeri segmenta, ne da bi pri tem prišlo do njegove izgube. Nastanejo z dvema prelomoma, ki sta lahko na isti ali na nasprotnih straneh centromera. Del kromosoma se med prelomom obrne in nato ponovno spoji z drugim pretrganim koncem.

- **Izokromosomi** – to so metacentrični kromosomi, v katerih sta oba kraka strukturno in genetsko identična. Nastanejo zaradi prečne cepitve centromera in ponovne združitve sestrskih kromatid.
- **Translokacije** – zamenjave segmenta med dvema ali več kromosomi.
- **Duplikacija** – podvajanja dela kromosoma (20, 21).

1.5 DOWNOV SINDROM (DS)

DS je najpogostejša kromosomska napaka pri rojenih otrocih, ki lahko preživijo. Leta 1866 je to bolezen prvi opisal britanski zdravnik John Langdon Down. Zaradi pacientovega videza, predvsem oblike oči in mentalne zaostalosti, je stanje poimenoval mongolizem. Čeprav je zapisal nekaj pomembnih stvari o Downovem sindromu, pa v tistem času ni mogel opredeliti, kaj povzroča to motnjo. Šele leta 1959 so znanstveniki odkrili njen genski izvor (22, 23, 24).

O trisomiji 21 oziroma o DS govorimo, kadar imajo nekatere ali vse celice prizadete osebe dodatno popolno ali delno kopijo kromosoma 21 (22).



Slika 2: Dodatni 21 kromosom pri Downovem sindromu (25).

1.5.1 Vrste Downovega sindroma

Prosta trisomija 21

Nastane takrat, ko je dodatni kromosom 21 prisoten v spermiju, jajčecu, ali med prvo delitvijo zigote. V teh primerih bo verjetno vsaka nova nastala celica trisomična, saj bo imela 47 kromosomov, od katerih bodo trije enaki. Prosta trisomija 21 je v 94% primerov vzrok za DS (22, 25).

Mozaična trisomija 21

Značilna je za osebe, ki imajo v telesu sočasno normalne in trisomične celice. Trisomične celice lahko nastanejo, ko se 21. kromosomski par med delitvijo ne loči, oziroma če se dodatni kromosom v trisomičnem jajčecu ne izgubi med eno od kasnejših celičnih delitev. Trisomične celice so lahko prisotne samo v nekaterih delih telesa. Osebe z mozaično trisomijo naj bi se razlikovale od drugih genetskih tipov DS, vendar pa gre zgolj za teoretično sklepanje, saj na ravni posameznika ne moremo trditi, da bo zaradi tega otrok manj prizadet. Mozaična trisomija 21 je zelo redka, saj se pojavlja se le v 2% oseb z DS (22, 25).

Translokacijska trisomija 21

V tem primeru se del dodatnega kromosoma 21 prilepi na drug kromosom. Ker kromosom spremeni lokacijo, to imenujemo translokacija. Najpogosteje se dodatni kromosom prilepi na 14., lahko tudi na 13. in 15., redkeje pa na 21. ali 22. kromosom. Tako nastane kromosomski par, ki ni običajne velikosti. Dodatni genetski material 21. kromosoma lahko spremeni rast in razvoj ploda ter povzroči značilnosti DS. V primeru katere koli translokacije imata lahko starša otroka z normalnim številom kromosomov, otroka, ki bo umsko in telesno zdrav, vendar pa bo prenašalec, ali pa otroka z DS. Lahko pa se tudi zgodi, da bo oplojeno jajčece brez enega kromosoma in zato ne bo preživelo. Ta vrsta DS se pojavlja v 4% primerov (22, 25).

1.5.2 Značilnosti Downovega sindroma

Prav tako kot so si normalni otroci med seboj različni, se tudi tisti z DS med seboj zelo razlikujejo. Nekateri so bolj visoki in suhi, drugi pa majhni in čokati. Nekateri imajo več, drugi pa manj umskih sposobnosti in razvijejo vsak svojo osebnost. Ker imajo vsi otroci z DS v celicah dodatni genski material, so si podobni v telesnih in umskih značilnosti, nekoliko pa tudi po zunanosti (22, 26).

Skoraj polovica prizadetih oseb z DS ima srčno napako. Dihanje skozi usta je oteženo, saj so pri večini tonzili in žrelnica precej veliki. Zaradi ohlapnih mišic so usta velikokrat odprta in iz njih visi jezik. Osebe z DS se počasneje odzivajo, saj sporočila skozi živčne poti potujejo z zamudo. Mnogi med njimi imajo tudi črevesne težave, zato težko jedo, poleg tega pa imajo povečano tveganje za zaporo dvanajstnika. Nekateri imajo težave s

ščitnico, z vidom in naglušnostjo. Kasneje v življenju obstaja pri njih tudi večje tveganje za nastanek levkemije in Alzheimerjeve bolezni (22, 24, 26).

1.5.3 Pogostost Downovega sindroma

DS naključno prizadene enega na približno 800 novorojenčkov. Seveda pa za pogostost obstajajo različni podatki, navedeni v številnih opravljenih raziskavah. Novejše študije, ki so jih izvedli v razvitejših državah, v katerih beležijo velik upad rojstev pri starejših materah, so ugotovile nižji odstotek pojavnosti, in sicer 1 / 1.000 rojstev. Večina otrok z DS se danes rodi mlajšim nosečnicam, saj te pogosteje rojevajo kot starejše. V obdobju 1987 – 95 se je v Sloveniji 80% otrok z DS rodilo materam, mlajšim od 37 let. V različnih študijah zasledimo približno enake podatke. V izsledkih vseh raziskav pa se strinjajo, da se stopnja za tveganje najbolj poveča med 35. in 40. letom materine starosti (1, 22, 26).

Preglednica II: Starost mater in pogostost novorojencev z Downovim sindromom, glede na število vseh rojenih otrok (22).

Starost matere	Število otrok z DS / število rojenih
< 20 let	< 1 / 2.000
20 – 30 let	< 1 / 1.500
30 – 34 let	približno 1 / 750 – 880
35 – 40 let	približno 1 / 280 – 290
40 – 44 let	približno 1 / 130 – 150
> 45 let	približno 1 / 20 – 65

1.6 PRENATALNA DIAGNOSTIKA DOWNOVEGA SINDROMA

Prenatalna diagnostika zajema preiskave embria ali ploda za ugotovitev morebitnih nepravilnosti. Govorimo o posredni in neposredni genetski preiskavi. Uporabljajo se neinvazivne (analize različnih bioloških označevalcev v materini krvi in ultrazvok) in invazivne metode (amniocenteza, biopsija horionskih resic, kordocenteza) (27).

1.6.1 Neinvazivne metode

Presejalni test je »načrtna uporaba testa ali vprašalnika z namenom, da bi našli osebe, ki sicer niso same iskale pomoči zavoljo znakov določene bolezni, s tako visokim tveganjem, da jim bodo dodatni testi ali neposredno preventivno delovanje pomagali«; citirano iz (28).

Presejanje na podlagi starosti

Je najstarejši način presejanja za odkrivanje DS in drugih kromosomskih nepravilnosti. Nosečnice nad določeno starostno mejo uvrstimo v skupino s povečanim tveganjem in jim ponudimo ustrezne diagnostične preiskave. Med 20-letnimi nosečnicami ima otroka z DS le 1 od 1.440, med 35-letnimi pa že 1 od 338. Če upoštevamo samo starost žensk, lahko odkrijemo 30% plodov z DS (8, 32).

Presejanje na osnovi ultrazvočne meritve nuhalne svetline

Med 12. in 14. tednom nosečnosti lahko z ultrazvočnim merjenjem nuhalne svetline ugotovimo, ali obstaja povečano tveganje, da se bo rodil otrok s kromosomsko napako. Izmeri se širino špranje pod kožo na plodovem zatilju. V tem obdobju je nuhalna svetlina v 80% primerov, ko ima plod kromosomsko napako povečana. Pri izračunu tveganja nato upoštevamo še starost nosečnice, trajanje nosečnosti, oceno prisotnosti nosne kosti ter morebitna prejšnja rojstva otrok s kromosomsko nepravilnostjo, ob ultrazvočno izmerjeni razdalji teme-trtica pri plodu. V primerih, ko je tveganje večje od 1 : 300, svetujemo pregled plodovih celic (29, 30).

Presejanje na osnovi ultrazvočnega pregleda nosne kosti

Pri natančnem opazovanju plodov, pri katerih so s kariotipizacijo ugotovili kromosomske napake, so raziskovalci na King's College-u opazili, da nosna kost med 11. in 14. tednom večinoma še ni vidna. S sistematičnim opazovanjem zdravih in kromosomsko okvarjenih plodov v multicentrični raziskavi so nato potrdili, da je NK v omenjenem obdobju odsotna pri 73% plodov z DS, v primerjavi z 0,5% zdravih. Tako lahko izračunamo, da je pri plodu, pri katerem vidimo NK v času presejanja na DS torej med 11. in 14. tednom nosečnosti, tveganje za to kromosomsko motnjo vsaj 3,6-krat manjše. V kolikor pa jo med pregledom ne opazimo, pa je tveganje za prisotnost DS 146-krat večje od tistega, ki ga izračunamo pred tem (29).

Dvojni hormonski test (DHT)

V načelu je DHT v 1. tromesečju podoben trojnemu (THT), ki ga izvedemo v 2. tromesečju, le da je prilagojen pojavljanju hormonov v tem obdobju. DHT svetujemo med 9. in 10. tednom nosečnosti. Nosečnici odvzamemo 5 ml krvi za določitev hCG in nosečniškega plazemskega proteina A (PAPP-A). Prvi je pri nosečnicah, ki nosijo plod z DS, povišan, drugi pa znižan. Ker so vrednosti obeh hormonov neodvisne od prej omenjenih ultrazvočnih označevalcev (NS in NK), jih lahko kombiniramo med seboj (29, 31, 33).

