

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBRA MOŠKRIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBRA MOŠKRIČ

**PRIMERJAVA KONCENTRACIJ HUMANEGA HORIONSKEGA
GONADOTROPINA V SERUMU IN POLNI KRVI PRI PACIENTKAH S SUMOM
NA IZVENMATERNIČNO NOSEČNOST**

**MESAUREMENT OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPINE
CONCENTRATION IN SERUM AND IN WHOLE BLOOD IN PREGNANT
WOMEN WITH SUSPECTED ECTOPIC PREGNANCY**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem, višjega svetnika in somentorstvom prim. Branka Cvjetičanina, dr. med., spec. ginek. (UKC Ljubljana, ginekološka klinika).

Analize odvzetih krvnih vzorcev sem opravljala v urgentni ambulanti za ginekologijo, Urgentni blok Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem, višjemu svetniku in somentorju prim. Branku Cvjetičaninu, dr. med., spec. ginek., za vodenje in pomoč pri eksperimentalnem delu ter pri pisanju diplomske naloge. Zahvala gre tudi partnerju Eriku za podporo, razumevanje, spodbujanje in potrpežljivost v času študija in koristne nasvete ter tehnično oblikovanje zaključnega dela ter moji hčerki Eriji, ki ne glede na moje vzpone in padce neizmerno verjame vame.

Posebna zahvala gre tudi Brigiti K., Gregorju M., Tijani S., Avgusti Š., Adrijanu C., Borki M., Romanu, Urbanu P., Jasmini K.P., Tonetu D., Živi R., Mojci Z.D. za vse izkazane prijaznosti in pomoč med študijem in do zaključka zagovora diplomske naloge.

Hvala vsem skupaj in vsakomur posebej!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem, višjega svetnika in somentorstvom prim. Branka Cvjetičanina, dr. med., spec. ginek.

Barbra Moškrič

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	IX
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
SLOVARČEK IZRAZOV	XIII
1. Uvod	1
1.1. Nosečnost	1
1.2. Hormoni med nosečnostjo	10
2. Namen dela	17
2.1. Izhodišča	17
2.2. Cilji diplomske naloge	17
3. Eksperimentalno delo	19
3.1. Validacija metode	19
3.2. Ugotavljanje vrednosti β -hCG v polni krvi	19
3.3. Materiali in metode	20
4. Rezultati	27
4.1. Natančnost metode	27
4.2. Analitična občutljivost metode določanja β -hCG/meja detekcije (LoD)	30
4.3. Funkcionalna občutljivost metode določanja β -hCG (LoQ)	30
4.4. Linearnost razredčitve hepariniziranih vzorcev plazme β -hCG	32
4.5. Korelacija rezultatov vrednosti β -hCG med heparinizirano polno krvjo in heparinizirano plazmo	35
4.6. Primerjava izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatom PATHFAST™ (POCT analizator) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)	54
5. Razprava	56
6. Sklepi	63
LITERATURA	65

DODATEK.....	i
7. Validacija analizne metode za merjenje koncentracije β -hCG v heparinizirani polni krvi in heparinizirani plazmi.....	i
7.1. Ponovljivost znotraj dneva.....	i
7.2. Ponovljivost med dnevi.....	iv
7.3. Analitična občutljivost metode določanja β -hCG/meja detekcije (LoD).....	vi
7.4. Funkcionalna občutljivost metode določanja β -hCG/meja detekcije (LoQ)....	viii
7.5. Linearnost razredčitve	xi
7.6. Korelacija rezultatov β -hCG med heparinizirano polno krvjo in plazmo.....	xvi
7.7. Primerjava izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatom PATHFAST™ (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)	xxi

KAZALO SLIK

Slika 1: Različni podtipi izvenmaternične nosečnosti (glede na mesto ugnezditve oplojenega jajčeca) in pogostnost pojavljanja	8
Slika 2: Gibanje koncentracije hormonov med nosečnostjo	10
Slika 3: Slika molekule hCG;	13
Slika 4: Slika namiznega imunoanalizatorja PATHFAST™	21
Slika 5: Notranjost imunoanalizatorja PATHFAST™	22
Slika 6: Slika reagentne kartuše za analizo β -hCG	23
Slika 7: Princip delovanja imunoanalizatorja PATHFAST™	24
Slika 8: Primerjava rezultatov β -hCG za heparinizirano polno kri in heparinizirano plazmo (izračun korelacije)	36
Slika 9: Primerjava rezultatov vrednosti β -hCG heparinizirane polne krvi in plazme (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost)	44
Slika 10: Primerjava rezultatov vrednosti β -hCG heparinizirane plazme in povprečnih vrednosti heparinizirane plazme in polne krvi (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost)	45
Slika 11: Primerjava rezultatov vrednosti β -hCG v heparinizirani polni krvi in plazmi (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost) – odstopanje od normale	47
Slika 12: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 7 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)	51
Slika 13: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 12 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)	51
Slika 14: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 26 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)	52
Slika 15: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 37 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)	52
Slika 16: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 38 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)	53

Slika 17: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 51 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke).....	53
Slika 18: Prikaz izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)	55
Slika 19: Prikaz funkcionalne občutljivosti aparata PATHFAST™ (LoQ)	x
Slika 20: Prikaz sipanja povprečnih vrednosti od normale vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xii
Slika 21: Prikaz sipanja izmerjenih in teoretičnih vrednosti vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xii
Slika 22: Prikaz sipanja povprečnih vrednosti od normale vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xiii
Slika 23: Prikaz sipanja izmerjenih in teoretičnih vrednosti vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xiii
Slika 24: Prikaz sipanja izmerjenih in teoretičnih vrednosti vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xiv
Slika 25: Prikaz sipanja povprečnih vrednosti od normale vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xiv
Slika 26: Primerjava rezultatov heparinizirane polne krvi in plazme (izračun korelacije) .	xx
Slika 27: Prikaz izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ in Siemens DCP Immulite.....	xxv

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz izračunanih rezultatov iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri ponovljivosti znotraj dneva	28
Preglednica II: Izračunani rezultati iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri ponovljivosti med dnevi	29
Preglednica III: Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca za vzorce plazme.....	29
Preglednica IV: Izračunane statistične vrednosti za določitev analitične občutljivosti metode določanja.....	30
Preglednica V: Izračunani rezultati iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri funkcionalni občutljivosti metode določanja β -hCG (LoQ).....	31
Preglednica VI: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve).....	32
Preglednica VII: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve).....	33
Preglednica VIII: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve).....	34
Preglednica IX: Izračunani statistični parametri β -Hcg za vzorce heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije (validacija metode).....	36
Preglednica X: Izmerjene vrednosti β -hCG na 158 vzorcih heparinizirane plazme in 158 vzorcih heparinizirane polne krvi pri nosečnicah s sumom na izvenmaternično nosečnost (preverjanje delovne hipoteze)	37
Preglednica XI: Izračunani statistični parametri vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost).....	42
Preglednica XII: Izračunane vrednosti β -hCG za vzorce heparinizirane polne krvi in plazme (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost) – odstopanje od normale	45
Preglednica XIII: Pregled upadanja koncentracij β -hCG po opravljenem posegu pri pacientkah s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti	48

Preglednica XIV: Rezultati primerjave izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST TM (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator).....	54
Preglednica XV: Izmerjene vrednosti β -hCG iz vzorcev plazme in vzorcev polne krvi za preverjanje ponovljivosti znotraj dneva	i
Preglednica XVI: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za preverjanje ponovljivosti znotraj dneva.....	ii
Preglednica XVII: Vrednosti izmerjenih vzorcev β -hCG heparinizirane plazme in polne krvi (določitev ponovljivosti med dnevi)	iv
Preglednica XVIII: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za preverjanje ponovljivosti med dnevi	vi
Preglednica XIX: Vrednosti slepih vzorcev β -hCG za določitev analitične občutljivosti (LoD)	vii
Preglednica XX: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za določitev analitične občutljivosti (LoD)	viii
Preglednica XXI: Izmerjene vrednosti združenih vzorcev β -hCG heparinizirane plazme z nizkimi, srednjimi, visokimi koncentracijami β -hCG (določanje funkcionalne občutljivosti (LoQ)	ix
Preglednica XXII: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za določanje funkcionalne občutljivosti (LoQ)	x
Preglednica XXIII: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xi
Preglednica XXIV: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xiii
Preglednica XXV: Izmerjene vrednosti β -hCG hepariniziranega vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)	xiv
Preglednica XXVI: Izmerjene vrednosti vzorcev heparinizirane plazme in heparinizirane polne krvi za izračun korelacije.....	xvi
Preglednica XXVII: Izračunani statistični parametri vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije.....	xx

Preglednica XXVIII: Primerjava izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST TM in Siemens DCP Immulite.....	xxi
Preglednica XXIX: Rezultati primerjave izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST TM in Siemens DCP Immulite.....	xxiv

POVZETEK

Izvenmaternična nosečnost je patološka nosečnost, saj se oplojeno jajčece ne ugnezdi v maternični votlini ampak drugje (najpogosteje v jajcevodu). Napačno ciljno tkivo pa ne omogoča pravilne ugnezditve in normalnega razvoja zarodka. Zato sta nujna čimprejšnja pravilna diagnoza in ustrezno ukrepanje (prekinitev nosečnosti). Z rastjo zarodka lahko na mestu ugnezditve pride do razpoka ali natrganja strukture. Posledično se lahko pojavi obilna vaginalna ali notranja krvavitev, kjer nosečnica lahko izkrvavi v 1-2 urah.

Humani horionski gonadotropin (hCG) je nosečnostno specifičen glikoproteinski hormon, ki ga izloča razvijajoča se posteljica. Poleg ultrazvočne preiskave nosečnice je določanje vrednosti β -hCG zelo pomemben diagnostični parameter, s katerim potrdimo nosečnost, verjetnost za pojav različnih oblik patoloških nosečnosti in za določanje različnih oblik raka. β -hCG lahko določamo v krvi ali urinu. V urinu ga določamo kvalitativno, v krvi pa kvantitativno (iz plazme, seruma ali polne krvi). Ker gre pri izvenmaternični nosečnosti za urgentno ginekološko stanje, si želimo rezultat pridobiti čimprej. Še posebej v stanjih, ko pacientka obilno akutno krvavi ali ima hude bolečine v spodnjem delu trebuha, je hitra oskrba, s čim manj nepotrebnega premikanja, nujna. Prednosti določanja β -hCG v polni krvi, in ob postelji pacientke (POCT), na oddelku bolnišnice ali v ambulantni: odpade faza transporta vzorca do laboratorija, analizo lahko naredimo takoj, odpade pa tudi faza centrifugiranja vzorca. V primeru, ko je za potrditev diagnoze potrebna meritev enega hormona, je rezultat na voljo v 17 minutah, v primeru, ko je potrebnih več sočasnih meritev različnih hormonov, nam aparat PATHFAST™ iz istega vzorca rezultate meritev posreduje v 26 minutah.

Namen naše diplomske naloge je bil preveriti, ali lahko β -hCG poleg plazme z zadostno zanesljivostjo določamo tudi iz polne krvi, pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost. Z validacijo metode smo preverili ustreznost metode (izračun osnovnih statističnih parametrov) za določanje β -hCG pri tej podskupini pacientk. Izmerjene oziroma izračunane vrednosti so bile znotraj predpisanih referenčnih mej proizvajalca. Koeficient korelacije med vzorci plazme in polne krvi je znašal 0,980 (nosečnice) in 0,8448 (pacientke s sumom na izvenmaternično nosečnost) in potrjuje dobro moč povezave obeh spremenljivk. Potrdili smo, da je POCT metoda določanja β -hCG iz polne krvi uporabna za diagnostiko, obravnavo in pooperativno spremljanje te podskupine pacientk.

Ključne besede: urgentna ginekološka stanja, izvenmaternična nosečnost, beta humani horionski gonadotropin, PATHFAST™, POCT

ABSTRACT

Ectopic pregnancy is a pathological pregnancy, where the fertilized egg is not implanted in the uterus, but elsewhere (most frequently in the fallopian tube), thus preventing correct implantation and normal foetus development. Prompt and correct diagnosis and therapy (termination of pregnancy) is key. During foetus growth, the patient is at risk of tubal damage or rupture of the implantation site. Major vaginal or internal haemorrhage can occur and the pregnant woman can bleed to death within 1-2 hours.

Human chorionic gonadotropin (hCG) is a pregnancy specific glycoprotein hormone, excreted by the growing placenta. Beside the ultrasound examination of the pregnant woman, β -hCG determination is a very important diagnostic parameter to confirm pregnancy, the probability of occurrence of various pathologic pregnancies and to identify different cancer types. β -hCG can be determined in urine or blood. The determination in urine is qualitative, whereas in blood it is quantitative (plasma, serum, whole blood). As ectopic pregnancy is an emergent gynaecological condition, the results should be obtained as soon as possible. This applies in particular in cases of acute or major haemorrhage or substantial pain in the lower abdomen. Fast treatment must be such that the patient experiences as little unnecessary movement as possible. When β -hCG is determined in whole blood and at the patient's bed side (POCT), in the hospital ward, in a general medical practice, sample transport to the laboratory is no longer required. The assay can be performed immediately without sample centrifugation. If one hormone assay is required to confirm the diagnosis, the measurement result can be obtained within 17 minutes, in case multiple concomitant hormone assays are required to confirm the diagnosis, the measurement results based on the same sample can be obtained by PATHFAST™ within 26 minutes.

The scope of our Diploma thesis was to check whether an β -hCG assay can be performed in pregnant women with suspected ectopic pregnancy with sufficient accuracy from whole blood, not merely from plasma. The suitability of the method to determine β -hCG in this patient subgroup has been verified by its validation (by calculating the basic statistics parameters). The measured and calculated values were within the prescribed manufacturer's reference thresholds. The correlation coefficient (r) in plasma and whole blood samples was 0.980 (pregnant women) and 0.8448 (the suspected ectopic pregnancy group), which confirms good correlation between both variables. The POCT method and the method to determine β -hCG from whole blood have been proven to be practical for diagnostics, treatment and after operative monitoring of this patient subgroup.

Key words: emergent gynaecology condition, ectopic pregnancy, beta human chorionic gonadotropin, PATHFAST™, POCT.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH	adrenokortikotropni hormon (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AFP	alfafetoprotein
ALP	alkalna fosfataza
AMP	adenozinmonofosfat (<i>adenosinemonophosphate</i>)
Ag	antigen
AH	aminokislina
Asn	asparagin
CK	kreatininska kinaza
CK-MB	kreatininska kinaza MB (<i>creatine kinase MB</i>)
CLEIA	kemiluminiscenčna encimskoimunska metoda (<i>Chemiluminescence Enzyme Immuno-Assay</i>)
CTN 1	srčni troponin 1
DNK	deoksiribonukleinska kislina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	encimskoimunska metoda na trdem nosilcu (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FSH	folikle stimulirajoči hormon
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHT	dihidrotestosteron
G-CSF	dejavnik rasti granulocitov (<i>granulocyte colony stimulating factor</i>)
GnRH	gonadoliberin (<i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
GM-CSF	dejavnik rasti granulocitov in makrofagov (<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>)
G-protein	protein G
3β-HSD	3 β -hidroksisteroid
hCG ali β-HCH	humani horionski gonadotropin
hCGn	razcepljeni humani horionski gonadotropin (<i>nicked human chorionic gonadotropin</i>) beta – core fragment)
hCGβcf	razcepljeni humani horionski gonadotropin beta – jedrni fragment (<i>nicked human chorionic gonadotropin</i>) beta – core fragment)
hs-CRP	C-reaktivni protein visoke ločljivosti

HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)
i. e.	mednarodna enota
IS	mednarodni standard (<i>International Standard</i>)
ITA	invazivni trofoblastni antigen
LH	lutenizirajoči hormon
MW	molekulska masa (<i>Molecular Weight</i>)
PAPP-A	nosečnostno specifični plazemski protein A (<i>pregnancy-associated plasma protein A</i>)
POCT	izvajanje meritev ob bolnikovi postelji (<i>Point of Care Testing</i>)
PRL	prolaktin
Pt	protitelo
PTH	paratiroidni hormon
RIA	radioimunska metoda (<i>Radioimmunoassay</i>)
TRH	tireotropni hormon (<i>thyrotropin releasing hormone</i>)
TSH	tirotropin
TFGH	spreminjajoči rastni faktor (<i>transforming growth factor</i>)

SLOVARČEK IZRAZOV

Alfafetoprotein je protein, ki ga izloča plod (ugotavljamo ga iz plodovnice). Uporabljamo ga v sklopu presejalnih testov ali diagnozo genetskih anomalij za prenatalno diagnostiko verjetnosti pojava anomalij pri plodu. (1)

Amniocenteza je invazivna diagnostična metoda za prenatalno ugotavljanje genetskih okvar in anomalij ploda. Zdravnik pod nadzorom ultrazvoka zabode iglo skozi trebušno steno v plodovnico in odvzame vzorec amnijske tekočine za analizo. Običajno se jo izvede med 15. in 17. tednom nosečnosti. (1)

Anencefalija je odsotnost večjega dela možganov in lobanje pri plodu. (1)

Antigen je katerakoli telesu tuja snov, ki je sposoben izzvati imunski odziv in potem reagirati, npr. z antigeno specifičnimi protitelesi in/ali aktiviranimi limfociti T. (2)

Gameta je spolna celica.

Gestacijska starost otroka je trajanje nosečnosti od prvega dne zadnje normalne menstruacije nosečnice. Ugotavljamo jo z ultrazvočnimi pregledi, s katerimi pridobimo podatke o parametrih rasti plodu.

Gonadoliberin je peptidni nevrohormon, ki se sprošča iz hipotalamusa v hipofizni portalni sistem in sproži sintezo in izločanje gonadotropinov. (2)

Hidatidna mola je tumorska rašča, ki nastane iz tkiva posteljice. Razvije se lahko iz celic, ki ostanejo po splavu ali porodu. Najpogosteje se razvije iz oplojenega jajčeca, kot samostojna normalna rašča (molarna nosečnost). Če je zarodek normalen, se posteljica redko spremeni. Več kot 80 % hidatidnih mol ni rakavih, 15 % pa jih vrašča v sosednja tkiva (invaziven mole), 2-3 % pa se jih razširi po telesu (horiokarcinom). Tveganje za pojav hidatidne mole je največje pri ženskah, ki zanosijo v poznih tridesetih in zgodnjih štiridesetih letih.

Horiokarcinom je rakava sprememba celic horiona. Lahko se spremenjene celice horiona nahajajo samo v maternici (lokalizirana), oziroma so spremenjene celice raširjene po telesu.

Horionska biopsija je metoda za prenatalno diagnostiko verjetnosti anomalij pri plodu. Zdravnik odvzame košček horionskih resic, ki so del posteljice in sicer na dva načina (transcervikalno ali transabdominalno). Izvajamo jo običajno med 10. in 12. tednom nosečnosti. Z njo lahko nadomestimo tudi amniocentezo, v kolikor izrecno ne potrebujemo vzorca plodovnice. Glavna prednost te metode je, da so izvidi preiskave na voljo veliko

bolj zgodaj v nosečnosti kot izvid amniocenteze. V primeru ugotovljenih anomalij nam to omogoča uporabo preprostejših in varnejših metod za prekinitev nosečnosti oziroma za primerno zdravljenje ploda še pred rojstvom. (1)

Interni standard je snov ali spojina, ki se doda vzorcu zaradi korekcije napak, ki nastanejo med pripravo in analizo vzorca (*internal standard*). (2)

Kemiluminiscenca je pojav svetlobe pri kemični reakciji. (2)

Kordocenteza je postopek odvzema krvi iz plodove popkovnice. (1)

Kuldocenteza je postopek, kjer zdravnik prebode zadnji nožnični obok in aspirira tekočino iz Douglasovega prostora ter preuči njeno sestavo (pregled tekočine za prisotnost krvi, gnoja, trombov, ascitesa); nekoč je bil postopek pogosto uporabljen pri sumu na izvenmaternično nosečnost, danes pa se uporablja pri punkciji ogojnikov v jajčnikih in jajcevodih ter predvsem pri punkciji foliklov ter aspiraciji v procesu IVF.

Negativna povezanost (*ang. negative correlation*) obstaja takrat, kadar so vrednosti prve (x) spremenljivke visoke in vrednosti druge (y) spremenljivke nizke oz. obratno. Tedaj je koeficient negativen in blizu -1.

Nevrulacija je ključno obdobje za razvoj simetričnih, celostnih možganov in poteka od 4. tedna dalje.

Paratiroidni hormon (polipeptidni hormon) je navadno funkcionalni antagonist kalcitonina, ki ga izločajo ob ščitnične žleze in vzdržuje normalno koncentracijo kalcija v plazmi z delovanjem na ledvice, prebavila in kosti) (2)

Periventricularne možganske strukture so tkiva ob možganskih ventriklih. (3)

Pozitivna povezanost (*ang. positive correlation*) obstaja takrat, kadar so vrednosti prve (x) in druge (y) spremenljivke visoke oz. nizke. Tedaj je koeficient pozitiven in blizu 1.

Prenatalno obdobje je obdobje od oploditve do zaključka nosečnosti oziroma do poroda. Delimo ga na predembrionalno obdobje (od oploditve do konca 3 tedna nosečnosti), embrionalno obdobje (od začetka 4. tedna nosečnosti do konca 8. tedna nosečnosti) in fetusno obdobje (od začetka 9. tedna nosečnosti do konca nosečnosti oz. do poroda).

Prvorodnica (primipara) je ženska, ki bo prvič rodila

Serumski biomarker je molekula snovi, ki jo lahko zaznamo v serumu preiskovanke. Prisotnost molekule, ki jo tvori preiskovanka kaže na prisotnost bolezni ali motnje.

Sinapsogeneza je nastajanje sinaps, povezav med nevroni. Sinapsa je stik med sosednjima živčnima celicama, kjer se vzburljenje ali zavora vzburljenja prevaja z nevrona na nevron, ali stik med nevronom in efektorjem.

Spina bifida je nepopolno zraščena hrbtenjača pri plodu. (1)

Standardni dodatek je metoda za določanje nizkih koncentracij analita, pri kateri se analizirajo alikvoti istega vzorca, ki vsi, razen prvega vsebujejo različne dodatke standarda analita (*standard addition*). (2)

Tirotropin je hormon sprednjega režnja hiofize, ki spodbuja delovanje ščitnice).

Validacija metode je dokumentirani postopek preskusov metode, ki zagotavlja njeno primernost za analizo predvidenih vzorcev in vključuje dokaze specifičnosti, točnosti, natančnosti, linearnosti, robustnosti, meje določitve in meje zaznavnosti (*method validation*). (2)

Verniks je bela, mazasta prevleka kože pri plodu in novorojenčku. (3) Sestavljen je iz odluščenih epitelnih celic, lanugo dlačic in izločkov nezrelih lojnic v koži, ki plod varuje pred neugodnimi vplivi plodovnice, ob slučajnem prezgodnjem porodu pa pred škodljivimi vplivi iz okolja.

1. UVOD

1.1. Nosečnost

1.1.1. Normalna nosečnost

Nosečnost je stanje, ko ženska v maternici nosi plod in traja od oploditve do poroda, ko plod zapusti maternico. S stališča razvijajočega se otroka pa govorimo o perinatalnem obdobju. Po definiciji SZO zdrava in normalna nosečnost matere z enim otrokom traja od 37. - 42. tedna (41 tednov + 6 dni). (1)

Med fazo dozorevanja jajčeca pri ženski, terciarni folikel dozori v Graafov folikel in v njem poteka mejoza (prva redukcijska delitev). Druga mejoza poteče v zrelem Graafovem foliklu in nastane ženski pronukleus. (4) Pri oploditvi praviloma sodeluje le en spermatozoid, včasih pa jih prodre v protoplazmo jajčeca tudi več. Ooplazma je praviloma viskozna zato se spermatozoid počasi prebija skozi ooplazmo, dokler ne prispe v neposredno bližino pronukleusa jajčeca. Ob tem se glava spermatozoida spremeni in pretvori v moški pronukleus; hkrati pa se konča druga mejozna delitev in nastane ženski pronukleus; žensko jajčece, ki je pripravljeno na oploditev. (4)

Predpogoj za oploditev in nosečnost je prisotnost zrelega jajčeca in spermija ter normalna anatomsko prehodnost jajcevodov in maternice. Niz sprememb v ženskih spolnih organih pa omogoča normalno prodiranje spermijev, prehrano, gibanje in ugnezditev oplojenega jajčeca. (4) (1)

V normalnem menstrualnem ciklu se ena jajčna celica sprosti (ovulacija) iz enega jajčnika približno 14 dni pred naslednjo menstruacijo. Jajčece iz jajčnika vstopi v lijakasto oblikovani končni del jajcevoda. Do oploditve (začetka nosečnosti) pride, ko normalna semenčica oplodi zrelo jajčno celico ženske, temu pa sledi zlitje protoplazemskih in jedrnih delov gamet. (4) Oplojeno jajčece se nato pomakne proti maternici. Če do oploditve ne pride, jajčece propade in se ob naslednji menstruaciji izloči skozi maternico. Če semenčica prodre v jajčece, ga oplodi in čez niz celičnih delitev sledi razvoj zarodka. Če se sprosti in oplodi več kot eno jajčece, pride do večplodne nosečnosti – običajno so to dvojčki. (1) V tem primeru gre za dvojajčna dvojčka. Enojajčna dvojčka se razvijeta, kadar

se oplojeno jajčece ob prvi delitvi razdeli v dve neodvisni celici. Ob ovulaciji postane sluz v materničnem vratu bolj tekoča, kar omogoča semenčicam hiter vstop v maternico. Seme lahko v 5 minutah doseže lijakasti končni del jajcevoda kjer navadno pride do oploditve. Celice, ki obkrožajo jajcevoda, olajšajo oploditev in kasnejšo delitev oplojenega jajčeca (zigote). Zigota se med pomikanjem po jajcevodu večkrat deli. (1) V maternico vstopi po 3 do 5 dneh, kjer se preoblikuje v blastocisto, votlo kroglico s celicami. Blastocista se običajno ugnezdi v sprednji ali zadnji steni blizu zgornjega dela maternice. Stena blastociste je debela za eno celico, razen v enem delu, kjer je debela za 3-4 celice. (1) Notranji sloj celic v debelejšem delu blastociste se razvije v zarodek, medtem, ko zunanje celice vrastejo v maternično steno in tvorijo posteljico. Posteljica tvori hormone, ki pomagajo vzdrževati nosečnost in omogočajo izmenjavo kisika, hranil in produktov presnove med materjo in plodom. Ugnezdenje se začne med 5. in 8. dnem po oploditvi in se konča 9. ali 10. dan po njej.

Stena blastociste postane zunanja plast ovojev (horion), ki obkrožajo zarodek. Notranja plast ovojev (amnij) se razvije približno 10. do 12. dan in tvori amnijsko vrečo. Ta je napolnjena s čisto (t.i. amnijsko) tekočino (plodovnico) in se širi ter obdaja razvijajoči se zarodek, ki lebdi v njej. Plodovnica zagotavlja prostor v kateri plod lahko raste, obenem pa ga varuje pred poškodbami. Majhne resice (vili) razvijajoče se posteljice se vraščajo v steno maternice in se razvejajo v drevesu podobni obliki. (5) Razvejitev močno poveča stično površino med materjo in posteljico kar omogoča, da več hranil prehaja od matere k plodu in da se produkti presnove vračajo od ploda k materi. (6) Plodove žile, ki potekajo po popkovnici se razvijajo v resicah. (7) Tanka membrana pregrajuje kri zarodka v resicah od materine krvi., ki kroži po v prostorih, ki obkrožajo resice (intervilozni prostori). (5) Posteljica je v 18. do 20. tednu popolnoma razvita, a nadaljuje z rastjo ves čas nosečnosti. Pri porodu tehta približno pol kilograma. (1)

Razvoj zarodka

Zarodek je najprej razpoznaven v blastocisti približno 10 dni po oploditvi. (1) Kmalu zatem se začne razvijati del, iz katerega nastanejo možgani in hrbtenjača (živčna cev), srce in glavne žile pa se začnejo razvijati 16 ali 17. dan. (1) Srce začne 20. dan iztiskati tekočino po žilah in naslednji dan se pojavijo prve rdeče krvničke. (1) Sledi razvoj žil v celotnem zarodku in v posteljici. (1) Organi so popolnoma razviti ob koncu 12. tedna nosečnosti. (1) Plod je sedaj toliko zrasel, da je v celoti zapolnil maternično votlino, zato se

oba konca sluznice zrasteta. (1) Sledi obdobje diferenciacije tkiv in organskih struktur. (1) V zadnjem trimesečju pa plod raste predvsem v dolžino in pridobiva na masi. (1) Običajno je zrel plod dolg okoli 50 cm, tehta pa nekje med 3 do 3,5 kilogrami. (1) Od 37. tedna dalje, je plod donošen in pripravljen za porod (prehod ploda in posteljice iz maternice v zunanji svet). (1)

1.1.2. Patološka nosečnost

Gre za patološka stanja v nosečnosti, ki so običajno posledica naslednjih dejavnikov:

- **Dednih anomalij** (motenj v strukturi ali številu kromosomov).
Poznamo več vrst dedovanja: avtosomno (recesivno ali dominantno), spolno (preko kromosoma X ali Y) ali poligensko (multifaktorsko). Kromosomske aberacije imajo lahko za posledico pojav različnih sindromov (Turnerjev, Downow,...). Čeprav gre na pogled za enako motnjo, pa sta lahko vzroka zanjo, napaka v razvoju embrija ali napaka v dedovanju. (4)
- Napake razvoja plodu v času razvoja organov (**razvojne anomalije**, nastale v prvih 12. tednih razvoja embrija). Običajno so posledica okužb z različnimi virusi, delovanja različnih vrst sevanj, zastrupitev, jemanja nekaterih zdravil. Ker gre za obdobje pospešenega razvoja in diferenciacije tkiv, bo glede na časovno komponento prisotnosti motnje, prizadet ustrezen organski sistem zarodka. (4)
- **Poškodbe plodu od 3 meseca dalje** so lahko posledica toksičnih dejavnikov in različnih okužb, ki prizadenejo plod, posledica različnih deformacij (zaradi pomanjkanja prostora v maternici), posledica zmanjšane prekrvljenosti žilja (plod dobi manj kisika in hranil, počasnejše pa je tudi odplavljanje njegovih produktov presnove). (4)

Kromosomske spremembe

Kromosomske spremembe delimo na:

- nepravilnosti v številu kromosomov (evploidija, anevploidija, mozaicizem, himerizem).

Osnovno število kromosomov v vrsti je haploidno (n). Po oploditvi pa je zigota sestavljena iz diploidnega števila kromosomov ($2n$); po enega iz vsake starševske

linije. Heteroploidna števila so nenormalna števila kromosomov, do katerih pride zaradi poškodb v razporeditvi kromosomov ali kromatid v mejozi ali mitozi. (4)

- nepravilnosti v zgradbi kromosomov (delecije, inverzije, obročasti kromosomi, duplikacije, translokacije).