Trojni hormonski test (THT)

To je presejalni test, ki ga lahko izvedemo med 15. in 20. tednom nosečnosti in s katerim določimo koncentracije treh parametrov, ki nam nato služijo za izračun relativnega tveganja za DS. V serumskih vzorcih nosečnic s tem testom določamo vrednosti AFP, hCG in uE3. Vrednosti hCG so v povprečju višje, vrednosti AFP in uE3 pa nižje. Pri izračunu tveganja upoštevamo tudi starost nosečnic in velikost ploda. Test je pozitiven, če je tveganje večje od 1 : 190. Med nosečnicami s pozitivnim testom so le 3% takih, pri katerih s pregledom celic ploda in karyotipizacijo dejansko potrdimo sum na kromosomsko okvaro ploda. THT ni uporaben pri večplodni nosečnosti in pri tistih nosečnicah, ki se zdravijo z inzulinom (8, 29, 31).

Četverni hormonski test

Gre za presejalni test, pri katerem na podlagi določitve koncentracij štirih označevalcev, AFP, hCG, uE3 in inhibina A v krvi, izračunamo tveganje za DS. Opravimo ga med 14. in 20. tednom nosečnosti. Pri tveganju večjem od 1 : 190 svetujemo karyotipizacijo (32, 33).

Kombinacije presejalnih testov

Strokovne literature, ki obravnavajo presejanje za DS, je zelo veliko. V njej so objavljeni rezultati raziskav številnih kombinacij posameznih presejalnih testov in testov, ki upoštevajo več označevalcev v 1. in 2. tromesečju, različnih ultrazvočnih preiskav in integriranega pristopa, ki vključuje presejalne preiskave v omenjenem obdobju nosečnosti. V Sloveniji izvajamo meritve nuhalne svetline, nosne kosti, dvojni, trojni, četverni test in kombinirano preiskavo. Raziskave presejalnih testov se pogosto razlikujejo v občutljivosti

in odstotkih lažno pozitivnih rezultatov, zato moramo to upoštevati pri načrtovanju preiskovalnih metod, ki jih bomo uporabili za presejanje v posamezni populaciji (32).

Rezultati presejalnih testov temeljijo na kombiniranju rezultatov več preiskav. Z njimi lahko odkrijemo od 85 do 89% plodov z DS, medtem ko je delež lažno pozitivnih rezultatov 5% (32).

1.6.2 Invazivne metode

Kadar s pomočjo prej navedenih preiskav ugotovimo, da bi lahko šlo za DS, ponudimo nosečnicam nadaljnje diagnostične preiskave. Zanesljiva predporodna diagnoza DS je v sedanjem času možna le na osnovi kulture plodovih celic, do katerih pa lahko pridemo le z invazivnimi metodami, kot so CVS, AC ali KC. Vse tri predstavljajo tveganje za splav. Ta je manjši, kadar poseg izvaja izkušen izvajalec (32).

Vzorčenje oz. biopsija horionskih resic (CVS – chorionic villus sampling)

Pri tej preiskavi odvzamemo majhno količino horionskih resic, ki so del razvijajoče se posteljice in z njimi izvedemo analizo otrokovih kromosomov ali genov. CVS ponavadi naredimo med 11. in 14. tednom nosečnosti. Odvzamemo približno 20 mg vzorca iz razvijajoče se posteljice, ki ima seveda enake gene kot plod. Odvzamemo ga s tanko iglo, ki jo izvajalec posega potisne preko materinega trebuha v posteljico. Pri tem se lahko zgodi, da pri 1 od 100 nosečnic pride do splava, pri čemer pa vzroka zanj ne poznamo natančno (1, 21, 34).

Amniocenteza (AC)

To je poseg, pri katerem z iglo vstopimo preko trebuha matere v maternico in aspiriramo 15 – 20 ml amnijske tekočine, ki obdaja plod. Plodove celice v tekočini nato gojimo in izvedemo presajalni preskus na prisotnost genskih napak. AC navadno izvedemo med 15. in 17. tednom nosečnosti. Možnost za spontani splav se zaradi AC poveča za približno 0,5 do 1%, saj je količina plodne vode po 15. tednu večja (2, 6, 21).

Kordocenteza (KC)

KC je podobna preiskava kot AC, le da v tem primeru izvedemo punkcijo popkovnične vene. S pomočjo ultrazvočnega vodenja iz popkovnice vzamemo približno 5ml krvi,

navadno po 24. tednu nosečnosti. Poseg izvedemo le v primerih, ko gre za vprašanje, ali je med nosečnostjo prišlo do fetalne okužbe, imunskih bolezni ali hemoglobinopatij. Za detekcijo dednih bolezni jo izvajamo samo, če ne uspe opraviti AC. Pri 1 do 2% vseh punkcij lahko pride do prezgodnjega poroda, krvavitev, okužb, ali spontanega splava (21, 35).

1.7 IMUNOKEMIJSKE TEHNIKE

To so instrumentalne tehnike, ki jih uporabljamo v biomedicinskih laboratorijih. Zanje sta značilni visoka specifičnost in občutljivost. So široko uporabne, npr. za dokazovanje prisotnosti in količine zdravil, hormonov, tumorskih označevalcev, izoencimov, protiteles, antigenov, itd., v telesnih tekočinah. Temeljijo na reakciji med protitelesom (Pt) in antigenom (Ag), pri čemer pride do biomolekularne vezave in s tem do nastanka kompleksa Ag-Pt (1, 36).

Značilnosti imunokemijskih metod temeljijo na treh pomembnih lastnostih protiteles, in sicer:

- Pt vežejo izjemno veliko število naravnih in sinteznih snovi, biomolekul, celic in virusov;
- Pt se vežejo samo na specifične snovi, kar omogoča določanje nizkih koncentracij analitov tudi v prisotnosti sorodnih snovi;
- Pt in Ag se povežeta z močno vezjo, ki je seštev ek energij vodikovih in ionskih vezi, hidrofobnih interakcij, ter van der Waalsovih sil, kar omogoča nastanek in obstoj kompleksa (37, 38).

Teste imunskega določanja izvajamo v tekoči ali na trdi fazi, delimo pa jih na kompetitivne in nekompetitivne. Kompetitivni temeljijo na tekmovanju med vezavo protiteles na: določeno znano količino označenega antigena in neznano količino neoznačenega antigena v vzorcu. Isti princip velja tudi za določanje antigena z označenimi in neoznačenimi protitelesi, prisotnimi v vzorcu. Pri nekompetitivnih testih pa imamo samo eno komponento, npr. označeno protitelo, ki je v prebitku in specifično reagira z antigenom iz vzorca. Imunokemijske teste delimo tudi na heterogene in homogene. Pri heterogenih moramo pred meritvijo ločiti vezano označeno protitelo od nevezanega s pomočjo centrifugiranja ali spiranja, sicer bi pri meritvah dobili vedno enak signal, ne glede na

koncentracijo prisotnega analita. Pri homogenih testih pa tovrstna ločba ni potrebna, saj je signal pri meritvi odvisen le od razmerja vezanega označevalca in analita (1, 37).

Na voljo imamo več vrst imunokemijskih metod. Imenujemo jih npr. lahko glede na uporabljeni detekcijski sistem. Glede na označevalec, ki je lahko izotop, encim, fluorokrom ali kakšna druga snov, ki omogoča nastanek merljivega signala s kemično reakcijo. Najbolj znani metodi sta ELISA, pri kateri za tvorbo signala uporabimo encim in RIA, kjer v ta namen uporabimo radioaktivni izotop (1, 37).

1.7.1 Primer določanja antigenov s sendvič kemiluminiscenčno metodo

Najprej se Ag iz vzorca veže na specifična primarna Pt, ki so vezana na trdni nosilec. Nevezan Ag speremo s pufrom, nato pa dodamo sekundarna Pt, na katera vezan encim. Ta tvori sendvič-kompleks s primarnim kompleksom Pt-Ag. Nevezano sekundarno telo speremo s pufrom in dodamo kemiluminiscenčni substrat za encim, nato pa spektrofotometrično izmerimo nastali signal, ki je obratno sorazmeren koncentraciji antigena.

1.8 VREDNOTENJE IN ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

Pri vrednotenju analizne metode moramo upoštevati naslednje analitske spremenljivke:

Meja zaznave (LOD) – to je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, ne pa tudi kvantificiramo. Ta parameter uporabljamo za validacijo metod (39, 40).

Meja določljivosti (LOO) – to je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki ga lahko količinsko opredelimo z ustrežno natančnostjo in točnostjo (39, 40).

Analitska specifičnost – je zmožnost analitske metode, da določimo le željen analit v mešanici različnih snovi oz. potencialno motečih substanc ali dejavnikov v matrici vzorca, pri čemer seveda analit ne sme reagirati z njim. Test je analitsko specifičen, ko zazna izključno prisotnost specifičnih Pt ali specifičnega Ag (39).

Točnost ali pravilnost – opredeljena je kot stopnja med povprečno vrednostjo, ki jo izračunamo iz velike serije rezultatov in pravo oz. dejansko vrednostjo. Povezana je s sistemskimi napakami. Z njo opredeljujemo pravilnost rezultatov in je odvisna od izbrane

metode, uporabljenih aparatov, pipet, reagentov, standardov. Preverjamo jo z izračunavanjem relativne in absolutne napake (39, 40).

Natančnost ali ponovljivost – to je merilo za razlike v razpršenosti rezultatov. Opredelimo jo s ponovljivostjo rezultatov med serijami ali znotraj serije. Izražamo jo z vrednostmi standardnih deviacij, varianc in koeficientov variacije (40).

Linearnost metode – gre za razmerje oz. povezanost med izmerjenimi in pričakovanimi vrednostmi v okviru razponu analitskih meritev (39).

2 NAMEN DELA

Človeški horionski gonadotropin (hCG), nekonjugiran estriol (uE3) in alfa-fetoprotein (AFP) so pomembni biološki dejavniki, ki jih preiskujemo s presejalnimi testi za odkrivanje Downovega sindroma in drugih nepravilnosti pri plodu, in sicer med 15. in 20. tednom nosečnosti. Poleg določanja koncentracij teh treh parametrov, pri preiskavi na prisotnost DS pri plodu, upoštevamo tudi starost nosečnice, velikost ploda in nuhalno svetlino.

Namen diplomske naloge je priprava novega analizatorja IMMULITE[®] 1000 na pravilno delovanje. V ta namen bomo med seboj primerjali rezultate določanja hCG, uE3 in AFP. Z enako imunokemijsko metodo, vzporedno izvedeno na starem in novem analizatorju IMMULITE[®]. Za primerjavo bomo uporabili kontrolne vzorce in serume naključno izbranih nosečnic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANI VZORCI

Vzorčili smo po 5 mL venske krvi nosečnic. Vse vzorce so odvzeli in analizirali na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v UKC Ljubljana. V raziskavo smo vključili 28, kasneje pa še dodatnih 16 naključno izbranih nosečnic.

V laboratorij smo dobili že centrifugiran serum, v katerem smo nato določali koncentracijo hCG, uE3 in AFP.

3.2 MATERIAL (testna enota, reagenti, kalibratorji, kontrole)

3.2.1 Določanje hCG

Za določanje serumskih koncentracij hCG smo uporabili naslednje sestavine reagenčnega kompleta Siemens:

- testno enoto, ki vsebuje mikrokglico prevlečeno z mišjimi monoklonskimi primarnimi protitelesi proti hCG (LCG1);
- reagent (7,5 ml), ki vsebuje alkalno fosfatazo (iz telečjega črevesja), zmešano z ovčjimi poliklonskimi sekundarnimi protitelesi proti hCG v pufru s konzervansom (LCG2);
- dva kalibratorja z nizko in visoko koncentracijo hCG (po 2ml), brez človeškega serumskega matriksa s konzervansom (LCGL – low, LCGH – high);
- razredčilo, ki vsebuje hCG brez človeške serumske matrice (LCGW);
- tristopenjske kontrole (CON6);
- kemiluminiscenčni substrat (LSUBX);
- destilirano ali deionizirano vodo.

3.2.2 Določanje uE3

Za določanje serumskih koncentracij uE3 smo uporabili naslednje sestavine reagenčnega kompleta Siemens:

- testno enoto, ki vsebuje mikrokroglico, prevlečeno s kunčjimi poliklonskimi primarnimi protitelesi proti estriolu (LUE31);
- reagent (7,5 mL), ki vsebuje alkalno fosfatazo (iz telečjega črevesja), zmešana s sekundarnimi protitelesi proti estriolu v pufu (LUE32);
- dva kalibratorja z nizko in visoko koncentracijo nekonjugiranega estriola (po 4 ml), pridobljenega iz predelanega človeškega serumskega matriksa, s določenim konzervansom (LUE3L – low, LUE3H – high);
- tristopenjske kontrole, sestavljene iz več sestavin (Lypocheck) in kontrolni material proizveden iz serumov mater (Bio-Rad);
- kemiluminiscenčni substrat (LSUBX);
- destilirano ali deionizirano vodo.

3.2.3 Določanje AFP

Za določanje serumskih koncentracij AFP smo uporabili naslednje sestavine reagenčnega kompleta Siemens:

- testno enoto, ki vsebuje mikrokroglico, prevlečeno z mišjimi monoklonskimi primarnimi protitelesi proti AFP (LAP1);
- reagent (7,5 ml), ki vsebuje pufer brez človeškega serumskega matriksa (LAPA);
- reagent (7,5 ml), ki vsebuje alkalno fosfatazo (iz telečjega črevesja), zmešana z zajčjimi poliklonskimi sekundarnimi protitelesi proti AFP v pufu (LAPB);
- dva kalibratorja z nizko in visoko koncentracijo AFP (po 2 ml), pridobljenega iz serumskega matriksa govedi (LAPL – low, LAPH – high);
- raztopino za ročno redčenje visokih koncentracij AFP v serumskih vzorcih, ki ne vsebuje govejega serumskega matriksa s konzervansom (LAPZ);
- tristopenjske kontrole (TMCO);
- kemiluminiscenčni substrat (LSUBX);
- destilirano ali deionizirano vodo.

3.3 PRIPRAVA IN SHRANJEVANJE MATERIALA

Testne enote smo shranjevali na hladnem pri 2 – 8 °C, zato smo jih morali pred uporabo ogreti na sobno temperaturo. Pri uporabi testnih enot smo nosili rokavice in jih prijimali višje, ne spodaj, kjer je reagenčna kroglica, ker se tam odčita rezultat. Prstni odtisi bi namreč lahko vplivali na končni rezultat. Tudi vse ostale reagente smo hranili na hladnem, pri 2 – 8 °C, zato smo jih pred uporabo prav tako ogreli na sobno temperaturo. Kot konzervans vsebujejo reagenti natrijev azid, zato moramo vse, kar je bilo v stiku z njim obilno sprati z vodo. Uporabni so do datuma izteka oziroma trideset dni po odprtju. Kontole in kalibratorje shranjujemo na hladnem (2 – 8 °C), po odprtju pa so uporabni približno 30 dni. Pred uporabo smo tudi njih ogreli na sobno temperaturo. V vseh primerih smo uporabili tristopenjske kontrole, ki smo jih odpipetirali v kivetke, ki smo jih nato postavili v testno posodico s kodo. Nekatere je bilo potrebno predhodno razredčiti. Kontrole za določanje hCG je redčil sam analizator, z uporabo programa IMMULITE® 1000 Windows. Tudi vse raztopine za redčenje smo hranili na hladnem (2 – 8 °C), do roka uporabe.

3.4 NOVI ANALIZATOR IMMULITE® 1000

IMMULITE® 1000 je avtomatiziran imunski analizator, ki omogoča kemiluminiscenčno imunsko analizo. Povezan je z računalnikom in je zelo preprost za uporabo, je zanesljiv, ima razširjen meni in seznam za visoko funkcijsko delovanje. Z njim lahko opravimo do 120 testov na uro. Lahko se uporabi v načinu hitrega testa, pri čemer dobimo prvi rezultat po 15 minutah, vsakega naslednjega pa v nadaljnjih 45 sekundah. Na njem lahko izvajamo hitre teste za določanje srčnožilnih bioloških označevalcev, testiranja na prisotnost nalezljivih bolezni reproduktivne endokrinologije, preverjanje delovanja ščitnice, ugotavljanja slabokrvnosti, sladkorne bolezni, določanja tumorskih označevalcev, ugotavljanje prisotnosti drog in alergij.

3.4.1 Razlika med starim in novim analizatorjem IMMULITE®

V primerjavi gre pravzaprav za enak analizator. Novi ima le novejšo ohišje ter integriran računalnik z zaslonom na dotik, ki je uporabniku bolj prijazen.



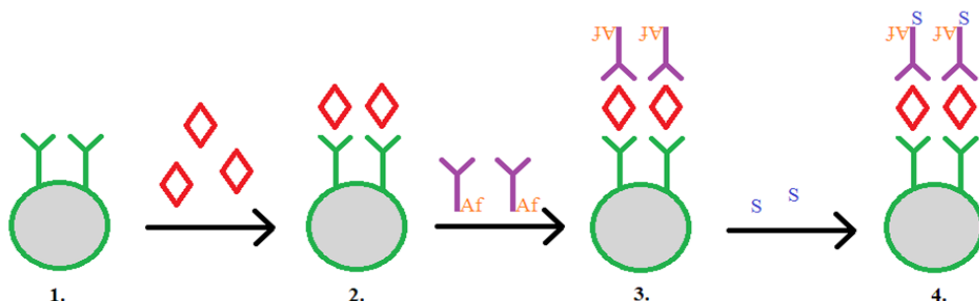
Slika 3: Analizator IMMULITE® 1000 (41).



Slika 4: Analizator IMMULITE® (42).

3.4.2 Princip metode

Princip imunski reakciji temelji med antigenom in specifičnim protitelesom. Metoda, ki smo jo izvajali je imunokemijska sendvič kemiluminiscenčna metoda. Reakcija poteka v testni posodici, v kateri je trden nosilec (kroglica), prekrit s primarnimi protitelesi, na katere se med inkubacijo veže antigen iz vzorca. Po vezavi antigena dodamo reagent s sekundarnimi protitelesi, ki so konjugirana z alkalno fosfatazo. Ta se vežejo na antigen. Nevezane komponente pa iz testne enote odstranimo s centrifugiranjem. V zadnji fazi testa dodamo kemiluminiscenčni substrat, ki ga alkalna fosfataza razgradi. Pri tem nastane svetloba, ki jo dajejo produkti kemijske reakcije pri vračanju iz vzbujenega v osnovno stanje. Končni signal torej detektiramo kemiluminiscenčno, kar pomeni, da merimo količino oddane svetlobe (fotonov).



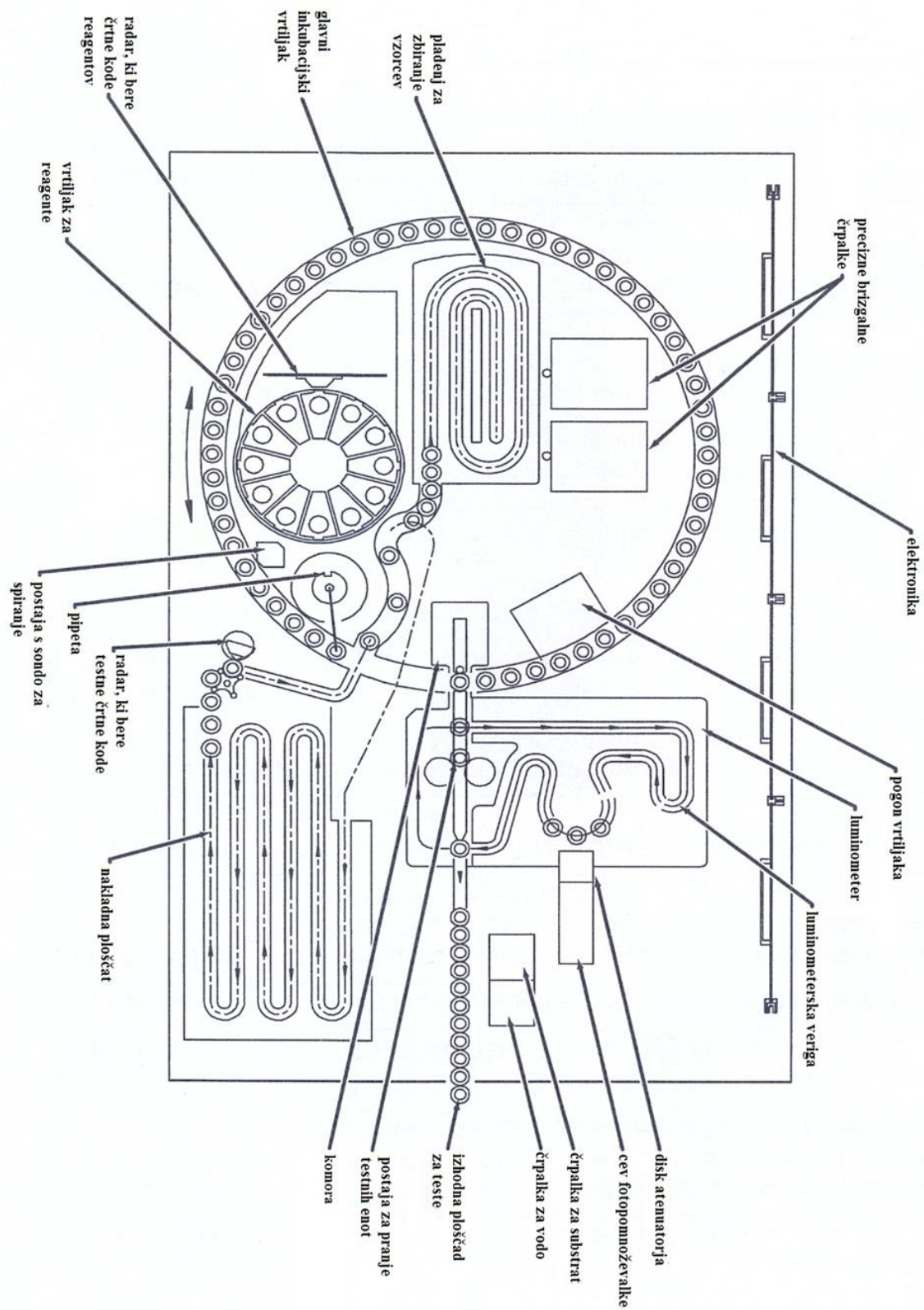
Slika 5: Imunokemijska sendvič kemiluminiscenčna metoda: 1 - kroglica s primarnimi protitelesi (Pt), 2 – antigen vezan na primarna Pt, 3 - sekundarna protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo vezana na kompleks Ag – Pt, 4 – po dodatku substrata, pride do emisije fotonov.