Vzrok je običajno prečni prelom (spontani ali inducirani) enega ali več kromosomov, pretrgani deli pa se kasneje ponovno združijo zato pride do poškodb linearnega zaporedja dednine. (4)

- kombinirane spremembe (nepravilnosti tako v zgradbi kot v številu kromosomov). (4)

Malformacije plodu

Malformacije plodu odkrijemo lahko bodisi ob rojstvu bodisi kasneje v življenju.

Možni vzroki za malformacije plodu so:

- Lahko posledica kromosomskih napak (Downow sindrom, Turnerjev sindrom)
- Lahko vezani na spol (hemofilija)
- Posledica škodljivih eksogenih dejavnikov v času razvoja jajčeca (sevanja, kemikalij, okužb z različnimi povzročitelji (predvsem je poškodba odvisna od faze razvoja embrija v kateri pride do stika s tem dejavnikom). (4)

Možni diagnostični pristopi so: ultrazvočna preiskava, horionska biopsija, amniografija, zgodnja amniocenteza, rentgensko slikanje, fetoskopija, elektrokardiografija, kardiokotografija. (4)

1.1.3. Zapleti v nosečnosti

Večina nosečnosti poteka normalno, večino zapletov pa je možno zdraviti. Med zaplete nosečnosti sodijo: čezmerno bruhanje (hiperemeza), spontani splav, molarna nosečnost, izvenmaternična nosečnost (za podrobnosti, prosimo, glejte naslednje poglavje), mrtvorojenost, prezgodnji porod, gestacijski diabetes, gestoze (preeklampsija, eklampsija). (1)

1.1.4. Izvenmaternična nosečnost

Pojavnost ene od oblik patološke nosečnosti in sicer izvenmaternične nosečnosti je v večini evropskih držav in v severni Ameriki 2 % glede na vse nosečnosti. (8) Vplivi na pojavnost

so: geografska lega, stopnja razvitosti držav, vrsta preučevane skupine bolnic, uporaba nekaterih kontraceptivov (npr. Mirena®). V ZDA izvenmaternična nosečnost še vedno predstavlja glavni vzrok umrljivosti mater, poleg tega pa lahko zmanjša reproduktivno sposobnost žensk. (8; 9)

Od leta 1987 dalje v Sloveniji zaradi izvenmaternične nosečnosti ni umrla nobena ženska. (10)

Tako v svetu, kot tudi v Sloveniji se je število izvenmaterničnih nosečnosti močno povečalo v 80 in zgodnjih 90 letih (okoli 200 primerov/leto), predvsem zaradi večjega števila spolno prenosljivih bolezni in boljše diagnostike, oziroma zgodnjega odkrivanja izvenmaternične nosečnosti. (10) Danes v UKC Ljubljana (UKCL) beležijo približno 100 izvenmaterničnih nosečnosti na leto. (10)

Izvenmaternična nosečnost se razvije zunaj maternične votline (v jajcevodu, jajčniku, trebušni votlini) ali pa na netipičnem mestu znotraj maternice (maternični rog, maternični vrat). To se zgodi, kadar se oplojeno jajčece ne zasedra normalno v maternico, temveč se prične razvijati nekje drugje v spodnjem delu trebuha. Čeprav je plod take zanositve normalen, se vseeno ne more razviti v fetus. Tako jajčece se največkrat zasedra v jajcevodih, lahko pa se ustavi tudi na jajčnikih ali pa se pritrdi na črevo. Jajčece se ustavi v jajcevodu, če je ta poškodovan, opraskan ali zvit. Izvenmaternična nosečnost je, razen v redkih primerih, največkrat prekinjena z umetno prekinitvijo nosečnosti v bolnišnici ali s spontanim splavom. (10)

Izvenmaternično nosečnost običajno odkrijejo med 5. in 10. tednom nosečnosti in jo umetno prekinejo. V primeru, da takšna nosečnost ostane neprepoznana, pa lahko privede tudi do resnejših komplikacij, recimo do krvavitve. (9) Z rastjo oplojenega jajčeca, počasi pride do širjenja jajcevoda, kasneje pa do njegovega razprtja oziroma trganja. Ker se ob jajcevodih nahaja arterija, je širjenje jajcevodov lahko zelo nevarno, saj lahko pride do natrganja arterije, ki mu sledi hujša krvavitev. Ženska s takšno krvavitvijo lahko brez nujne medicinske pomoči izkrvavi že v 1-2 urah. (10)

Vzroki za izvenmaternično nosečnost

Napačna ugnezditev oplojenega jajčeca je lahko posledica anatomske okvare ali normalnega delovanja jajcevoda, jajčnika ali maternice, ki ovirajo prehod oplojenega

jajčeca v maternično votlino. Incidenca je okoli 20 na 1000 nosečnosti, umrljivost pa 3,8 na 10.000 izvenmaterničnih nosečnosti. (8)

Vzroki

<u>Jajcevod</u> (oviran prenos zarodka)	<u>Zarodek</u>
<u>Medenična vnetna bolezen</u> (neprepoznana in nezdravljena vnetja) in <u>brazgotinjenje tkiva</u> zaradi spolno prenosljivih bolezni (<u>okužba z bakterijo <i>Clamylia trachomatis</i> ali <i>Neisserio gonorrhoeae</i></u>), in <u>predhodnih spontanah/induciranih prekinitev nosečnosti s posegi</u> . (11)	Ugotovili so, da je kar 64 % <u>zarodkov pri izvenmaternični nosečnosti nepravilno razvitih s</u>
<u>Uporaba znotrajmaterničnega vložka</u> , ki zmanjšuje možnost nosečnosti znotraj maternice, ne pa zunaj nje. (11)	<u>pogostimi kromosomskimi nepravilnostmi</u> (10),(12)
<u>Asistirana metoda reprodukcije</u> (hormonski vzroki; in postopki zunajtelesne oploditve (IVF) (11)	
<u>Anamneza predhodnih operativnih posegov v medenični votlini;</u> (11)	
<u>Endometrioza</u> (11)	
<u>Prirojene ali pridobljene nepravilnosti jajcevodov</u> (starost nosečnice nad 35 let) (11)	
<u>Anamneza izvenmaterničnih nosečnosti v preteklosti</u> (ena izvenmaternična nosečnost; incidenca za ponovno ponovitev je 15 %, z vsako dodatno izvenmaternično nosečnostjo incidenca naraste na 30 %). (11)	
<u>Anamneza ovarijskih ali intrauterinih cist ali tumorjev</u> (11)	

Prepoznavna izvenmaternične nosečnosti

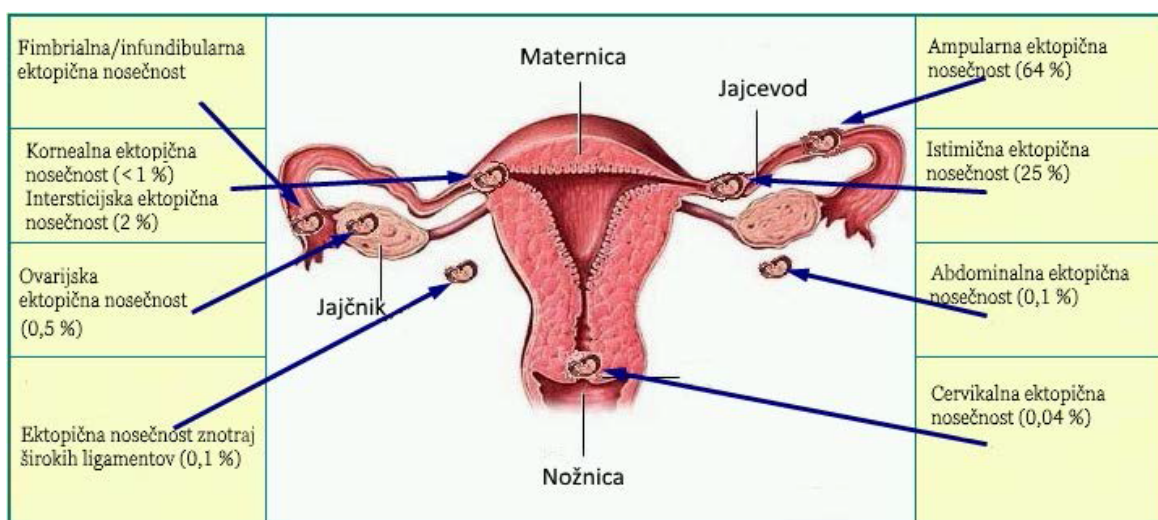
Klinična slika in status

Zgodnja izvenmaternična nosečnost (nekje do 37 dne po oploditvi, pred razvojem kliničnih simptomov) (11)	Napredovala izvenmaternična nosečnost
Težko jo je prepoznati. Zarodek pri zgodnji izvenmaternični nosečnosti lahko odmre in se resorbira, posledično takšna nosečnost ostane neodkrita. (11)	
<u>Običajni znaki so:</u> izostanek menstruacije, občutek napetosti v spodnjem delu trebuha in neredna ter šibka krvavitev, rjavkast izcedek, slabost, nabreklost dojk (11)	<u>Simptomi so podobni simptomom splava;</u> vaginalna krvavitev in bolečina v spodnjem delu trebuha (običajno enostranska). (11) <u>Simptomi, kjer je potrebno takojšnje kirurško ukrepanje:</u> otrdelost trebuha, nehoteno varovanje bolečega predela, huda občutljivost na dotik, znaki hipovolemičnega šoka (tahikardija,

	ortostatska hipotenzija), lahko prisoten kolaps. (11)
<u>Drugi znaki:</u> gripi podobni simptomi, slabost, bruhanje, povišana telesna temperatura, omotica ali oslabelost, boleči gibi zarodka (v primeru napredovale abdominalne nosečnosti), sinkopa, zastoj srca. (11)	<u>Izvidi ginekološkega pregleda:</u> Mehka in rahlo povečana maternica, občutljivost na premikanje maternice ali materničnega vratu, tipljiva masa adneksa, v vagini je lahko prisotna maternična vsebina (zaradi luščenja endometrija). (11)

Možna mesta ugnezditve oplojenega jajčeca pri izvenmaternični nosečnosti

- **V jajcevodu** (najpogosteje, do 98 %) – tubarna nosečnost (10)
- Kjerkoli v **trebušni votlini** – abdominalna nosečnost, nosečnost znotraj širokih ligamentov (10)
- **V jajčniku** - ovarijska nosečnost. (10)
- **V materničnem vratu** – cervikalna nosečnost. (10)



Slika 1: Različni podtipi izvenmaternične nosečnosti (glede na mesto ugnezditve oplojenega jajčeca) in pogostnost pojavljanja; prirejeno po (13)

Diferencialna diagnostična obravnava

Izvajamo jo pri vsaki ženski v rodni dobi s klinično sliko bolečine v trebuhu in/ali nelagodjem v predelu medenice, s prisotno vaginalno krvavitvijo, sinkopo ali nepojasnenim hipovolemičnim šokom. Potrjena okužba sečil izvenmaternične nosečnosti ne izključuje. (11)

1. **Laboratorijski izvidi:** pacientki izmerimo: krvni tlak, srčni utrip, nasičenost arterijske krvi s kisikom (SpO₂), EKG, kvalitativni urinski hCG test (potrditev/zavrnitev) morebitne nosečnosti. (11) V primeru negativnega izvida je možno, da smo pacientki določanje hCG opravili prehitro oziroma je vzorec, odvzet preko dneva preveč razredčen.
V primeru pozitivnega urinskega testa hCG
2. naredimo preiskave celotne krvne slike in **kvantitativno določitev serumskega β-hCG** (običajno opazimo nižjo koncentracijo od pričakovane, glede na druge izvide preiskave pacientke, oziroma ob ponovitvi meritev je dinamika večanja koncentracije β-hCG manjša od 53-66 % v 48 urah (sum na eno od oblik patološke nosečnosti, lahko tudi izvenmaternično nosečnost). (11)
3. Opravimo **ultrazvočno (UZ) preiskavo pacientke** (lahko transvaginalno ali transabdominalno). Če je ob ultrazvočni preiskavi pacientke vidna heterotropična nosečnost, še vedno obstaja verjetnost tudi za prisotnost izvenmaternične nosečnosti. Če z ultrazvočno preiskavo vidimo maso in prosto tekočino, lahko z dokaj visoko gotovostjo ocenimo, da obstaja povečano tveganje za izvenmaternično nosečnost. Ultrazvočni pregled pri izvenmaternični nosečnosti pokaže prazno maternico z zadebeljeno sluznico. Zgolj z ultrazvokom lahko zagotovo potrdimo izvenmaternično nosečnost, če je plod v jajcevodu viden in če zaznamo plodove srčne utripe, kar je znak napredovale izvenmaternične nosečnosti in je danes zelo redko. Skupaj s krvnim testom merjenja koncentracije nosečnostnega hormona β-hCG v serumu pa je zanesljivost diagnoze skoraj stototna (97 %). (11) (8)

Oskrba pacientke

Pacientki na obraz nastavimo kisikovo masko, na hrbtišče roke ji običajno vstavimo 2 intravenski kanili, eno za lajšanje bolečine, drugo po potrebi za nadomeščanje tekočine s kristaloidi in/ali koloidi (oskrba šoka), pacientki redno preverjamo srčni utrip in krvni tlak ter jo nemudoma hospitaliziramo na oddelku za ginekologijo. (11)

Vrste zdravljenja

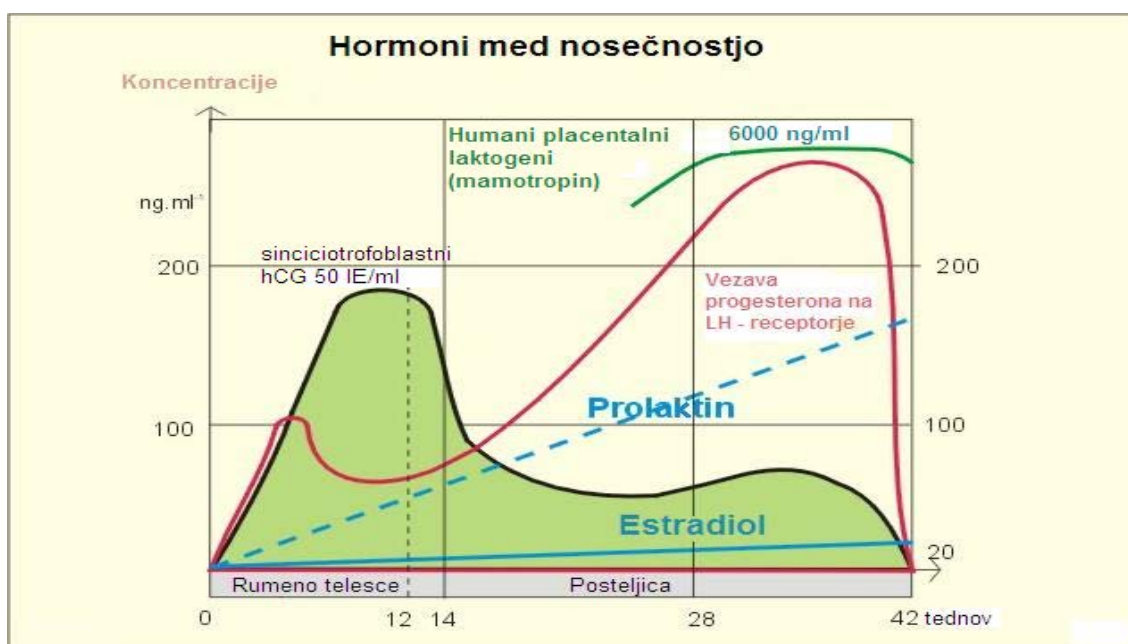
Način zdravljenja je odvisen od starosti ženske, želje po ohranitvi reproduktivne sposobnosti ženske in stopnje okvare prizadetega in neprizadetega jajcevoda. (10)

Zdravljenje je lahko konservativno (prekinitev nosečnosti in ohranitev organa) ali radikalno (odstranitev organa). Konservativno zdravljenje je lahko nekirurško (z metotreksatom) ali kirurško (laparoskopska kirurgija) ter radikalno (laparoskopska kirurgija, klasična kirurgija). (14) (10)

1.2. Hormoni med nosečnostjo

1.2.1. Pričakovane razlike v koncentracijah hormonov

V nosečnosti se v materinem telesu močno spremenita tako razmerje kot tudi koncentracija hormonov. Hormone izločajo nespolne endokrine žleze matere kot odgovor na samo nosečnost in posteljica s svojo endokrino funkcijo. (4) Gibanje koncentracij različnih hormonov med nosečnostjo prikazuje spodnja slika.