3.4.3 Postopek na analizatorju

Prižgali smo analizator IMMULITE® 1000 in računalnik, s katerim je povezan. Na ekranu računalnika smo pritisnili na ikono »Run IMMULITE«, s katero naložimo program za upravljanje analizatorja. Nato smo na analizatorju pritisnili tipko GO. Poleg te tipke je prikazano besedilo, ki nam daje sprotne navodila za upravljanje dela. Zamenjali smo destilirano vodo, dopolnili spiralno tekočino oz. preverili smo, če jo je dovolj. Odstranili smo vse predhodne vzorce, preverili koliko je substrata in spraznili kontejner za tekočino. Analizator je sam enkrat spral cevke za vodo, nato pa smo jih morali sprati še ročno, da smo odstranili vse zračne mehurčke. Prav tako smo sprali tudi cevke za substrat. S tem smo končali pripravo analizatorja na delo.

Pred vsako analizo vzorcev smo najprej pripravili ustrezne kontrole. Kontrole, kalibratorje in reagente, ki smo jih potrebovali, smo predhodno ogreli na sobno temperaturo. Na računalniku smo v delovno listo vnesli številko kivete, v kateri je bila kontrola, ime analita, ki smo ga določali, številko serije in redčenja, če so bila ta potrebna.

Nadaljnji postopek velja tako za kontrole kot za vzorce. Na nakladalno ploščad smo najprej postavili vzorec (ali kontrolo), nameščen v posodicah s kodami, za njima pa smo postavili ustrezno testno enoto. Za vzorcem lahko postavimo do pet testnih enot v poljubnem vrstnem redu za vse preiskave, ki jih načrtujemo. V našem primeru smo uporabili 3 testne enote in sicer za hCG, uE3 in AFP. Nato smo na analizatorju pritisnili tipko GO in testne enote so se pomaknile v sistem za identifikacijo črtnih kod. Nato je avtomatska pipeta odpipetirala vzorec in alkalno fosfatazo v testno enoto, transportni trak pa jo je prenesel na glavni rotor, kjer je potekla 30 – minutna inkubacija pri 37 °C. Po inkubaciji so se testne enote sprale, da so se odstranila nevezana protitelesa. Za tem je aparat v testne enote dodal kemiluminiscenčni substrat, te pa so se prenesle v luminometer, kjer so se inkubirale 10 minut pri 37 °C. Na koncu je analizator izmeril intenziteto signalov (v fotopomnoževalni cevi se je izmerilo število fotonov) in jih pretvoril v koncentracijo analita.



Slika 6: Sistem analizatorja IMMULITE[®] 1000 (43).

3.4.4 Kalibracija analizatorja

Na enak način kot smo ga opisali zgoraj, smo pripravili tudi kalibratorje. V vsak komplet za določanje iskanega analita sta vključena po dva kalibratorja. Eden za nizko, drugi pa za visoko merilno območje. V programu analizatorja smo izbrali in označili ustrezno kalibracijo, nato pa na nakladno ploščad postavili oba kalibratorja. Za vsakim kalibratorjem smo postavili po štiri testne enote. Z izmerjenimi rezultati smo dobili naklon premice, ki mora ustrezati standardom proizvajalca. S tem umerimo in pripravimo analizator za meritev vzorcev. Kalibracijo smo izvajali pred vsakim začetkom merjenja vzorcev ter kadar so bile izmerjene kontrolne vrednosti izven pričakovanih vrednosti in kadar smo uporabili nov komplet reagentov (nova serijska številka).

ADJUSTMENT REPORT				
Report Date - 09/02/2012 12:00:27			Laboratory Name -Hormonski laboratorij	
Test Name	hCG		EXP DATE	30/06/2012
KIT LOT	414			
SLOPE		1,1335		INTERCEPT
Instrument Slope Range :		N/A	N= N/A	-2.113
±10% of Previous hCG Slope:		0,98 - 1,19		Intercept Guideline :
hCG Average Slope :		N/A	N= N/A	11.230
LOW ADJUSTOR	37.434	Test Unit Lot	13	
Sample Cup	11	Reagent Lot	14	
	CPS	ADJ LOT	DATE	TIME
Rep 1	46.936	143	09/02/2012	11:56:17
Rep 2	35.250	143	09/02/2012	11:56:48
Rep 3	35.262	143	09/02/2012	11:57:19
Rep 4	34.155	143	09/02/2012	11:57:50
Mean	34.889	CV	1,822 %	
<i>(Replicate #1 was omitted from the low adjustor.)</i>				
HIGH ADJUSTOR	5.164.549	Test Unit Lot	13	
Sample Cup	12	Reagent Lot	14	
	CPS	ADJ LOT	DATE	TIME
Rep 1	4.584.016	143	09/02/2012	11:58:23
Rep 2	4.539.291	143	09/02/2012	11:58:52
Rep 3	4.581.385	143	09/02/2012	11:59:23
Rep 4	4.527.891	143	09/02/2012	11:59:55
Mean	4.558.146	CV	0,631 %	
Adjustment Complete				
Instrument Name -Immolute 1000		Instrument ID -J2657		Page 1
Test is performed on IMMULITE				

Slika 7: Kopija izpisa pridobljenih rezultatov na analizatorju IMMULITE® 1000; primer kalibracije za določanje hCG.

3.4.5 Orientacijske referenčne vrednosti

Preglednica III: Kontrolne vrednosti za hCG.

KONTROLE ZA hCG		
Stopnja	Območje	Sredina
1	12.690 - 17.095 IU/L	14.893
2	42.034 – 66.054 IU/L	54.034
3	68.971 – 129.640 IU/L	99.305

Preglednica IV: Kontrolne vrednosti za uE3.

KONTROLE ZA uE3		
Stopnja	Območje	Sredina
1	1,09 - 1,91 nmol/L	1,5
2	4,72 - 7,50 nmol/L	6,11
3	14,7 - 22,6 nmol/L	18,6

Preglednica V: Kontrolne vrednosti za AFP.

KONTROLE ZA AFP		
Stopnja	Območje	Sredina
1	4,84 - 6,99 IU/mL	5,91
2	20,6 - 28,8 IU/mL	24,7
3	49,0 - 65,9 IU/mL	57,5

Preglednica VI: Orientacijske referenčne vrednosti za koncentracije vseh treh analitov v vzorcih.

Analit	Območje
hCG	do 55000 IU/L
uE3	0,24 - 39 nmol/L
AFP	do 300 IU/mL

3.4.6 Obdelava podatkov

Rezultate smo statistično obdelali s programom Microsoft Excel. Izračunali smo aritmetične sredine, standardne odklone, koeficiente variacije ter korelacijske koeficiente. Pri tem smo uporabili naslednje enačbe:

Aritmetična sredina: $\bar{x} = \Sigma/n$

$$\text{Standardni odklon: } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

$$\text{Koeficient variacije: } KV\% = S / \bar{X} * 100$$

$$\text{Korelacijski koeficient: } r = \frac{\sum(x-\bar{x})*(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}}$$

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI MERITEV hCG V SERUMSKIH VZORCIH NOSEČNIC IN KONTROLAH

Preglednica VII: Vrednosti koncentracij hCG, izmerjenih v serumskih vzorcih nosečnic in kontrolah.

Oznaka	HCG (IU/L)	HCG IU/L	Oznaka	HCG (IU/L)	HCG IU/L
Vzorca ali kontrole	Na novem IMMULITE®	Na starem IMMULITE®	Vzorca ali kontrole	Na novem IMMULITE®	Na starem IMMULITE®
1	10.557	13.431	21	11.569	10.868
2	44.492	53.218	22	33.041	27.676
3	98.029	90.334	23	15.370	13.211
4	18.252	18.821	24	51.983	42.746
5	16.766	16.181	25	99.400	75.485
6	16.829	19.613	26	17.518	16.346
7	10.439	11.627	27	28.716	25.685
8	24.987	34.155	28	19.260	16.335
9	26.326	31.812	29	9.465	8.767
10	22.514	30.547	30	17.208	14.322
11	28.243	37.961	31	18.346	16.676
12	18.651	22.869	32	37.384	25.223
13	14.400	15.070	33	13.563	13.002
14	12.406	13.453	34	43.543	43.274
15	13.086	13.849	35	132.851	93.930
16	49.834	50.716	36	46.442	27.687
17	82.151	86.459	37	29.491	22.473
18	40.111	32.417	38	13.926	12.188
19	36.122	33.572	39	33.550	45.804
20	8.891	9.031	40	26.752	27.544

$$\bar{x}_{\text{hCGnovi}} = 32.311,6 \text{ IU/L}$$

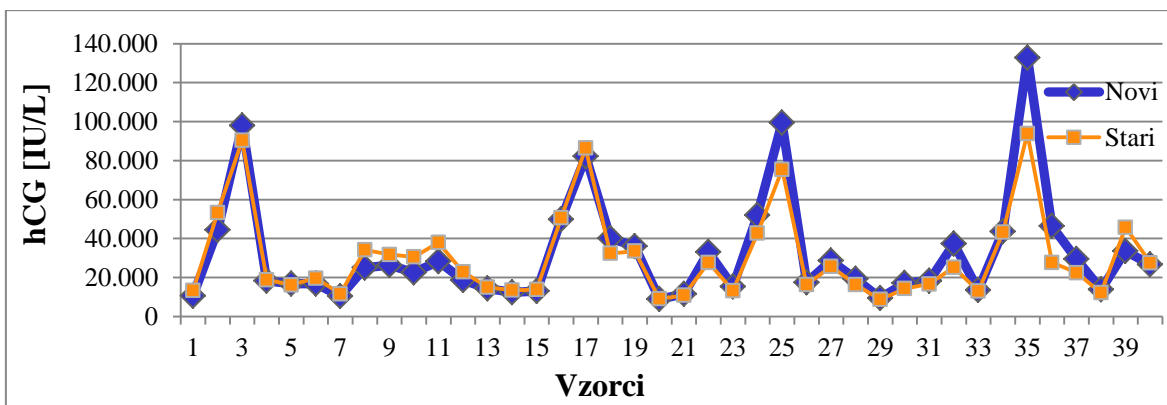
$$S_{\text{hCGnovi}} = 26.986,4$$

$$KV_{\text{hCGnovi}} = 84\%$$

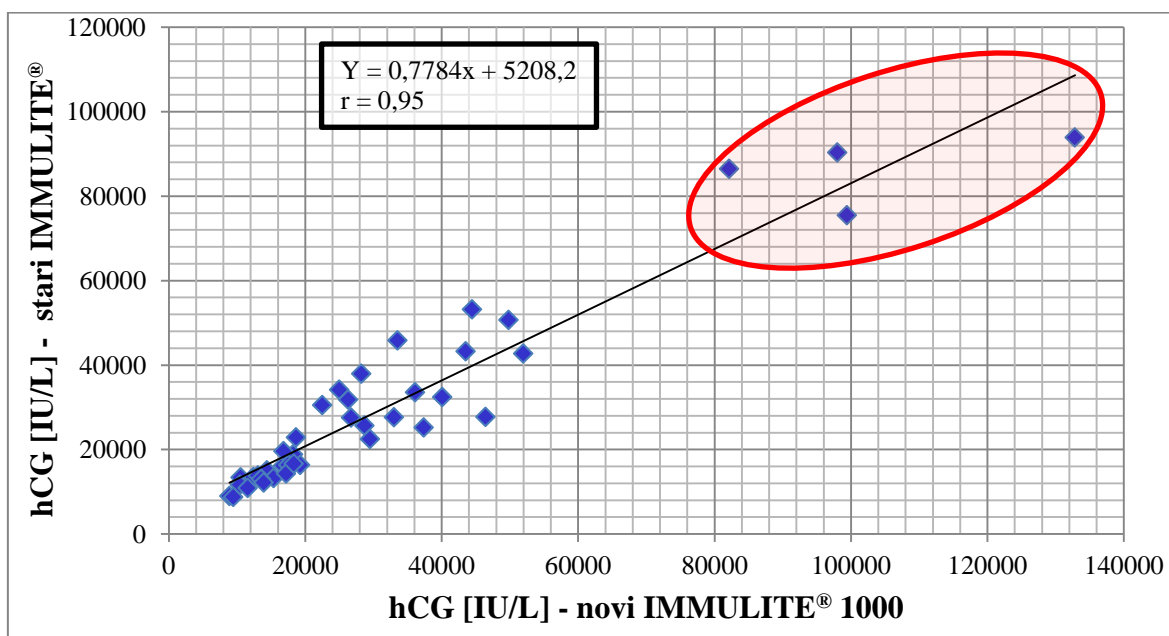
$$\bar{x}_{\text{hCGstari}} = 30.359,5 \text{ IU/L}$$

$$S_{\text{hCGstari}} = 22.101,1$$

$$KV_{\text{hCGstari}} = 73\%$$



Graf 1: Grafični prikaz koncentracij hCG, določenih v enakih vzorcih in kontrolah, na novem in starem aparatu IMMULITE®.



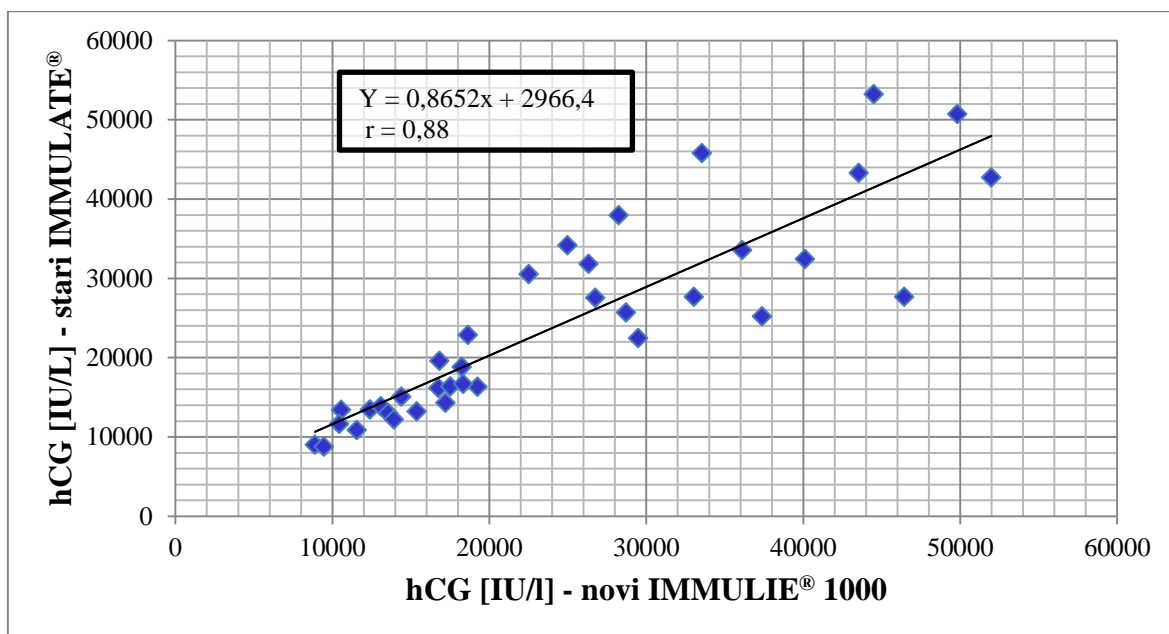
Graf 2: Linearnost primerjanih meritev koncentracij hCG, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE®.

V raziskavo smo vključili 28 naključno izbranih vzorcev nosečnic in 12 kontrol. Sprva smo imeli 15 kontrol, nato pa smo 3 izločili zaradi napačnih meritev, ker smo pozabili na redčenje in zato dobili vrednosti, ki niso bile v skladnosti s pričakovanimi.

V obeh primerih so bili rezultati močno razpršeni. Kot vidimo iz Grafu 1, med obema skupinama rezultatov ni bilo velikih razlik. Opazili pa smo, da smo z novim analizatorjem

IMMULITE® 1000 v več primerih dobili nekoliko višje vrednosti koncentracij hCG, v primerjavi s starim.

Vrednost korelacijskega koeficienta je bila 0,95, kar pomeni, da je bila povezanost med primerjanima skupinama rezultatov visoka (Graf 2). Naklon premice je bil 0,7784.



Graf 3: Linearnost primerjanih meritev koncentracij hCG, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE® po izločitvi štirih najvišjih odstopajočih vrednosti.

Potem, ko smo izločili štiri najvišje odstopajoče vrednosti (Graf 2, označeno z rdečo barvo), smo dobili vrednost naklona premice 0,8652 in korelacijski koeficient 0,88 (Graf 3).

4.2 REZULTATI MERITEV uE3 V SERUMSKIH VZORCIH NOSEČNIC IN KONTROLAH

Preglednica VIII: Vrednosti koncentracij uE3, izmerjenih v serumskih vzorcih nosečnic in kontrolah.

Oznaka	UE3 (nmol/L)	UE3 (nmol/L)	Oznaka	UE3 (nmol/L)	UE3 (nmol/L)
Vzorca ali kontrole	Na novem IMMULITE®	Na starem Immulie®	Vzorca ali kontrole	Na novem IMMULITE®	Na starem Immulie®
18	1,63	1,5	1	2,54	2,1
19	6,62	5,4	2	5,41	4,6
20	19	20,1	3	1,22	0,92
21	0,929	0,7	4	0,544	0,47
22	1,49	1	5	0,898	0,94
23	1,8	1,9	6	1,99	1,7
24	1,93	1,7	7	1,83	1,5
25	2,41	2	8	0,797	0,91
26	1,28	1,4	9	2,02	2,2
27	5,62	5	10	1,82	1,8
28	18	21	11	4,16	3,6
29	2,53	2,1	12	2,52	2,5
30	1,37	1,2	13	2,42	2
31	1,28	1,2	14	1,19	1
32	1,78	1,9	15	2,93	3
33	3,3	3,3	16	3,15	2,8
34	2,16	2			
35	1,71	1,5			
36	1,47	1,4			
37	4,99	5,8			
38	16,1	17,7			
39	0,846	0,7			
40	2,25	2,4			
41	1,85	2			
42	1,87	1,6			
43	1,78	1,8			