Slika 2: Gibanje koncentracije hormonov med nosečnostjo; prirejeno po (15)

1.2.1.1. Nosečnostno specifični hormoni

Hormoni posteljice

Med nosečnostjo tvori posteljica velike količine naslednjih hormonov, ki so nujno potrebni za vzdrževanje nosečnosti: humanega horionskega gonadotropina, progesterona, estrogena in humanega laktogena. (16)

- humani horionski gonadotropin (hCG); (podrobneje predstavljen v nadaljevanju) med nosečnostjo tvori zoreča posteljica, ki se postopno vrašča v sluznico maternice. Sproži delovanje drugih hormonov, potrebnih za vzdrževanje nosečnosti in preprečevanje menstruacije. (17)
- progesteron; sodeluje pri uravnavanju menstrualnega cikla. Med nosečnostjo se koncentracija progesterona močno zviša. Najprej ga tvorijo jajčniki, kasneje pa posteljica. Progesteron je pomemben za vzdrževanje nosečnosti (preprečuje premočno krčenje maternice, vzdržuje funkcije posteljice, krepi medenične stene in sodeluje pri pripravi dojke na dojenje. (17)
- estrogen; sodeluje pri uravnavanju menstrualnega cikla. Med nosečnostjo pa se koncentracija estrogena močno zviša. (7) V zgodnji nosečnosti estrogen sodeluje pri pripravi maternične sluznice na nosečnost (povečano nastajanje krvnih žil in žlez), povečanju količine krvi (zmanjšanju hematokrita), bolj izraženem zardevanju ali pordelosti kože. (17) (7)
- humani placentarni laktogen (hPL - mamotropin); pod vplivom estrogena nastaja v posteljici v velikih količinah. Močno vpliva na otrokovo rast (sprememba presnove matere v smeri tvorbe proteinov in sladkorjev), stimulira razvoj mlečnih izvodil v dojkah, kasneje pa tvorbo mleka. (18) (7)

Ostali hormoni

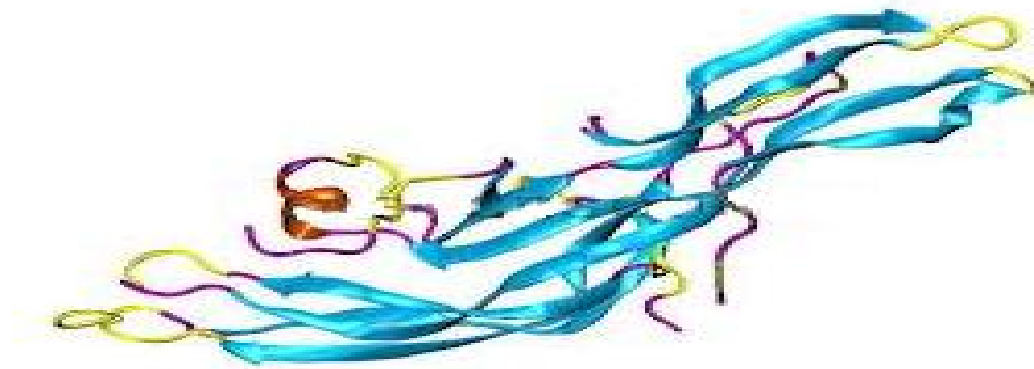
- eritropoetin; nastaja v ledvicah. Povzroča porast števila rdečih krvničk in povečuje količino krvne plazme. (17)
- relaksin; deluje predvsem na mišično-skeletni sistem in povzroča rahljanje sklepov, ohlapnost sklepnih ovojnic in vezi, zmehčanje materničnega vratu. (19)
- oksitocin; izloča se kot odgovor na raztezanje materničnega vratu med porodom, po porodu pa povzroča dodatno krčenje maternice. Izloča se tudi kot odgovor na draženje prsnih bradavic med dojenjem. Povzroča refleks izločanja mleka. (17)

- prolaktin; pomemben je, ko se prsi pripravljajo na dojenje. Pri dojenju spodbuja nadaljnje nastajanje mleka v mešičkih, spodbuja rast otroka. (17)
- Hormoni hipofize, hormoni nadledvičnih žlez, ščitnični hormoni, hormoni paratireoidnih žlez. (4)

1.2.2. Humani horionski gonadotropin (hCG)

HCG uporabljamo za ugotavljanje nosečnosti. (20) (21) Na začetku nosečnosti progesteron stimulira nastajanje hCG v rumenem telescu. HCG je glikoproteinski hormon (GPH), kamor spadajo še LH, TSH, FSH. (22) Vsi glikoproteini so heterodimeri, ki se razlikujejo v α - podenoti (α -hCG) in v β -podenoti (β -hCG). α - podenota vsebuje 92 aminokislin in je skupna vsem hCG, β -podenota je pri vsakem hormonu različna. (22) LH- β vsebuje 121 aminokislin, medtem, ko hCG- β vsebuje 145 aminokislin. (22) Razlika 24 aminokislin se pri hCG- β imenuje C-terminalni peptid (CTP). (22) Zaradi β -podenote ima vsak od teh hormonov različno biološko aktivnost. (23) Posamezne enote (α in β) nimajo biološke aktivnosti. (21) Po vezavi v skupen kompleks hCG (α in β skupaj) postanejo aktivne. (22)

- HCG β core – fragment (hCG- β cf) – hCG- β cf vsebuje dve polipeptidni verigi, ki sta povezani preko disulfidne vezi. V urinu nosečnic so velike količine hCG- β cf, medtem, ko ga v serumu ne moremo določiti. (22)
- Povprečna molekulska masa celotnega hCG je 37500. (23) Molekulska masa α -hCG je 14000 od tega je masa peptidnega deleža 15532. (21) Molekulska masa hCG, ki ga tvorijo kancerogeni trofoblasti je višji od nosečnostnega hCG (22) To lahko pojasnimo s tem, da ima hCG ki ga tvorijo kancerogeni trofoblasti vezanih več ogljikovih hidratov.



Slika 3: Slika molekule hCG; prirejeno po (23)

Molekula hCG je sestavljena iz peptidnega dela (aminokislina) in ogljikohidratnega sladkornega dela. (23) Poleg osnovnega celotnega hCG (α -hCG in β -hCG) lahko v krvi najdemo več različnih oblik hCG. (22)

- hCG- α – brez biološke aktivnosti. Najdemo ga v krvi, zlasti pri rakavih boleznih (22)
- hCG- β – brez biološke aktivnosti. Najdemo ga v krvi in urinu v nosečnosti in pri rakavih boleznih. Predvsem ga uporabljamo za določanje nosečnosti. (22)
- hCG n – razcepljen hCG. Na hCG vezane peptidne vezi med aminokislinama 44 in 48. Omenjeni hCG se lahko pojavu tudi v serumu bolnikov z rakom. Del hCG- β , izoliran iz urina je tudi v hCG- β n obliki. (22)

1.2.3. Funkcija hCG

HCG uravnava svoje delovanje preko LH/hCG receptorjev (lutenizirajoči/ humani horionski receptorji). Njegova najpomembnejša naloga je ohranjanje tvorbe progesterona, ki ga v zgodnji nosečnosti izločajo citotrofoblasti rumenega telesca. Tudi različna druga tkiva svoje delovanje uravnavajo preko receptorjev LH/hCG. Prisotnost teh receptorjev v žilju maternice pa lahko kaže na to, da hCG vpliva tudi na fiziološko delovanje maternice. Veliko receptorjev LH/hCG je prisotnih tudi v drugih tkivih, vendar je njihova vloga tam drugačna in ne povsem pojasnjena. (22)

HCGh imenujemo tudi invazivni trofoblastni antigen (ITA), tvorijo pa ga eritroblasti med nosečnostjo. Čeprav imajo te celice invazivne lastnosti, pa drugih receptorjev, poleg LH/hCG zaenkrat niso odkrili. (22)

β -hCG nima hCG aktivnosti, vendar raziskave kažejo, na potencialno vpletenost v stimulacijo rasti celic sečnega mehurja. Protitelesa β -hCG. pa rast teh celic zavirajo. Čeprav mehanizem delovanja ni povsem poznan, študije na živalih kažejo, da bi bil lahko β -hCG. vključen v zaviralne učinke rasti transformirajočega rastnega faktorja (TGF), PDGF (iz trombocitov razvitega rastnega faktorja)-B in faktorja rasti živčnih celic (22)

α -hCG (GPH α) stimulira tvorbo prolaktina v decidulanih celicah (celice endometrija maternice v nosečnosti). Endometrijske celice spodbudijo predvsem delitev hCG v podenote. Progesteron in sproščeni α -hCG lahko nadzorujeta decidualizacijo (nastajanje) teh celic. (22)

1.2.4. Metabolizem hCG

Očistek hCG iz telesa so preučevali z modeli eksogenega (injekcija hCG) in endogenega (prisoten zaradi nosečnosti) hCG ter β -hCG. (24)

Očistek hCG lahko opišemo z dvofaznim (eksogeni) ali trofaznim modelom (endogeni).

Za eksogeni hCG: (hitra faza; $t_{1/2} = 5-6$ ur, počasnejša faza; $t_{1/2} = 24-33$ ur). (22)

Za endogeni hCG (po porodu/prekinitvi nosečnosti): $t_{1/2 (1)} = 3,6$ ur; $t_{1/2 (2)} = 18$ ur, $t_{1/2 (3)} = 53$ ur (cca 2 dni). (22)

Očistek β -hCG.

Za eksogeni β -hCG: (hitra faza; $t_{1/2} = 0,7$ ure, počasnejša faza; $t_{1/2} = 10$ ur). (22)

Za endogeni β -hCG: $t_{1/2 (1)} = 1$ ura; $t_{1/2 (2)} = 23$ ur, $t_{1/2 (3)} = 194$ ur (cca 8 dni).(vsebnost β -hCG v celotni vrednosti hCG ob zaključku nosečnosti (ne glede na vzrok naraste iz začetnih 0,8 % ob zaključku nosečnosti na 27 % po treh tednih). (22)

Očistek α -hCG.

Z eksogeni α -hCG, je razpolovni čas 0,1-0,22 ur in 1,2-1,3 ure. (22)

Z endogeni α -hCG, so razpolovni časi 0,6 ure, 6 ur, 22 ur. (22)

Razpolovni čas α -hCG je krajši od β -hCG. Po koncu nosečnosti je α -hCG med 0,6; 6 in 22 ur. Ta razpolovni čas je daljši kot po vbrizganem prečiščenem α -hCG, ki je med 0,1 in 0,22 ter 1,2 in 1,3 ur. (22)

Možna vzroka za odstopanja med eksogenimi in endogenimi podenotami sta:

- Delna denaturacija med postopkom priprave prečiščene eksogene oblike (večja hitrost presnavljanja v telesu). (22)
- Razlike v stopnji glikozilacije (različne oblike endogenih podenot). (22)

Glavna presnovna pot hCG poteka skozi jetra, 20 % pa se ga izloči skozi ledvica. (24) Večji del hCG se pri izločanju razgradi v podenote, zlasti v hCG- β cf. (24) Na začetku nosečnosti je razmerje hCG- β cf v urinu nizko po približno 5. tednu pa začne presegati vrednosti hCG. (22) V drugem trimesečju je okoli 80 % hCG imuno odzivnosti v urinu sestavljene iz hCG- β cf. Med nosečnostjo lahko zaznamo hCG- β cf v plazmi vendar je njegova koncentracija le 0,1 % vrednosti celotnega hCG (24). Po vbrizganju β -hCG je možno hCG- β cf zaznati v urinu. Zaznamo ga lahko tudi v hipofizi, folikularni in trofoblastni tekočini. Nekaj hCG- β cf se pokaže tudi v placenti. Nekateri hCG- β cf lahko izvirajo iz presnove v zgoraj omenjenih tkivih. (22)

1.2.5. β -hCG krvni testi

β -hCG krvni testi so lahko kvantitativni ali kvalitativni. (20) Uporabljamo jih za ugotavljanje nosečnosti, preverjanje anomalij v nosečnosti (molarna nosečnost, ugotavljanje nepravilnosti v nosečnosti (npr. izvenmaternična nosečnost, Downov sindrom) ali za testiranje β -hCG v povezavi z nekaterimi rakavimi boleznimi. (25) (20)

Vrednosti β -hCG v krvi se uporabljajo kot presejalni testi za prisotnost anomalij v nosečnosti (v materinem serumu trojni in četverni presejalni testi) in se običajno izvajajo med 15 in 20 tednom nosečnosti. (4) Z njimi preverjamo vrednosti treh oziroma štirih parametrov v krvi nosečnic. Trojni presejalni test vključuje: α -fetoprotein (AFP), β -hCG in prosti estriol (nekonjugirani estriol ali uE3). Četverni presejalni test vključuje: AFP, β -hCG, prosti estriol (nekonjugiran estriol ali uE3) ter nivo hormona inhibina A. (4) (26)

Laboratorijske vrednosti preiskovanih parametrov skupaj s starostjo in drugimi faktorji so zdravniku v pomoč, pri določanju verjetnosti za pojav morebitnih zapletov ali prirojenih napak pri otroku. (22) (27)

V nekaterih primerih je kombinacija presejalnih testov opravljena v prvem trimesečju z namenom določitve Downovega sindroma. Presejalni test uporablja ultrazvočne meritve debeline kože fetusovega vratu (nuhalna svetlina) in krvne test za določanje vrednosti nosečniškega hormona β -hCG in proteina PAPP-A. (27)

1.2.6. Uporaba urinskih testov β -hCG

1.2.6.1. Hitri testi za ugotavljanje nosečnosti (za domačo rabo)

Kvalitativni hitri urinski testi za domačo uporabo se uporabljajo za odkrivanje prisotnosti β -hCG v vzorcu urina. Testna paličica je prevlečena z anti- β -hCG-Pt na katere se veže β -hCG iz urina. V primeru prisotnosti β -hCG se prikažeta bodisi dve modri črti ali plus, odvisno od vrste testa.

1.2.6.2. Laboratorijski testi za ugotavljanje nosečnosti

Kvalitativni laboratorijski urinski testi se uporabljajo za presejalno odkrivanje prisotnosti β -hCG v vzorcu urina, ki ob odsotnosti menstruacije pri ženski lahko služi za ugotavljanje nosečnosti. Ne glede na znatna odstopanja referenčni vrednosti β -hCG v urinu v populaciji žensk, pa je prednost teh testov predvsem cenejša izvedba testa in njegova dostopnost na oddelkih nujne medicinske pomoči, predvsem v nočnih urah, ko morda ni mogoče opraviti krvnih preiskav v laboratoriju.

1.2.6.3. Faktorji vpliva na rezultate urinskega testa za β -hCG

Na rezultate urinskega testa β -hCG vplivajo: prezgodnje opravljanje urinskega testa, preveč razredčen urin, po prekinitvi nosečnosti/zdravljenju neplodnosti (zvišane vrednosti β -hCG do 4 tedne), prisotnost krvi v urinu, jemanje določenih zdravil.

1.2.7. Metode določanja β -hCG

β -hCG lahko določamo z različnimi metodami. Možne metode so: RIA, ELISA, kemiluminiscenčna metoda in CLEIA (28) (metoda je podrobneje opisana v poglavju Materiali in metode (princip izvajanja analize).

2. NAMEN DELA

2.1. *Izhodišča*

Nekateri bolj enostavni laboratorijski postopki za določanje biokemičnih parametrov v heparinizirani polni krvi omogočajo hitro opravljanje laboratorijskih testov brez uporabe zapletenih instrumentov ali visoko usposobljenega osebja. (29) Najpogosteje s temi postopki spremljamo koncentracijo holesterola v krvi, koncentracijo glukoze v krvi pri sladkornih bolnikih, izvajamo meritve v obdobju spremljanja ustreznosti antikoagulantne terapije. V sklopu urgentnih preiskav pa v to skupino vsekakor sodi določanje vrednosti srčnih označevalcev (troponina I) in hormonov (β -hCG).

V Sloveniji so raziskovalci izvedli študijo o uporabnosti POCT analizatorja (PATHFASTTM) v urgentni ginekološki ambulanti za testiranje nosečnosti in sicer so merili vrednosti β -hCG v polni krvi pri ženskah s sumom na izvenmaternično nosečnost. Določili so celoten čas, potreben od naročila, izvedbe, do rezultata analize (TAT) in ocenjevali stopnjo zadovoljstva osebja (klinika, medicinske sestre). (29)

Ugotovili so, da je celotni čas, potreben za izvedbo vseh faz (TAT) 220 minut (klasični centralni laboratorij) in da je mogoče z uporabo POCT analizatorja ta čas pomembno skrajšati, s tem pa tudi skrajšati čas obravnave pacientk v urgentni ginekološki ambulanti. (29)

2.2. *Cilji diplomske naloge*

Ker do sedaj ni bilo na voljo podatka za specifično podskupino nosečnic, s sumom na izvenmaternično nosečnost, želimo ugotoviti, na kakšen način in v kakšni meri bomo lahko s primerjanjem koncentracij β -hCG v serumu in polni krvi na POCT analizatorju PATHFASTTM, pri teh pacientkah diagnozo izvenmaternične nosečnosti potrdili ali ovrgli. β -hCG je najpomembnejši parameter za odkrivanje nosečnosti v primerih, ko je potrebno čimprej pridobiti rezultat. Npr. v urgentni ginekološki ambulanti je čas, potreben za analizo vzorca krajši, če je analiza opravljena iz polne krvi, saj se izognemo fazi centrifugiranja vzorca z namenom pridobitve vzorca plazme.

Za vrednotenje dobljenih vrednosti koncentracije β -hCG v skupini pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost, bomo najprej izvedli **delno validacijo metode** za določanje β -hCG v polni krvi in v serumu, kjer bomo uporabili kontrolne materiale in izračunali korelacijo rezultatov med plazmo in polno krvjo. Pred dejanskim začetkom izvajanja

meritev pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost, bomo v obdobju enega meseca izvajali meritve vzorcev nosečnic, brez dodatnih kriterijev za vključitev v skupino. Na ta način bomo najprej pridobili podatke o primernosti metode za analizo predvidenih vzorcev. Analiza bo vključevala določitev specifičnosti, točnosti, natančnosti, linearnosti, morebitne linearnosti razredčitve, robustnosti, meje določitve in meje zaznavnosti uporabljene metode.

Glede na to, da za izvajanje meritev na POCT aparatu PATHFAST™ ni potrebno ustrezno strokovno predznanje oziroma posebne kvalifikacije, nas bo zanimalo ali bodo rezultati meritev, ki jih bomo izvedli na analizatorju, primerljivi s priporočenimi referenčnimi vrednostmi proizvajalca. V primeru večjih odklonov bomo poiskali vzroke za morebitne napake, jih poskušali odpraviti in nato ponovno izvesti dodatne meritve.

Predpostavljamo, da bo uporabljena metoda primerna tudi za vrednotenje izmerjenih vrednosti koncentracij β -hCG v plazmi in v polni krvi pri izbrani skupini pacientk, t.j. nosečnic, z ugotovljenimi težavami v poteku nosečnosti, s sumom na morebitno izvenmaternično nosečnost, v urgentni ambulanti UKC Ljubljana (UKCL). Meritve bomo izvajali skozi daljše časovno obdobje. Na ta način bomo izvedli zadostno število meritev in ovrednotili zadostno število pacientk s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti, spremljali pa bomo tudi laboratorijske vrednosti teh pacientk po prekinitvi nosečnosti.

Nato bomo primerjali odčitane in izračunane rezultate pridobljene z validacijo metode, z rezultati meritev pri specifični skupini pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost. Dobljene rezultate bomo ovrednotili tudi glede na priporočene referenčne vrednosti proizvajalca, oziroma glede na literature vrednosti za posamezne statistične parametre.

Razložili bomo morebitne odklone posameznih statističnih parametrov glede na želene cilje raziskave, ocenili bomo uspešnost metode pri čimprejšnjem oziroma pravočasnem diagnosticiranju dejanske izvenmaternične nosečnosti pri pacientkah.

Pri pacientkah s potrjenim sumom na izvenmaternično nosečnost bomo preverili, ali izmerjene vrednosti koncentracije β -hCG v plazmi in polni krvi zadostno prikažejo trend postopnega upada koncentracij β -hCG po spontani ali inducirani prekinitvi nosečnosti. Izmerjene vrednosti bomo primerjali z referenčnimi vrednostmi razpolovnih časov za hCG in β -hCG v polni krvi in v plazmi.

Zanimalo nas bo tudi ali je bila glede na pravočasno diagnostiko izvenmaternične nosečnosti, kirurška obravnava oz. ustrezno zdravljenje pacientk uspešno do te mere, da sta bili pri teh bolnicah ohranjeni reproduktivna sposobnost in funkcionalnost rodil.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1. Validacija metode

Najprej smo prostorsko, časovno opredelili populacijo preiskovank in postavili kriterije primernosti za vključitev v skupino.

Za validacijo metode smo uporabili presežne vzorce rutinskih preiskav nosečnic v rodni dobi, ki jim je ginekolog v ambulanti Ginekološke klinike v Ljubljani ali v urgentni ginekološki ambulanti UKC v Ljubljani (UKCL), odredil preiskavo vrednosti β -hCG, brez dodatnih pogojev za vključitev v skupino.

Analizirali smo 100 vzorcev iz polne krvi in iz plazme (v obdobju od 1.12.2014 do 31.12.2014) ter jih uporabili za izračun korelacije, enačbe regresijske premice in primerjavo rezultatov med aparatoma PATHFAST™ (POCT analizator) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator). Ostale vzorce, ki so nam ostali pa smo uporabili za analizo ponovljivosti znotraj dneva, ponovljivosti med dnevi, analizo občutljivost, funkcionalno občutljivost in linearnost razredčitve.

3.2. Ugotavljanje vrednosti β -hCG v polni krvi

Predstavitev skupine preiskovank

Preiskovanke v tej skupini so bile nosečnice v rodni dobi, stare od 19 do 44 let, ki jim je ginekolog v ambulanti Ginekološke klinike v Ljubljani ali v urgentni ginekološki ambulanti UKC v Ljubljani (UKCL), ugotovil težave v poteku nosečnosti, oziroma je pri njih obstajal sum na patološko nosečnost ter jim odredil preiskavo β -hCG. Z diagnostičnimi metodami smo poskušali ugotoviti, ali gre v njihovem primeru za izvenmaternično nosečnost ali lažno znižane rezultate glede na normalne rezultate ultrazvočne preiskave in z urinskim testom β -hCG potrjeno nosečnost.

Iz polne krvi in iz plazme smo v obdobju od 1.1.2015 do 31.8.2015 analizirali 158 vzorcev, 52 različnih pacientk ter jih uporabili za izračun korelacije. Glede na potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti pri 12 pacientkah, smo v rednih časovnih intervalih spremljali trend gibanja koncentracij β -hCG (po umetni prekinitvi nosečnosti). Rezultate smo spremljali približno 4 tedne, do vrednosti β -hCG < 15,0 IU/l (9), oziroma referenčne

vrednosti za β -hCG za nenoseče ženske ($< 5,0$ IU/l). (30) V sklopu spremljanja pacientk po posegu je ginekolog preverjal stopnjo okrevanja in ustrezno funkcionalnost ohranjenih reproduktivnih struktur.

Diplomska naloga je del projekta, za katerega je komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko, asis. dr. Tanji Premru Sršen, dr. med., Ginekološka klinika Ljubljana, izdala dovoljenje za zbiranje in obdelavo vzorcev nosečnic, pri katerih je bil opravljen ultrazvočni pregled pacientk in laboratorijsko določanje vrednosti različnih biokemičnih označevalcev (številka dokumenta: KME: 104/04/12).

3.3. Materiali in metode

3.3.1. Priprava vzorca

Medicinsko osebje je preiskovankam po protokolu za venopunkcijo v komercialno dostopne plastične epruvete z antikoagulantom (litijev heparinat) odvzelo 7 ml (31) polne krvi ali krvne plazme.

3.3.1.1. Vzorci seruma

V eni uri po opravljenem odvzemu krvi za vzorce seruma, smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 3000 obratih na minuto (približno 1500 x g), da smo odstranili morebitne neželene delce in zagotovili konsistentnost rezultatov. Iz epruvete smo odvzeli serum in ga takoj postavili na stojalo za analizo.

3.3.1.2. Vzorci polne krvi

Pred začetkom izvajanja analize smo vzorce po potrebi dobro premešali bodisi z roko ali z vortex mešalnikom za zagotovitev primerne homogenosti vzorca.

3.3.2. Analizator PATHFAST™ in postopek analize



Slika 4: Slika namiznega imunoanalizatorja PATHFAST™; prirejeno po (31)

Vse analize smo opravili na POCT analizatorju PATHFAST™, izdelovalca Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc. ter v skladu s priročnikom za operaterje. V času analize smo izvajali predpisana vzdrževalna dela (kalibracije in kontrole kakovosti) ter potrebno čiščenje.

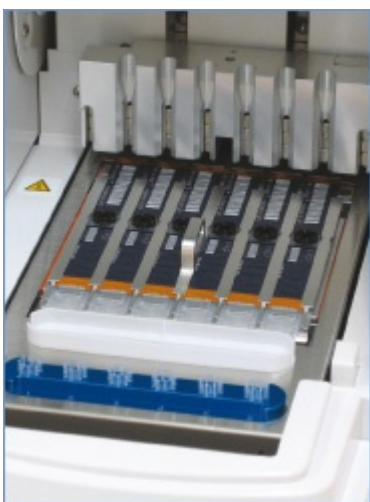
Za delo na analizatorju smo uporabili PATHFAST™ testni reagentni komplet istega izdelovalca, sestavljenega iz reagentnih kartuš, kalibratorjev in raztopine za raztapljanje.

Analizator PATHFAST™ je avtomatski kompakten namizni imunoanalizator, ki združuje postopno kemiluminiscenčno tehnologijo in patentirano tehnologijo Magtration®.

Princip tehnologije Magtration® je magnetna filtracija, ki z ločitvijo magnetnih delcev omogoča določanje samo tarčnih molekul, z zelo poenostavljenim principom pa zmanjšuje tveganja, ki so običajno povezana z avtomatiziranimi postopki.

Analizator ima majhno maso (33 kg) in je kot tak primeren za izvajanje analiz v laboratorijih, bolnišnicah, ambulantah, zdravstvenih domovih,... Analizator deluje avtomatsko, zato osebje, ki z analizatorjem rokuje ne potrebuje posebnih sposobnosti ali potrdil o usposobljenosti za rokovanje.

Analizator je uporaben zaradi zagotavljanja hitrih kvantitativnih rezultatov na mestu obravnave in oskrbe preiskovanke (POCT). Zagotavlja hitro diferencialno diagnozo in je enostaven za uporabo. Zaradi izjemne natančnosti je ta analizator primeren za uporabo v kardiologiji, intenzivni negi in na oddelku nujne medicinske pomoči.



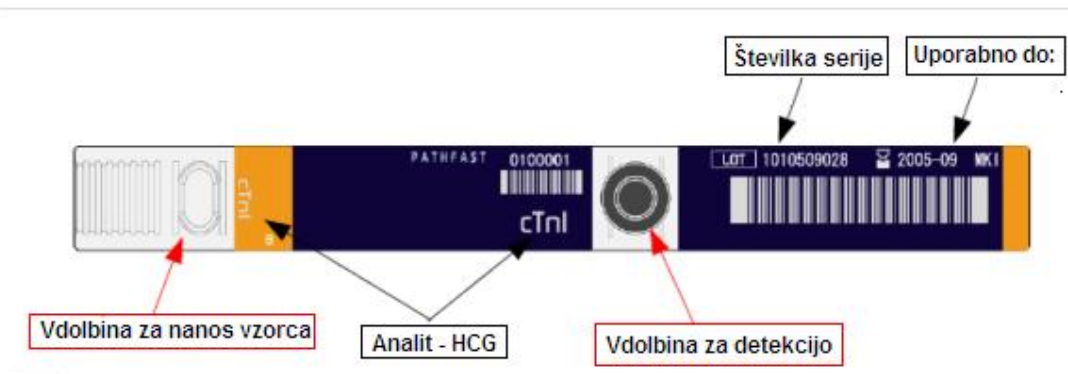
V primeru analize enega analita je rezultat na voljo že po 17 minutah, v primeru analize 6 analitov hkrati pa je rezultat na voljo v 26 minutah. V analizator lahko zložimo 6 vzorcev in reagentov hkrati, kot prikazuje slika 5. Vsi testi so medsebojno združljivi in jih lahko izvajamo sočasno. Priklop aparata na omrežje omogoča neposreden prenos podatkov v centralni laboratorij in dostopanje do rezultatov iz katerega koli računalnika.

Slika 5: Notranjost imunoanalizatorja PATHFAST™; prirejeno po (32)

3.3.2.1. Postopek analize

Iz analizatorja smo odstranili stojalo za kartuše z reagenti in vanj vstavili kartušo za analizo β -hCG. V vdolbino za vzorec na kartuši za reagente smo nanegli približno 100 μ L vzorca, ki je lahko polna krvi, plazma ali serum. Polno kri smo nakapljali, plazmo pa odpipetirali v vdolbino kartuše za reagente. Stojalo smo vstavili nazaj v analizator, dodali PATHFAST™ nastavka za pipete. Zaprli smo pokrov analizatorja in pritisnili na gumb START. Med analizo smo lahko ročno ali s pomočjo optičnega ročnega PATHFAST™ čitalca v bazo vnesli podatke o preiskovankah. Ko smo analizirali polno kri pa smo v bazo vnesli še podatke o vrednostih hematokrita. Aparat zazna polno kri in upošteva vrednost hematokrita v rezultatu (prednastavljena vrednost hematokrita je 40 %). (31)

Reagentne kartuše imajo 16 vdolbin, od katerih je 9 praznih, 7 pa jih je napoljenih z ustreznimi reagenti. Vse vdolbine, razen vdolbin 1 in 10, so zavarjene z aluminijasto folijo, ki je označena s serijsko številko in imenom analizirane snovi, ter črtno kodo in številko serije, kot prikazuje slika 6.