$$\bar{x}_{uE3novi} = 3,4 \text{ nmol/L}$$

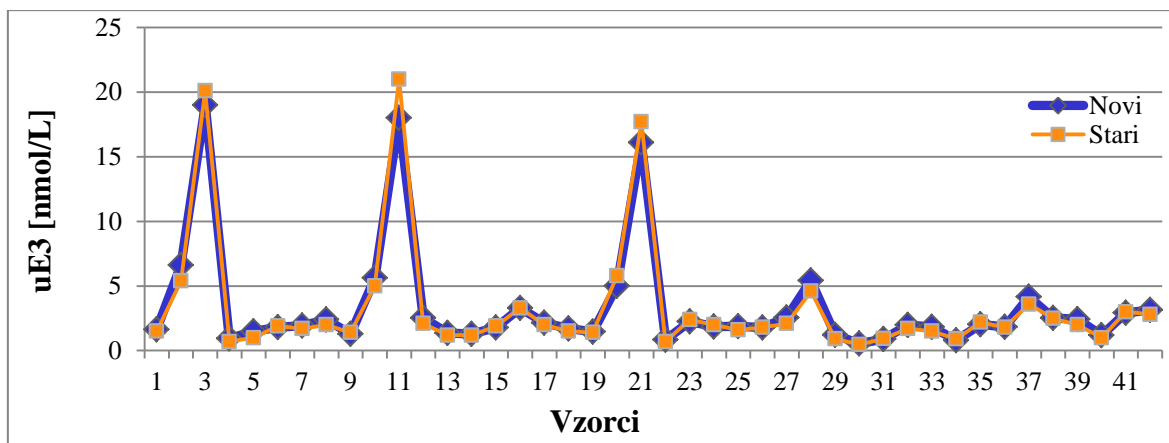
$$S_{uE3novi} = 4,2$$

$$KV_{uE3novi} = 125\%$$

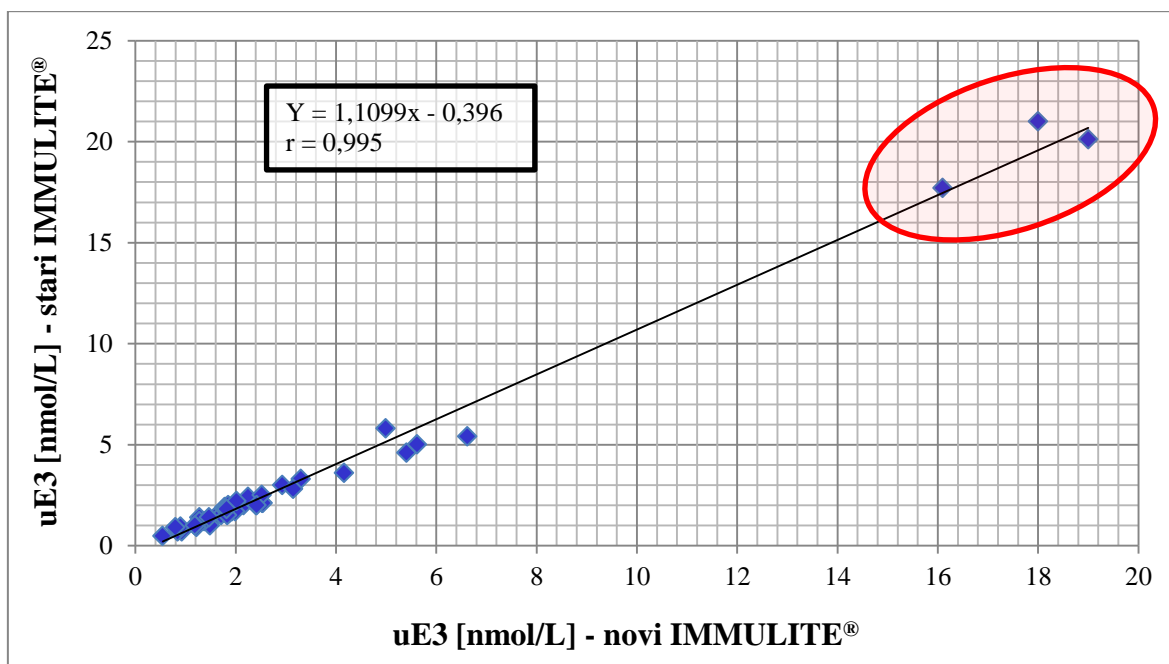
$$\bar{x}_{uE3stari} = 3,3 \text{ nmol/L}$$

$$S_{uE3stari} = 4,7$$

$$KV_{uE3stari} = 140\%$$



Graf 4: Grafični prikaz koncentracij uE3, določenih v enakih vzorcih in kontrolah, na novem in starem analizatorju IMMULITE®.

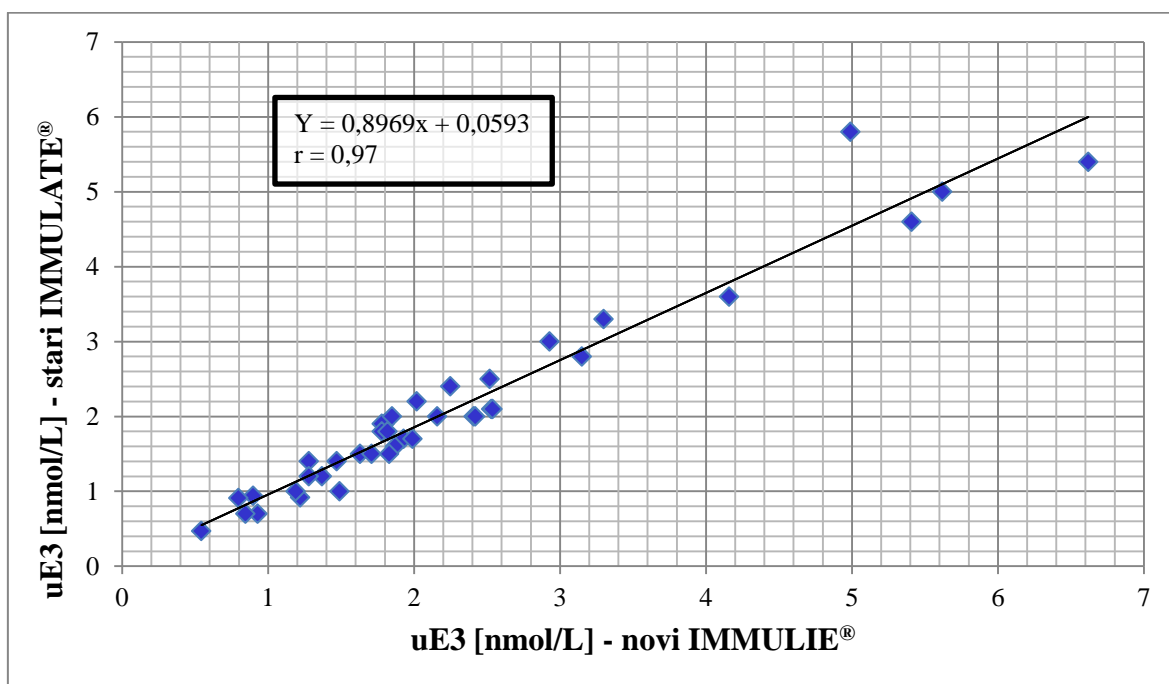


Graf 5: Linearnost primerjanih koncentracij uE3, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE®.

Sprva smo v raziskavo vključili 28 naključno izbranih vzorcev in 15 kontrol. Ker pa smo v prvih dneh v vzorcih in kontrolah izmerili koncentracije uE3, ki so se preveč razlikovale od pričakovanih vrednosti, smo te rezultate zavrgli in izvedli meritve naključno izbranih 16

vzorcev. Tako smo v raziskavo vključili 33 naključno izbranih serumskih vzorcev nosečnic in 9 kontrol.

Ugotovili smo veliko razpršenost rezultatov v obeh primerjalnih skupinah. Kot vidimo na Grafu 4, med obema skupinama rezultatov ni bilo veliko razlik. Vrednost korelacijskega koeficienta je bila 0,995, kar pomeni, da je bila linearna povezanost med primerjalnimi rezultati zelo visoka. Naklon premice pa je bil 1,1099.



Graf 6: Linearnost primerjanih meritev koncentracij uE3, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE® po izločitvi treh najvišjih odstopajočih vrednosti.

Po izločitvi treh najvišjih odstopajočih vrednosti (Graf 5, označeno z rdečo barvo), smo dobili naklon premice 0,8969 in korelacijski koeficient 0,97 (Graf 6).

4.3 REZULTATI MERITEV AFP V SERUMSKIH VZORCIH NOSEČNIC IN KONTROLAH

Preglednica IX: Vrednosti koncentracij AFP, izmerjenih v serumskih vzorcih nosečnic in kontrolah.

Oznaka	AFP (IU/mL)	AFP (IU/mL)	Oznaka	AFP (IU/mL)	AFP (IU/mL)
Vzorca ali kontrole	Na novem IMMULITE®	Na starem IMMULITE®	Vzorca ali kontrole	Na novem IMMULITE®	Na starem IMMULITE®
1	6,25	5,2	23	28,2	24,8
2	25,4	25,4	24	32	29,4
3	61,7	58,5	25	28,1	25,2
4	5,84	5,3	26	5,59	5,2
5	21	23,8	27	26	22,8
6	58,5	56,9	28	56,9	53
7	18,7	19,1	29	34,9	34,1
8	19,8	20,4	30	32,3	31,4
9	23,3	25	31	32,2	28,7
10	25	26,1	32	33,4	31,6
11	28,9	30,2	33	100	88
12	20,2	20,6	34	28,9	25,5
13	42,9	46,8	35	51,6	46,5
14	31,9	32,3	36	5,63	5,2
15	34,5	36,7	37	24	22,8
16	33	35,5	38	55,6	56,9
17	29,4	27,4	39	35,7	32,9
18	6	5,3	40	33,8	32
19	25	23,5	41	33,6	33,1
20	63,2	54,5	42	38,8	32
21	36	31,4	43	40,6	38,9
22	25,4	21,8			