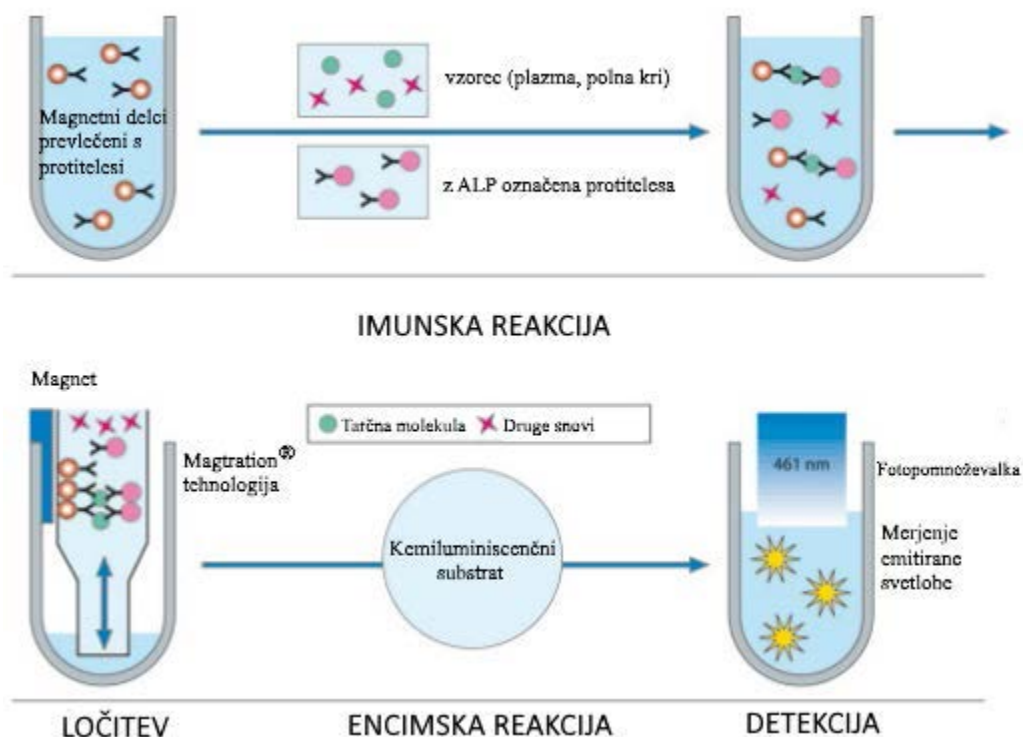


Slika 6: Slika reagentne kartuše za analizo β -hCG; prirejeno po (33)

Med samo analizo se aluminijasta folija preluknja s t.i. enoto za luknjanje, kar omogoča varen prehod konic nastavkov za pipete v reagentne vdolbinice in nanos vzorca v ustrezno vdolbino.

3.3.2.2. Princip izvajanja analize na POCT analizatorju PATHFAST™

Princip delovanja analizatorja vključuje kemoluminiscentno encimsko imunsko analizno tehnologijo (CLEIA) in patentirano Magtration® tehnologijo, ki med posameznimi koraki analize ločuje vezane in nevezane frakcije. (33) (35) Posamezne faze postopka so predstavljene na sliki 7.



Slika 7: Princip delovanja imunoanalizatorja PATHFAST™; prirejeno po (34)

Faze postopka:

Imunoreakcija

- ♀ Vzorcju (polni krvi, plazmi ali serumu) dodamo raztopino magnetnih delcev, prevlečenih s protitelesi (anti-hCG-Mo-Pt) in raztopino z alkalno fosfatazo (ALP) označenih protiteles. Celotno zmes inkubiramo 5 minut, pri temperaturi 35-37 °C.
- ♀ Protitelesa se vežejo z ALP in tvorijo "sendvič" imunokompleks z encimsko označenimi protitelesi (vzorec-anti-hCG-Mo-Pt.hCG) in s protitelesi prevlečenimi magnetnimi delci (magnetni delec-anti hCG-Mo-Pt).

Ločevanje s pomočjo magnetne filtracije

(Magtration® tehnologija (podjetja Precision System Science))

- ♀ V fazi ločitve snovi (brez dodatnega filtriranja in centrifugiranja) se pipeta večkrat pomakne gor in dol. Na ta način se ločijo posamezne snovi, vezane na magnetne delce, od prostih snovi v raztopini. Magnetni delci se v obliki kompleksov vežejo na steno nastavka za pipete, pod pogojem, da je ob steni nastavka za pipete nameščen magnet. Tako odstranimo presežno količino reagentov in ostalih snovi v

zmesi, ki niso predmet določitve analita. Magnetni delci so impregnirani z železom in obdani z anti-hCG-Mo-Pt in se zato vežejo na steno pipete, ostale nevezane komponente pa se počasi eluirajo v vdolbinico za vzorec. To fazo ločevanja večkrat ponovimo s spiranjem z različnimi reagenti.

♀ Na koncu iz kompleksa z raztopno z nizko ionsko močjo ločimo magnetne delce iz kompleksa, pri temperaturi 65°C.

♀ Sledi ločevanje prečiščenih kompleksov Pt-Ag-Pt in prostih magnetnih delcev.

Encimska reakcija in detekcija

♀ Očiščenim kompleksom Pt-Ag se v detekcijski vdolbinici reagentne kartuše doda kemilumiscenčni substrat CDP-Star® (adamantil-1,2-dioksietan fosfat; proizvajalca Applied Biosystems).

♀ Substrat reagira z ALP (vezano na Pt) in dobimo fosfat in metastabilni intermediat, ki nadalje razpade v adamantilni keton in arilni ester. Encimska reakcija traja 1 minuto.

♀ Arilni ester pri prehodu v osnovno stanje odda odvečno energijo v obliki fotonov, ki jih prešteje fotopomnoževalka v PATHFAST™ sistemu za detekcijo (pri valovni dolžini 461 nm; območje delovanja aparata je v območju od 300-650 nm). (33)

♀ Sestavni deli fotopomnoževalke so: katoda, anoda in dinode. Na podlagi interakcije sevanja z reaktivno površino katode pride do tvorbe elektronov, ki pospešeno potujejo naprej do serije dinod in na koncu do anode. Pri potovanju fotoelektronov pride do ojačitve elektronov; vsak fotoelektron producira nekaj dodatnih elektronov in na koncu en foton ustvari 10 elektronov, ki ustvarijo tok.

♀ Signali iz fotopomnoževalke se pretvorijo v napetost in ojačijo. Impulzi se ločujejo na ustreznem binarnem nivoju.

♀ Samo impulzi z večjo napetostjo od referenčne mejne napetosti se ustrezno oblikujejo in preštejejo. Štetje impulzov ali fotonov je uporabno pri zelo nizki intenziteti svetlobe. Analizator lahko zazna majhne količine vzorca, ker uporablja zelo natančno in ponovljivo metodo štetja fotonov. Ima široko merilno območje zaradi avtomatske poravnave zaslonke na primarno intenziteto svetlobe za fotopomnoževalko. (31)

♀ Število prešteti fotonov se nanaša na umeritveno premico, ki je kalibrirana in shranjena v aparatu PATHFAST™. Ker je intenziteta izmerjene svetlobe premo

sorazmerna s koncentracijo določanega analita (β -hCG), lahko iz umeritvene premice aparat izračuna njegovo koncentracijo. Celotni postopek traja 17 minut. (33)

Opomba:

Mi smo izvajali samo merjenje koncentracije enega hormona. Aparat pa lahko iz istega vzorca sočasno analizira do 6 vzorcev. V primerih nujnih ginekoloških stanj bi aparat lahko iz enega vzorca sočasno določil koncentracije tudi drugih, za diagnostiko patološke nosečnosti, pomembnih označevalcev (FSH, estradiola, progesterona, LH, prolaktina, CA-125). (33) (31) Kar je prednost, saj nam zaradi hitre diagnostike skrajša odzivni čas in nam na ta način omogoča več podatkov za določitev ustrezne obravnave oz. zdravljenja pacientke.

Z aparatom PATHFAST™ poleg β -hCG lahko določamo še:

- srčne označevalce: CTN I, mioglobin, CK-MB, hs-CRP (33) (35)
- hormone: progesteron, estradiol, LH, prolaktin, FSH (33) (35)
- koagulacijo, D-dimer (33) (35)

3.3.2.3. Statistična obdelava podatkov

Rezultate meritev smo vnesli v tabele in jih obdelali z računalniškim programom Excel.

4. REZULTATI

Najprej smo izvedli **validacijo metode** na analizatorju PATHFAST™, da smo ugotovili ali lahko princip določanja β -hCG iz heparinizirane polne krvi in heparinizirane plazme glede na dobljene rezultate za posamezne statistične parametre uporabimo tudi za vrednotenje rezultatov v skupini pacientk s patološkim potekom nosečnosti in sumom na izvenmaternično nosečnost. Validacijo in vrednotenje primerjave koncentracij β -hCG smo izvajali v dveh paralelah.

Rezultate osnovnih statističnih parametrov smo odčitali in izračunali v sklopu validacije analizne metode iz vzorcev krvi nosečnic, brez dodatnih pogojev za vključitev v skupino preiskovank (zaradi obsežnosti gradiva so v tem poglavju navedeni samo tabelirani rezultati meritev; celotne meritve, preglednice in slike pa se nahajajo v dodatku).

Merjenje koncentracije β -hCG v heparinizirani plazmi in polni krvi pri specifični podskupini preiskovank

Za skupino pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost smo ob predpostavki, da smo s predhodno izračunanimi statističnimi parametri potrdili ustreznost metode, za izmerjene vzorce izračunali enačbo regresijske premice, koeficiente korelacije ter prikaz trenda zmanjševanja izmerjenih vrednosti β -hCG pri pacientkah s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti, po umetni prekinitvi nosečnosti. Meritve pri teh pacientkah smo izvajali v sklopu pooperativnega spremljanja.

4.1. Natančnost metode

4.1.1. Ponovljivost znotraj dneva

Preverili smo, kako se razlikujejo rezultati enega vzorca pri več ponovitvah, ki jih naredimo v enem dnevu in kakšna so odstopanja. (36) (37) V primeru prevelikih odstopanj, lahko posumimo, da je nekje prišlo do napake. Izvedli smo po 20 meritev s 3 paralelkami vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi (meritve, slike in preglednice za celotno validacijo metode so v dodatku).

Rezultati so pokazali, da je pri nižjih vrednosti koeficient variacije večji kot pri višjih vrednostih. Med vzorci z nižjimi vrednostmi smo opazili večja odstopanja (vendar v okviru

statistično dovoljenih odstopanj) in obratno za vzorce z višjimi vrednostmi. Pri vzorcih heparinizirane polne krvi smo opazili, da so bile razlike med koeficienti variacije zelo majhne (preglednica I).

Preglednica I: Prikaz izračunanih rezultatov iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri ponovljivosti znotraj dneva

	Heparini- zirana plazma 1 (β hCG (IU/l))	Heparini- zirana plazma 2 (hCG (IU/l))	Heparini- zirana plazma 3 (hCG (IU/l))	Heparini- zirana polna kri 1 (hCG (IU/l))	Heparini- ziranana polna kri 2 (hCG (IU/l))	Heparini- zirana polna kri 3 (hCG (IU/l))
VSOTA	6,059	5915	536,9	407,6	7674	605,4
MIN	0,171	274	24,8	19,2	348	28,4
MAKS	0,467	316	28,4	21,5	414	32,7
POVPR. VR.	0,303	296	26,8	20,4	384	30,3
SD	0,090	10,44	0,904	0,623	18,13	1,347
KV (%)	29,7	3,53	3,37	3,06	4,73	4,45
N (št. mer.)	20	20	20	20	20	20

Ugotovili smo, da so priporočene referenčne vrednosti proizvajalca za vzorce plazme za koeficiente variacije za visoke koncentracije znotraj dneva 2,4 %, za srednje vrednosti koncentracij 2,2 % in za nizke vrednosti 3,0 % (navedeni v preglednici III).

4.1.2. Ponovljivost med dnevi

V obdobju 20 dni smo za kontrolo kakovosti primerjali 3 vzorce. Da bi bili rezultati kar se da natančni, smo za vsak vzorec vsak dan naredili po štiri meritve, skupaj torej 12 meritev na dan. Želeli smo se prepričati, kakšna so odstopanja vzorcev med posameznimi dnevi. Ker v laboratoriju niso vsak dan isti pogoji lahko pride do interferenc. S to primerjavo smo se želeli izogniti takšnim napakam.

Ugotovili smo, da so vsi trije vzorci (QC1, QC1 in QC3) imeli primerljive vrednosti koeficienta variacije med 4,6 % do 7,7 % (preglednica II). Iz tega sklepamo, da se

izmerjene vrednosti med različnimi dnevi med seboj bistveno ne razlikujejo in kažejo na to, da ni prisotnih morebitnih motenj, ki bi lahko značilno spremenile rezultat (meritve, slike in preglednice za celotno validacijo metode so v dodatku).

Preglednica II: Izračunani rezultati iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri ponovljivosti med dnevi

	QC 1 hCG (IU/l)		QC 2 hCG (IU/l)		QC 3 hCG (IU/l)	
VSOTA	754,6	757,7	2788,1	2724,5	11848,7	11629,4
MIN	16,8	17,1	63,3	59,1	257	186
MAKS	21,2	21,5	82,3	76,6	335	323
POVPR. VREDNOST	18,9	18,9	69,7	68,1	296	291
SD	1,03	1,14	3,73	3,13	16,66	22,35
KV%	5,45	6,01	5,35	4,59	5,62	7,69
N(število meritev)	40	40	40	40	40	40

Nato smo izračunane vrednosti koeficientov variacije primerjali s priporočenimi referenčnimi vrednostmi proizvajalca za vzorce plazme, navedenimi v preglednici III. Ugotovili smo, da so koeficienti variacije za visoke koncentracije med dnevi 3,6 %, za srednje vrednosti koncentracij 3,6 % in za nizke vrednosti 4,3 %.

Preglednica III: Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca za vzorce plazme; prirejeno po (34)

Vzorci plazme		Ponovljivost znotraj dneva			Ponovljivost med dnevi	
Tip vzorca	Povprečna vrednost (mIU/ml) MEAN	Standardni odklon (mIU/ml) S.D.	Koeficient variacije (%) C.V.	Standardni odklon (mIU/ml) S.D.	Koeficient variacije (%) C.V.	
QC - LL	4,71	0,167	3,5	0,185	3,9	
QC-L	20,74	0,622	3,0	0,888	4,3	
QC-M	188	4,12	2,2	6,79	3,6	
QC-H	294	7,16	2,4	1,07	3,6	

4.2. Analitična občutljivost metode določanja β -hCG/meja detekcije (LoD)

Je najmanjša izmerjena koncentracija na osnovi katere lahko določimo prisotnost analita z zadostno statistično gotovostjo. Analitično občutljivost lahko izračunamo z uporabo različnih pristopov. Izmerili smo jo z uporabo proizvajalčevega kalibratorja 1 (Calibrator 1; 0 mIU/ml)) in v eni seriji izmerili koncentracije β -hCG 20 ustreznim slepim vzorcem. Analitično občutljivost smo izračunali kot navidezno vsebnost analita, ki ustreza povprečni vrednosti kalibratorja 1 ter ji za določanje koncentracije pri slepih vzorcih prišteli dvakratno vrednost standardne deviacije (2 SD). Izračunane statistične vsednosti za določitev analitične občutljivosti določanja β -hCG (LoD) so predstavljene v preglednici IV (meritve, slike in preglednice za celotno validacijo metode so v dodatku).

Preglednica IV: Izračunane statistične vrednosti za določitev analitične občutljivosti metode določanja β -hCG (LoD)

Statistični parametri	(CAL-1)
	(mIU/l)
VSOTA	1,136144
MIN	0
MAKS	0,2413
POVPR. VREDNOST	0,057
SD	0,062
KV%	108,77
N (število meritev)	20

Priporočena referenčna vrednost proizvajalca

Meja kvantifikacije (LoD) < 0,200 IU/l (34)

4.3. Funkcionalna občutljivost metode določanja β -hCG (LoQ)

Izmerili smo sipanje dobljenih rezultatov oz. velikost narejene statistične napake. (36) (37)

Funkcionalno občutljivost (vrednost 20 % KV) smo preverili tako, da smo štiri združene vzorce, sestavljene iz različnih vzorcev plazme (Pool 1-4), z nizkimi, srednjimi in visokimi koncentracijami β -hCG preverjali štiri dni. Vsak dan smo za vsak vzorec izvedli pet meritev. Izračunane rezultate iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri funkcionalni občutljivosti prikazuje preglednica V (meritve, slike in preglednice za celotno validacijo metode so v dodatku).

Preglednica V: Izračunani rezultati iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri funkcionalni občutljivosti metode določanja β -hCG (LoQ)

	Združeni vzorci 1 - Nizke vrednosti konc. (Low) (hCG (IU/l))	Združeni vzorci 2 - Srednje vrednosti konc. (Medium) (hCG (IU/l))	Združeni vzorci 3 - Srednje vrednosti konc. (Medium) (hCG (IU/l))	Združeni vzorci 4 - Visoke vrednosti konc. (High) (hCG (IU/l))
VSOTA	8,672	25,544	51,016	72,739
MIN	0,274	0,989	1,792	2,853
MAKS	0,942	1,926	3,378	4,460
POVPR. VREDNOST	0,434	1,277	2,551	3,637
SD	0,178	0,291	0,424	0,505
KV%	41,162	22,772	16,626	13,889
N(število meritev)	20	20	20	20

Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca za funkcionalno občutljivost metode določanja β -hCG

Meja kvantifikacije (LoQ) 1,35 IU/l (31)
--

Funkcionalna občutljivost (glede na priporočila proizvajalca) za PATHFAST™ je 1,35 IU/l in predstavlja vrednost, pri kateri je KV = 20 % (stopnja najvišjega statistično dovoljenega odstopanja/napake).

Pri določanju β -hCG lahko upoštevamo večjo napako, zaradi velikega razpona posameznih vrednosti med nosečnostjo.

V obdobju 4 dni smo primerjali 4 vzorce, vsak dan pa smo naredili pet ponovitev. Prvi vzorec je vseboval zelo majhne vrednosti (< 1) in tu je bila napaka oz. KV 41,2 %. Pri drugem vzorcu je bila napaka 22,8 %, pri tretjem 16,6 % in pri četrtem 13,9 %.

Višje, kot so vrednosti, ki jih merimo, manjša je napaka, ki jo naredimo

4.4. Linearnost razredčitve hepariniziranih vzorcev plazme β -hCG

Linearnost razredčitve smo izvajali pri vzorcih, katerih koncentracije β -hCG so bile višje od 500 mIU/ml.

Na treh različnih vzorcih heparinizirane plazme, katerih koncentracije β -hCG so bile znotraj celotnega merilnega območja, smo izvedli serijo 11 razredčitev v dveh paralelkah, z uporabo raztopine natrijevega klorida ($\text{NaCl} = 0,15 \text{ mol/l}$).

Podatke za nerazredčene vzorce in podatke po izvedeni seriji razredčitev smo ovrednotili z uporabo standardne laboratorijske metode za oceno linearnosti razredčitve (meritve, grafi in preglednice za celotno validacijo metode so v dodatku).

Preglednica VI: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Stopnja razredčitve		HCG izmerjena vrednost			Teoretična vrednost	Recovery (%)
Nizka	Visoka	N1	N2	Povprečna vrednost (MEAN)	HCG (mIU/ml)	
1,0	0,0	0,029	4,04	2,03	-6,15	/
0,9	0,1	48,6	55,7	52,15	52,15	100,0
0,8	0,2	108,0	104,0	106,0	110,5	96,0
0,7	0,3	167,0	172,0	169,5	168,8	100,4
0,6	0,4	218,0	234,0	226,0	227,0	99,5
0,5	0,5	266,0	262,0	264,0	285,0	92,5
0,4	0,6	359,0	349,0	354,0	343,0	103,0

0,3	0,7	382,0	390,0	386,0	401,0	96,0
0,2	0,8	484,0	460,0	472,0	460,0	102,5
0,1	0,9	>500	>500	>500	/	/
0,0	1,0	>500	>500	>500	/	/

Izračunani vrednosti regresijske premice in koeficienta korelacije hepariniziranega vzorca plazme 1 (določanje linearnosti razredčitve)

$$y = 583 x - 6,145$$

$$r = 0,9975$$

Preglednica VII: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Stopnja razredčitve		HCG izmerjena vrednost (mIU/ml)			Teoretična vrednost HCG (mIU/ml)	Recovery (%)
Nizka	Visoka	N1	N2	Povprečna vrednost (MEAN)		
1,0	0,0	<0	<0	41,9	/	/
0,9	0,1	49,5	50,3	49,9	44,75	111,5
0,8	0,2	82,1	80,3	81,2	91,5	88,7
0,7	0,3	137,0	140,0	138,5	138,3	100,2
0,6	0,4	191,0	179,0	185	185	100
0,5	0,5	229,0	232,0	230,5	231	99,5
0,4	0,6	289,0	285,0	287	278	103,1
0,3	0,7	323,0	326,0	324,5	325	99,8
0,2	0,8	373,0	345,0	359	372	96,5
0,1	0,9	435,0	441,0	438	419	104,6
0,0	1,0	>500	>500	/	/	/

Izračunani vrednosti regresijske premice in koeficienta korelacije hepariniziranega vzorca plazme 2 (določanje linearnosti razredčitve)

$$y = 467,5 x - 2,0$$

$$r = 0,9975$$

Preglednica VIII: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Stopnja razredčitve		HCG izmerjena vrednost (mIU/ml)			Teoretična vrednost HCG (mIU/ml)	Recovery (%)
Nizka	Visoka	N1	N2	Povprečna vrednost (MEAN)		
1,0	0,0	0,022	0,039	0,0305	/	/
0,9	0,1	1,59	1,72	1,655	1,74	95,3
0,8	0,2	3,76	3,75	3,755	3,95	95,1
0,7	0,3	6,38	6,3	6,32	6,16	102,6
0,6	0,4	8,36	8,3	8,33	8,38	99,5
0,5	0,5	10,40	11,2	10,80	10,59	102
0,4	0,6	12,60	13,0	12,80	12,8	100
0,3	0,7	14,30	14,8	14,55	15,01	96,9
0,2	0,8	18,20	18,1	18,15	18,15	105,4
0,1	0,9	19,50	19,8	19,65	19,65	101,1
0,0	1,0	21,30	21,8	21,55	21,65	99,5

Izračunani vrednosti regresijske premice in koeficienta korelacije hepariniziranega vzorca plazme 3 (za določanje linearnosti razredčitve)

$$y = 22,125 x - 0,475$$

$$0,9986$$

$$r =$$

Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca (34)

Dokazana linearnost razredčitve v območju koncentracij do 500 mIU/ml.

Iz treh vzorcev plazme, ki smo jih uporabili v postopku preverjanja linearnosti razredčitve smo izračunali naslednje vrednosti koeficientov korelacije ($r = 0,9975$; plazma 1), ($r = 0,9975$; plazma 2), ($r = 0,9986$; plazma 3). Kar kaže na zelo dobro linearno povezanost.

Proizvajalec v sklopu svojih priporočenih referenčnih vrednosti zagotavlja, da so meritve koncentracij v območju od 1-500 mIU/ml ustrezne in jih lahko uporabimo pri izračunih statističnih parametrov. Če so koncentracije β -hCG večje od 500 mIU/ml, je potrebno ustrezno redčenje vzorca z raztopino NaCl, kar smo izvedli v sklopu validacije metode pri preverjanju primerljivosti rezultatov za heparinizirano plazmo in heparinizirano polno kri izmerjenih na klasičnem analizatorju (Siemens DCP Immulite) in POCT analizatorju (PATHFAST™). Vrednosti meritev, kjer je koncentracija β -hCG večja od 500 mIU/ml bi načeloma iz izračunov statističnih parametrov lahko tudi izključili.

4.5. Korelacija rezultatov vrednosti β -hCG med heparinizirano polno krvjo in heparinizirano plazmo

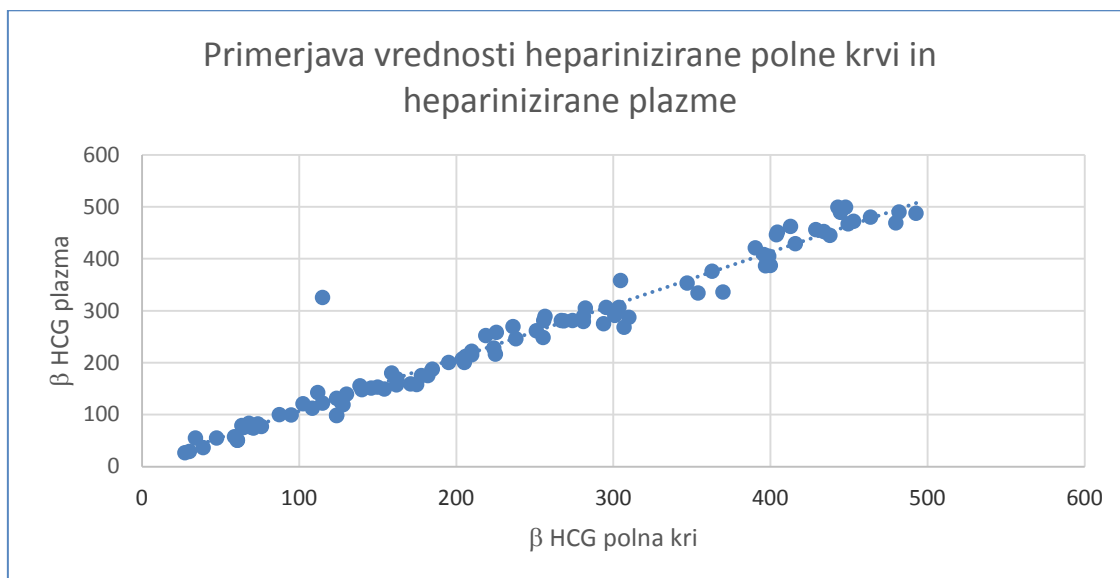
Koeficient korelacije je merilo linearne povezanosti med dvema spremenljivkama. Namen izračuna korelacijskega koeficienta je ugotavljanje morebitne medsebojne povezave med dvema spremenljivkama, ki ni samo naključna ter ugotavljanje stopnje medsebojne povezanosti obeh spremenljivk, ob predpostavki, da med njima zveza obstaja. (36) (37)

Koeficient korelacije je relativen glede na izmerjene meritve ali izračunane rezultate, okoliščine in pogoje dela ter uporabljene aparature, zato ga glede na te spremenljivke tudi interpretiramo.

Najprej smo v sklopu validacije metode izmerili vrednosti β -hCG iz 100 vzorcev plazme in 100 vzorcev polne krvi pri nosečnicah in primerjali ujemanje rezultatov (meritve, rezultati in slike za celotno validacijo metode so v dodatku). Izračunane vrednosti statističnih parametrov za vzorce heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Izračunani statistični parametri β -hCG za vzorce heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije (validacija metode)

Statistični parametri	Metoda X: PATHFAST	Metoda Y: Siemens DPC Immulite
	HCG (mIU/ml)	HCG mIU/ml
VSOTA	22644,200	23559
MIN	27,500	26
MAKS	492,800	499
POVPR. VR.	235,877	245
SD	133,636	139,06
KV (%)	56,7	56,67
Mediana	221,5	237,0
Korelacija	0,980202917	
Pearson	0,980202917	
N (št. mer.)	96	96



Slika 8: Primerjava rezultatov β -hCG za heparinizirano polno kri in heparinizirano plazmo (za izračun korelacije)

Nato smo v sklopu preverjanja delovne hipoteze v 8 mesecih izmerili vrednosti β -hCG iz 158 vzorcev heparinizirane plazme in iz 158 vzorcev heparinizirane polne krvi pri nosečnicah s sumom na izvenmaternično nosečnost. Upoštavili smo lahko vse rezultate, saj nobena od izmerjenih vrednosti β -hCG ni bila višja od 500 mIU/ml oz. redčenje vzorca pred izvedbo meritev hcg ni bilo potrebno. Rezultati izmerjenih vrednosti pri teh pacientkah so prikazani v preglednici X.

Preglednica X: Izmerjene vrednosti β -hCG na 158 vzorcih heparinizirane plazme in 158 vzorcih heparinizirane polne krvi pri nosečnicah s sumom na izvenmaternično nosečnost (preverjanje delovne hipoteze)

Zaradi večjega števila izvedenih meritev so rezultati v preglednici predstavljeni na več straneh.

Številka vzorca	Datum rojstva	Datum sprejema	HCG v serumu	HCG v polni krvi
1	17.6.1975	1.1.2015	41,9	42
2	17.6.1975	3.1.2015	20,1	25
3	25.5.1979	7.1.2015	252,8	279
4	6.5.1989	13.1.2015	53,8	80
5	16.4.1983	13.1.2015	52,9	63
6	3.4.1992	13.1.2015	64,9	80
7	28.11.1985	14.1.2015	95,6	102
8	3.4.1992	14.1.2015	44,9	55
9	16.4.1983	15.1.2015	15,5	27
10	20.4.1988	15.1.2015	79,4	80
11	20.4.1988	17.1.2015	28,9	35
12	8.10.1995	19.1.2015	404,1	459
13	16.5.1983	21.1.2015	118,8	115
14	28.11.1985	21.1.2015	60,2	75
15	8.10.1995	21.1.2015	159,3	178
16	3.4.1992	21.1.2015	22,7	27
17	8.10.1995	22.1.2015	90,4	121
18	14.3.1979	23.1.2015	156,6	180
19	14.3.1979	25.1.2015	83,2	97
20	12.7.1980	26.1.2015	65,2	80
21	16.5.1983	27.1.2015	19,5	22

Številka vzorca	Datum rojstva	Datum sprejema	HCG v serumu	HCG v polni krvi
22	10.5.1981	27.1.2015	53,2	69
23	14.3.1979	28.1.2015	31,6	37
24	3.4.1992	28.1.2015	4,8	8
25	12.7.1980	29.1.2015	21,4	27
26	28.11.1985	30.1.2015	12,7	15
27	14.5.1987	2.2.2015	439,3	486
28	6.5.1989	3.2.2015	13,4	19
29	14.3.1979	4.2.2015	5,4	10
30	25.5.1979	4.2.2015	2,9	6
31	14.5.1987	4.2.2015	229,6	256
32	18.11.1985	7.2.2015	295,9	314
33	18.11.1985	8.2.2015	72,3	80
34	4.10.1980	11.2.2015	360,2	380
35	28.11.1985	12.2.2015	2,4	8
36	4.10.1980	13.2.2015	63,9	80
37	27.6.1980	16.2.2015	105,8	111
38	27.6.1980	19.2.2015	20	26
39	27.1.1980	19.2.2015	303,6	306
40	31.5.1972	20.2.2015	112	142
41	27.8.1982	20.2.2015	295,5	306
42	27.8.1982	22.2.2015	444,7	489
43	27.1.1980	22.2.2015	108,6	112
44	31.5.1972	23.2.2015	63,7	79
45	28.11.1985	23.2.2015	2,1	6
46	27.12.1986	23.2.2015	138,8	155
47	2.2.1992	23.2.2015	443,1	499
48	27.1.1980	24.2.2015	64,9	75
49	27.8.1982	24.2.2015	404,6	451
50	2.2.1992	25.2.2015	159,1	180
51	31.5.1972	25.2.2015	47,5	55
52	27.12.1986	25.2.2015	256,7	289
53	27.8.1982	26.2.2015	412,9	462
54	31.5.1972	27.2.2015	16,7	21
55	2.8.1986	2.3.2015	154,3	149