$$\bar{x}_{AFPnovi} = 32,6 \text{ IU/mL}$$

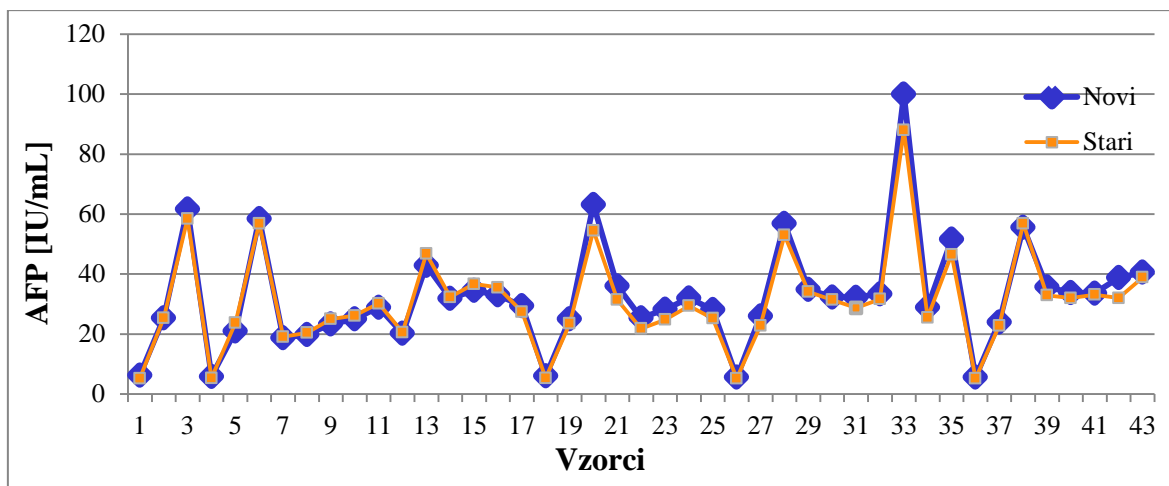
$$S_{AFPnovi} = 17,7$$

$$KV_{hCGnovi} = 54\%$$

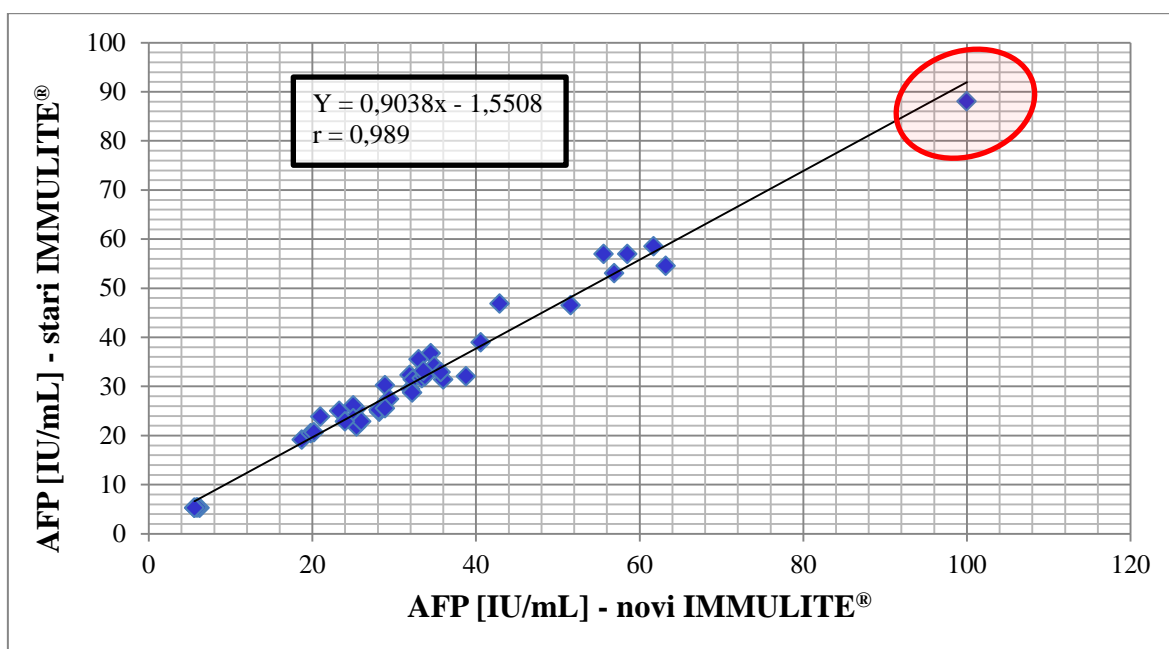
$$\bar{x}_{AFPstari} = 31,0 \text{ IU/mL}$$

$$S_{AFPstari} = 16,2$$

$$KV_{hCGstari} = 52\%$$



Graf 7: Grafični prikaz koncentracij AFP določenih v enakih vzorcih in kontrolah, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE®.

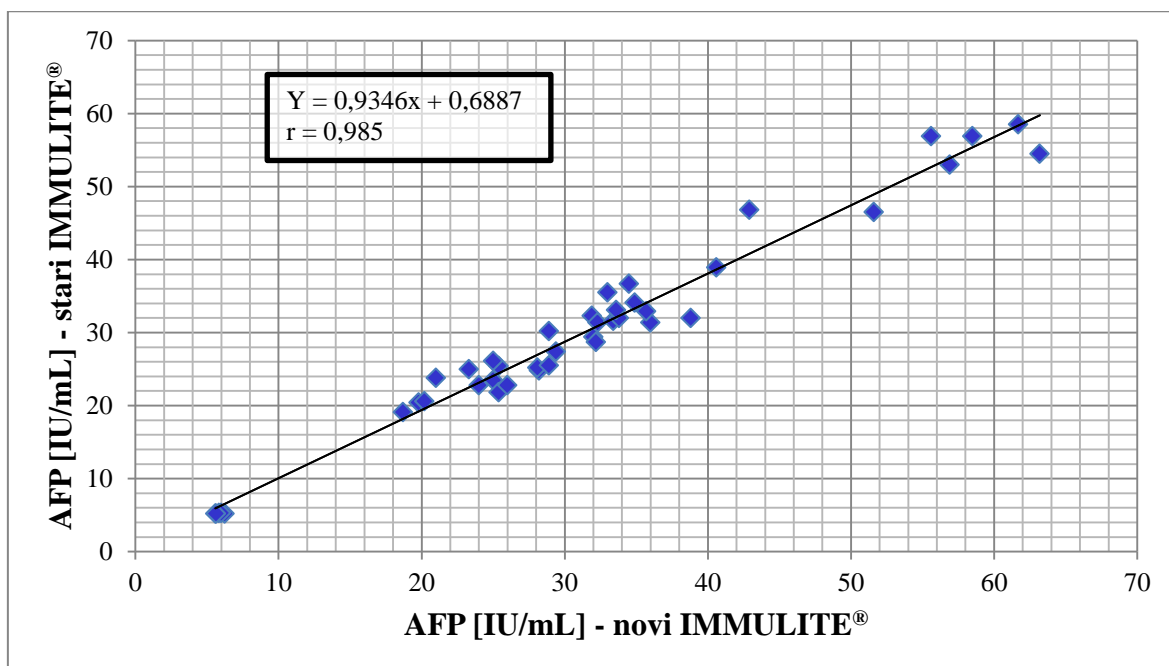


Graf 8: Linearnost pridobljenih koncentracij AFP, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE®.

V raziskavo smo vključili 28 naključno izbranih vzorcev in 15 kontrol.

V obeh skupinah primerjalnih rezultatov smo opazili njihovo veliko razpršenost. Kot vidimo na Grafu 5, med rezultati ni bilo velikih razlik. Vrednost korelacijskega koeficienta

je bila 0,989, kar pomeni, da je bila linearna povezanost med primerjalnimi rezultati zelo visoka. Naklon premice je bil 0,9038.



Graf 9: Linearnost primerjanih meritev koncentracij AFP, pridobljenih na novem in starem analizatorju IMMULITE®, po izločitvi najvišje odstopajoče vrednosti.

Po izločitvi najvišje odstopajoče vrednosti (Graf 8, označeno z rdečo barvo), smo dobili naklon premice 0,9346 in korelacijski koeficient 0,985 (Graf 9).

5 RAZPRAVA

Hormoni hCG, uE3 in AFP so pomembni za ugotavljanje Downovega sindroma pri plodu v 2. tromesečju nosečnosti. Njihove koncentracije uporabljamo za izračun tveganja za DS. V aplikacijo za izračun verjetnosti poleg vrednosti koncentracij hCG, uE3 in AFP, vnesemo tudi materino starost, velikost zarodka in velikost nuhalne svetline. Dobljeni rezultat predstavlja verjetnost, ki je zapisana v obliki razmerja. Rezultati do 1 primer DS : 190 nosečnosti so pozitivni. Na ta način lahko odkrijemo 90% primerov DS.

Namen naše diplomske naloge je bil primerjati rezultate koncentracij omenjenih hormonov v vzorcih serumov nosečnic, izmerjenih z novim analizatorjem IMMULITE® 1000 in starim analizatorjem IMMULITE®. Na ta način smo želeli umeriti novi analizator za pravilno delovanje, ki bo omogočalo pridobitev točnih in zanesljivih rezultatov.

Pred začetkom izvajanja analiz na analizatorju IMMULITE® 1000, po tem ko nismo pravilno analizirali kontrol, smo morali izvesti kalibracijo aparata za vsak analit posebej. Kalibracija je pravzaprav umerjanje analizatorja glede na standardno umeritveno krivuljo, ki jo določi proizvajalec in je že vnešena v sistem. Na Sliki 6, vidimo, da smo za vsak kalibrator z nizkimi in visokimi koncentracijami analitov naredili po štiri teste. Iz dobljenih rezultatov smo nato izračunali koeficiente variacije, ki prikazujejo razpršitev meritev okrog aritmetične sredine. Manjša kot je, manj je odstopanj od srednje vrednosti. Z našimi kalibracijami smo dobili pričakovano majhne vrednosti koeficienta variacije. Tako smo lahko zanesljivo prilagodili umeritveno premico glede na vsak reagenčni komplet z določeno serijsko številko, s katerim smo nato izvedli nadaljnje teste.

Nekaj več nepričakovanih rezultatov smo dobili pri testiranju kontrol. Pri 3 kontrolah za hCG smo med prvim testiranjem ugotovili večja odstopanja. Verjetno je bila to posledica nepravilne priprave kontrol, ali pa smo pozabili vnesti izvedene redčitve v računalniški program. Prav tako smo pri prvih meritvah 6 kontrol za uE3, nato pa še 11 vzorcih, ugotovili večja odstopanja rezultatov od pričakovanih, zato smo jih morali zavreči. Predvidevamo, da je možno, da smo pri kontrolah za uE3 pomešali teste iz prve, s tistimi iz druge stopnje, in tako dobili nepričakovane rezultate. Pri meritvah vzorcev pa je novi analizator skoraj vedno dajal višje rezultate, v primerjavi s starim. Zato smo ga ponovno kalibrirali in nato ponovno izvedli teste.

Ker si grobih napak ne smemo privoščiti, moramo biti pri pripravi kontrol ter vzorcev in delu vedno pozorni, da zagotovimo zanesljive rezultate.

Po izločitvi nepričakovanih vrednosti in po ponovnih meritvah novih vzorcev pa smo dobili povsem primerljive rezultate. Pri določanju koncentracij vseh treh hormonov v vzorcih smo opazili njihovo precejšnjo razpršenost, saj so v vzorcih prisotne različne koncentracije analitov. Gre za velik razpon orientacijskih referenčnih vrednosti. Rezultati standardnega odklona med novim in starim analizatorjem so si zelo podobni.

Grafi 1, 4 in 7 prikazujejo, kako podobne so si bile koncentracije hormonov, izmerjene z novim in starim analizatorjem. Ugotovili smo, da so bila pri višjih koncentracijah odstopanja večja. Pri primerjavi izmerjenih koncentracij hCG smo dobili naklon premice 0,7784 in korelacijski koeficient 0,95. Korelacija med dobljenimi rezultati je bila visoka, potek premice pa malo slabši. Zato smo izločili štiri najvišje vrednosti koncentracij in po ponovni statistični analizi dobili naklon premice 0,8652 in korelacijski koeficient 0,88. Smer premice je tako izražala boljše ujemanje primerjanih koncentracij, čeprav je bil korelacijski koeficient malo slabši, vendar pa je še vedno izražal dobro povezanost med meritvami enakih vzorcev na novem in starem analizatorju.

Pri primerjanju koncentracij uE3 smo dobili naklon premice 1,1099 in korelacijski koeficient 0,995. Korelacija je bila zelo močna, smer premice pa malo bolj strma. Po izločitvi treh največjih koncentracij pa smo po ponovni statistični analizi dobili naklon premice 0,8969 in korelacijski koeficient 0,97. Smer premice je tako izražala dobro ujemanje med primerjanimi rezultati, z visoko pozitivno stopnjo povezanosti.

Ko smo primerjali koncentracije AFP, smo dobili naklon premice 0,9038 in korelacijski koeficient 0,989. Tudi tokrat je bila povezanost visoko pozitivna, prav tako pa je bila zelo primerna tudi smer premice, ki je kazala na dobro ujemanje primerjanih koncentracij. Po izločitvi najvišje odstopajoče koncentracije, smo dobili še boljši naklon premice, in sicer 0,9346 ter korelacijski koeficient 0,985.

Ugotovili smo torej, da dobimo boljše ujemanje meritev, opravljenih na novem in starim analizatorju, če izločimo najvišje izmerjene vrednosti. Pri visokih koncentracijah, kot je bilo to npr. pri določanju hCG, je bilo potrebno redčenje vzorcev, zato je lahko prišlo do manjših odstopanj. Ker je občutljivost testiranja velika, lahko na rezultate vplivajo tudi slučajne napake, npr. nihanje temperature. Da bi dobili boljšo primerljivost tudi med

visokimi izmerjenimi vrednostmi, pa bi morali narediti več meritev v teh koncentracijskih območjih.

6 SKLEP

- Ne glede na to, kateri analizator imamo v laboratoriju, ga moramo vzdrževati. Vsakodnevno moramo izvesti ustrezno kontrolo, glede na analit in metodo, ki ju bomo uporabili in vsaj enkrat na mesec, v našem primeru pa pri vsakem novem odprtju reagenčnega kompleta, opraviti kalibracijo. O vsem tem moramo voditi evidenco, saj se le tako izognemo napakam in vzdržujemo dobro kontrolo kakovosti.
- Z meritvami, izračuni in grafičnimi prikazi smo ugotovili, so bili rezultati testiranj hCG, uE3 in AFP z analizatorjema IMMULITE[®] primerljivi.
- Ugotovili smo, da so se meritve koncentracij še bolj ujemale, če smo izločili najvišje izmerjene vrednosti.
- Novi analizator IMMULITE[®] 1000 daje primerljive in zanesljive rezultate, v primerjavi z doslej uporabljenim aparatom IMMULITE[®].

7 LITERATURA

1. Joško Osredkar: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 66-87, 308, 315-319
2. Stephen Nussey and Saffron Whitehead: Endocrinology An Integrated Approach, George's Hospital Medical School, London, 2001: 1-3
3. Ksenija Geršak: Fiziološke spremembe v nosečnosti in zdravljenje, Farmaceutski vestnik, 2008; 4: 201-205
4. Tanja Blejec: Fiziološke spremembe v nosečnosti – prilagoditev nosečnice na nosečnost, Zavod RS za transfuzijo krvi, Ljubljana 2007 (<http://www.ztm.si/uploads/publication/967/971.pdf>)
5. Marjana Dolinar, Vera Cunk Manić, Ida Tarman Šmit: Anatomija in fiziologija človeka, Pipinova knjiga, Ljubljana, 2000: 200, 201, 360-363
6. Peter Stušek: Biologija Človeka, DZS, Ljubljana, 2001: 241-248
7. Stenman Ulf-Haken, Tiitinen Aila, Alftan Henrik, Valmu Leena: The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG, Human Reproduction Update, 2006; 6: 769, 770
8. Tul Nataša: Presejalni hormonski testi za Downov sindrom, Medicinski razgledi, Ginekologija in porodništvo, 1997; 4: 525
9. Informativna brošura pri reagenčne kompletu za uporabo testiranja hCG: IMMULITE®/IMMULITE® 1000 hCG
10. <https://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen>
11. <http://americanpregnancy.org/getting-pregnant/fertility-window/>
12. <http://www.stetoskop.info/zenski-polni-hormoni-b13-bs126-p93-nc1-book.htm>
13. Informativna brošura pri reagenčnem kompletu za uporabo testiranja UE3: IMMULITE®/IMMULITE® 1000 Unconjugated Estriol
14. <http://en.wikipedia.org/wiki/Progesterone>
15. <http://www.lifestylenatural.com/2083/Progesteron-in-estrogen-v-zivljenju-zenske->
16. <http://www.babylifetime.com/pregnancy/progesterone-levels-in-early-pregnancy/>
17. <http://women.webmd.com/progesterone-15286>
18. Informativna brošura pri reagenčnem kompletu za uporabo testiranja AFP: IMMULITE®/IMMULITE® 1000 AFP
19. <http://syllady.com/sl/pages/721062>
20. Primož Schauer: Humana genetika, Dopisna delavska univerza, Ljubljana, 1981: 33, 43-51
21. Borut Peterlin in Karin Writzl: Humana Genetika, Cankarjeva založba, Ljubljana, 2003: 17-20
22. Cliff Cunningham: Poskušajmo razumeti Downov sindrom, Sekcija za Downov sindrom, Zavod za odprto družbo in SOŽITJE, Ljubljana, 1999: 60-131
23. Cora Halder: Otrok z Downovim sindromom, Zveza Sožitje, Ljubljana, 2007: 16-21

24. Barišić I.: Down's syndrome, *Medicina* 2005; 41(1): 69-75
25. <http://www.ndss.org/Down-Syndrome/What-Is-Down-Syndrome/>
26. Katarina Kesič: Otroci z Downovim sindromom, Viva, 2009
(<http://www.viva.si/Otro%C5%A1ke-bolezni-Pediatrija/118/Otroci-z-Downovim-sindromom>)
27. Urška Šivic: Prenatalna diagnostika: Pomen, koristi in tveganja – pogled neonatologa, predavanja Carla Bellienija iz Siene na univerzi v Mariboru, *Medicinski mesečnik*, 2006 (http://www.medicinski-mesečnik.com/MM_06_10/MM_06_10_carlo-bellieni-pred-prenat-diagn.pdf)
28. Živa Novak-Antolič, Anamarija Brezigar, Nataša Tul, Ksenija Geršak, Marija Debevec, Borut Peterlin, Stanko Pušenjak, Joško Osredkar: Presejalni testi za Downovo bolezen v nosečnosti, *Genetika v ginekologiji in porodništvu*, Zbornik prispevkov, Ginekološka klinika, Ljubljana, 1998: 121-127
29. Stanko Pušenjak: Nuhalna svetlina in PAPP-A, prosti beta HCG, Zbornica zdravstvene nege Slovenije, Zbornik predavanj, Ljubljana, 2003: 47-50
30. http://www.dnevnik.si/tiskane_izdaje/zdravje/236021
31. Informativna zloženska: Anamarija Brezigar, Ksenija Geršak, Živa Novak-Antolič, Joško Osredkar, Nataša Tul Mandić, Lili Steblovnik: Preiskave za odkrivanje Downovega sindroma (mongolizma) v nosečnosti, *Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo*, Ljubljana 2007
32. Tanja Premru Sršen: Presejanje za Downov sindrom, Šola ultrazvočnih diagnostik, Zbornik predavanj, Ljubljana, 2006: 5-11
33. Katja Bricelj, Maja Vuković, Ivan Verdenik, Joško Osredkar, Ksenija Geršak: Analiza četrtega testa za odkrivanje trisomije 21 in trisomije 18 v drugem trimesečju nosečnosti, *Zdravniški vestnik*, Ljubljana, 2014; 83: 598
34. Informativna zloženska: Biopsija horionskih resic, Informacije za paciente in njihove družine, Prevedla dr. Karin Writzl, Inštitut za medicinsko genetiko, Univerzitetni klinični center, Ljubljana, 2009
35. Rainer Jure: Nuhalna svetlina in amniocenteza
(http://www.bambino.si/nuhalna_svetlina_in_amniocenteza)
36. Gregor Anderluh, Peter Maček, Kristina Sepčič, Tom Turk: Eksperimentalne metode v Biokemiji, Študentska založba, Ljubljana, 2009: 102-105
37. Maksimiljan Gorenjak: Osnove imunokemijskih metod, zbornik predavanj, seminar za tehnike laboratorijske medicine, Maribor 2002
38. Marjan Vozelj: Temelji Imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 91, 92
39. Carl A. Burtis, David E. Bruns: Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics, Elsevier Health Sciences, 2014: 12-15
40. Marc J.: Navodila in dnevnik za vaje iz klinične biokemije I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006: 31-34
41. <https://blcmedical.com/portfolio-view/image-format/>
42. <http://www.medicalsystems.it/sistemi/immulite/>
43. Navodila za uporabo analizatorja: IMMULITE[®] 1000 operator's manual 600884-0002-A