Številka vzorca	Datum rojstva	Datum sprejema	HCG v serumu	HCG v polni krvi
56	15.7.1980	2.3.2015	39,6	45
57	27.12.1986	3.3.2015	66,6	80
58	9.3.1984	3.3.2015	205,3	200
59	27.1.1980	4.3.2015	12,5	17
60	28.11.1985	10.3.2015	2,0	4
61	27.12.1986	11.3.2015	4,1	8
62	23.7.1974	16.3.2015	25,7	42
63	2.8.1986	17.3.2015	42,8	62
64	15.7.1980	17.3.2015	9,1	12
65	27.1.1972	19.3.2015	73,6	80
66	23.7.1974	23.3.2015	23,9	35
67	15.6.1985	25.3.2015	195,3	200
68	18.1.1978	25.3.2015	447,9	499
69	9.3.1984	25.3.2015	492,8	487
70	27.1.1972	26.3.2015	11,1	14
71	15.6.1985	26.3.2015	282,3	305
72	2.8.1986	27.3.2015	5,5	8
73	23.7.1974	30.3.2015	19,2	27
74	9.3.1984	1.4.2015	162,3	169
75	18.1.1978	1.4.2015	102,5	121
76	26.3.1987	1.4.2015	428,9	456
77	26.3.1987	2.4.2015	390,4	421
78	24.6.1984	3.4.2015	268,7	280
79	30.11.1985	5.4.2015	251,2	261
80	23.7.1974	6.4.2015	13,9	19
81	30.11.1985	7.4.2015	463,8	480
82	24.6.1984	7.4.2015	449,6	499
83	9.3.1984	8.4.2015	34,1	55
84	22.6.1985	8.4.2015	366,6	378
85	23.7.1974	13.4.2015	9,9	12
86	5.11.1981	14.4.2015	206,1	212
87	5.11.1981	16.4.2015	255,5	248
88	13.2.1985	16.4.2015	255,8	281
89	13.2.1985	18.4.2015	304,8	358

Številka vzorca	Datum rojstva	Datum sprejema	HCG v serumu	HCG v polni krvi
90	21.2.1989	19.4.2015	236,2	269
91	13.2.1985	20.4.2015	274,1	304
92	5.11.1981	22.4.2015	130,3	139
93	6.3.1988	22.4.2015	225,6	258
94	3.12.1986	22.4.2015	68,1	80
95	3.12.1986	23.4.2015	108,5	127
96	3.12.1986	23.4.2015	119,4	155
97	6.3.1988	24.4.2015	184,9	200
98	18.1.1978	28.4.2015	15,7	18
99	9.3.1984	29.4.2015	2,0	5
100	24.6.1984	29.4.2015	23,2	27
101	21.2.1989	30.4.2015	8,6	12
102	3.12.1986	8.5.2015	229,5	280
103	22.6.1985	14.5.2015	20,7	41
104	5.11.1981	22.5.2015	2,5	3
105	3.12.1986	27.5.2015	2,0	5
106	14.1.1971	30.5.2015	112,3	127
107	14.1.1971	1.6.2015	99,5	111
108	14.1.1974	15.6.2015	330,8	358
109	14.1.1974	16.6.2015	224,3	269
110	7.5.1987	18.6.2015	50,4	51
111	14.1.1974	18.6.2015	61,1	69
112	17.11.1977	19.6.2015	143,79	155
113	14.1.1974	20.6.2015	24,4	32
114	7.5.1987	20.6.2015	17,4	21
115	17.11.1977	24.6.2015	52,9	61
116	8.10.1984	24.6.2015	46,5	55
117	21.1.1969	1.7.2015	91,1	101
118	17.11.1977	2.7.2015	23,3	32
119	10.5.1981	17.7.2015	41,4	55
120	6.12.1985	21.7.2015	180,9	198
121	21.1.1969	22.7.2015	7,9	8
122	8.10.1984	22.7.2015	14	14
123	6.12.1985	23.7.2015	87,9	92

Številka vzorca	Datum rojstva	Datum sprejema	HCG v serumu	HCG v polni krvi
124	28.12.1974	25.7.2015	212,1	221
125	6.12.1985	26.7.2015	86	92
126	28.12.1974	27.7.2015	165	174
127	6.12.1985	28.7.2015	153,7	169
128	13.3.1990	28.7.2015	221,2	258
129	28.12.1974	29.7.2015	195,3	201
130	12.4.1979	29.7.2015	23,4	27
131	28.12.1974	30.7.2015	254,3	268
132	13.3.1990	30.7.2015	231,6	269
133	28.12.1974	31.7.2015	130,4	136
134	12.4.1979	31.7.2015	6,9	11
135	23.1.1988	3.8.2015	139,6	142
136	28.12.1974	5.8.2015	7,9	9
137	23.1.1988	5.8.2015	42,6	40
138	17.10.1983	5.8.2015	105,9	111
139	6.12.1985	5.8.2015	225,4	236
140	13.3.1990	7.8.2015	69,3	80
141	23.1.1993	11.8.2015	37,2	46
142	23.1.1993	12.8.2015	54,2	64
143	17.10.1983	12.8.2015	9,5	12
144	23.1.1988	12.8.2015	3,4	5
145	28.12.1974	12.8.2015	2,1	3
146	6.12.1985	12.8.2015	88,3	95
147	6.12.1985	15.8.2015	76,8	80
148	8.10.1984	19.8.2015	8,6	9
149	6.12.1985	20.8.2015	4	8
150	23.1.1993	20.8.2015	57,4	78
151	13.3.1990	21.8.2015	6,6	10
152	20.3.1985	24.8.2015	134,7	159
153	6.1.1981	25.8.2015	275	299
154	20.3.1985	26.8.2015	183,2	213
155	6.1.1981	27.8.2015	210	227
156	20.3.1985	28.8.2015	111,3	125
157	23.1.1993	28.8.2015	2,6	6

Številka vzorca	Datum rojstva	Datum sprejema	HCG v serumu	HCG v polni krvi
158	20.3.1985	30.8.2015	57,5	80

Po opravljenih meritvah in pregledni razvrstitvi dobljenih rezultatov, smo za dobljene vrednosti izračunali še statistične parametre, posebej za serum (S_HCG) in posebej za polno kri (PATHFASTTM) (izračuni so predstavljeni v preglednici XI) in jih uporabili za izračun koeficienta korelacije ($r = 0,8448$).

Preglednica XI: Izračunani statistični parametri vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost

Spremenljivka : S_HCG	
Velikost vzorca	158
Minimalna vrednost	2,1
Maksimalna vrednost	492,8
Povprečna vrednost	126,1127
95% IZ za povprečno vrednost	106,0712 - 146,1541
Mediana	75,2
95% IZ za mediano	57,4682 - 106,7279
Varianca	16262,4535
Standardni odklon	127,5243
Relativni standardni odklon	1,0112 (101,12%)
Standardna napaka povpr. vrednosti	10,1453
Kolmogorov-Smirnov test za normalno porazdelitev : zavrnitev normalnosti ($P < 0.01$)	

Percentili:
2.5 = 2,5450; 97.5th = 446,4600
5 = 4,0400 ; 95 = 422,5001

10 = 8,1100; 90 = 304,4400
25 = 21,4000; 75 = 206,1000

Spremenljivka: PATHFAST	
Velikost vzorca	158
Minimalna vrednost	3
Maksimalna vrednost	499
Povprečna vrednost	139,2405
95% IZ za povprečno vrednost	117,6903 - 160,7907
Mediana	80
95% IZ za mediano	75,0000 - 116,9105
Varianca	18803,1647
Standardni odklon	137,1246
Relativni standardni odklon	0,9848 (98,48%)
Standardna napaka povpr. vrednosti	10,909
Kolmogorov-Smirnov test	
za normalno porazdelitev : zavrnitev normalnosti (P<0.01)	

Percentili:
2.5 = 5,0000; 97.5 = 488,1000
5 = 6,0000; 95 = 460,8000
10 = 9,0000; 90 = 344,7999
25 = 27,0000; 75 = 213,0000

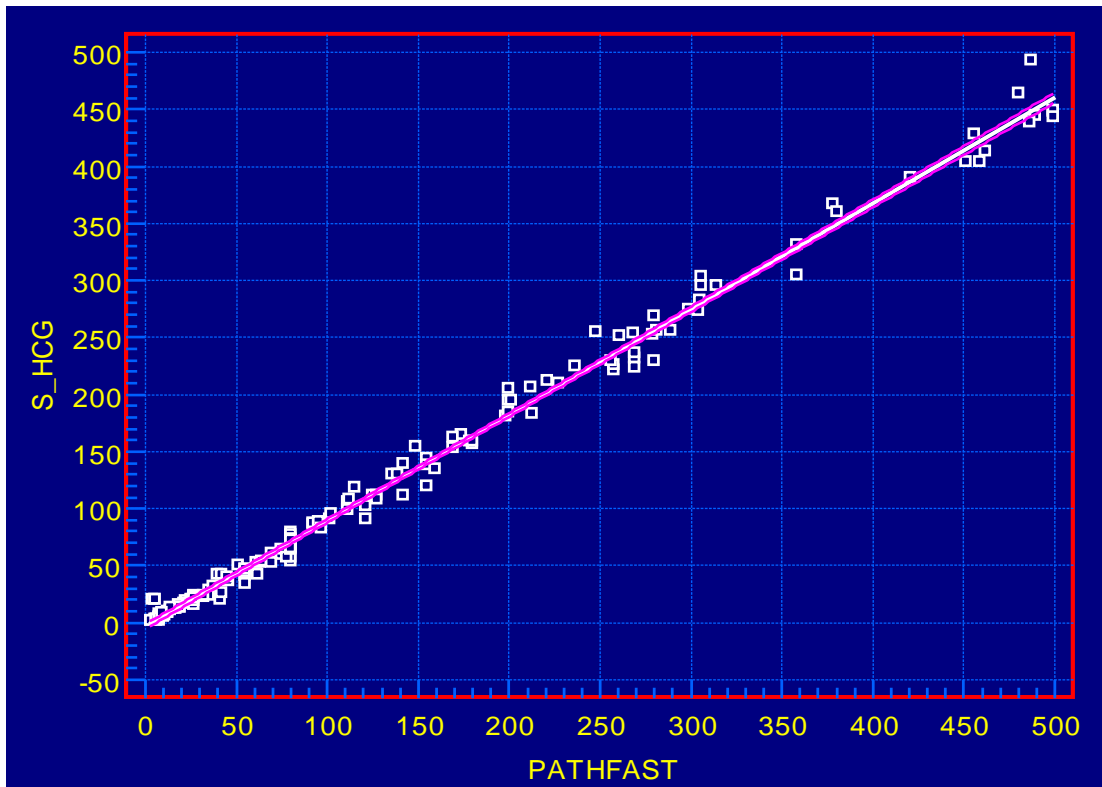
Spremenljivka X : PATHFAST

Spremenljivka Y : S_HCG (Log)

95% IZ za r: 0,7932 do 0,8843

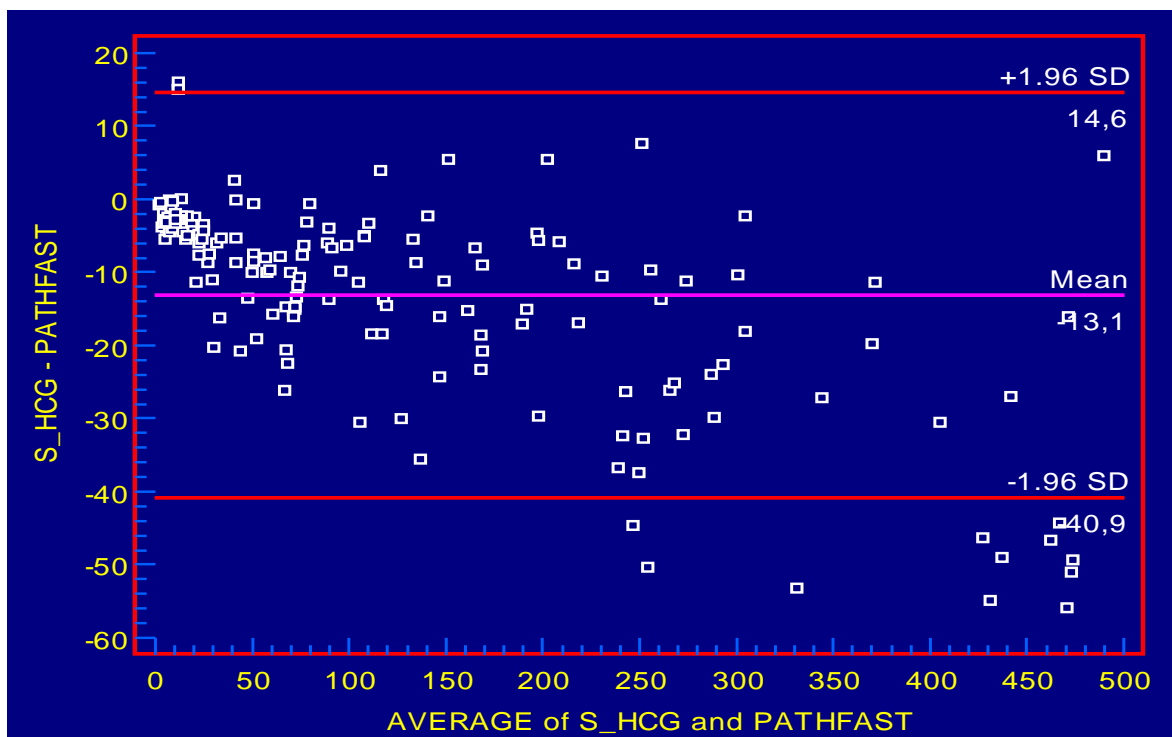
Koeficient korelacije $r = 0,8448$

Izmerjene vrednosti za skupino pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost smo grafično prikazali na sliki 9; na y-os smo nanašali izmerjene vrednosti β -hCG v serumu na x os pa izmerjene vrednosti β -hCG v polni krvi. Slikovni prikaz rezultatov potrjuje predhodno izračunano dobro stopnjo medsebojne povezanosti, ki jo numerično predstavlja izračunani koeficient korelacije ($r = 0,8448$).



Slika 9: Primerjava rezultatov vrednosti β -hCG heparinizirne polne krvi in plazme (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost)

Nato pa smo izračunane vrednosti za skupino pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost slikovno prikazali na sliki 10; kjer smo na y-os nanašali izmerjene vrednosti β -hCG v serumu, na x os pa izračunane povprečne vrednosti β -hCG za serum in polno kri.



Slika 10: Primerjava rezultatov vrednosti β -hCG iz vzorcev heparinizirane plazme in povprečnih vrednosti β -hCG iz vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost)

Preglednica XII: Izračunane vrednosti β -hCG za vzorce heparinizirane polne krvi in plazme (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost) – odstopanje od normale

Spremenljivka X : PATHFAST

Spremenljivka Y : S_HCG

Spremenljivka: PATHFAST	
Velikost vzorca	158
Minimalna vrednost	3
Maksimalna vrednost	499
Povprečna vrednost	139,2405
Mediana	80
Standardni odklon	137,1246
Standardna napaka povpr. vrednosti	10,909

Spremenljivka : S_HCG	
Velikost vzorca	158
Minimalna vrednost	2,1
Maksimalna vrednost	492,8
Povprečna vrednost	126,1127
Mediana	75,2
Standardni odklon	127,5243
Standardna napaka povpr. vrednosti	10,1453

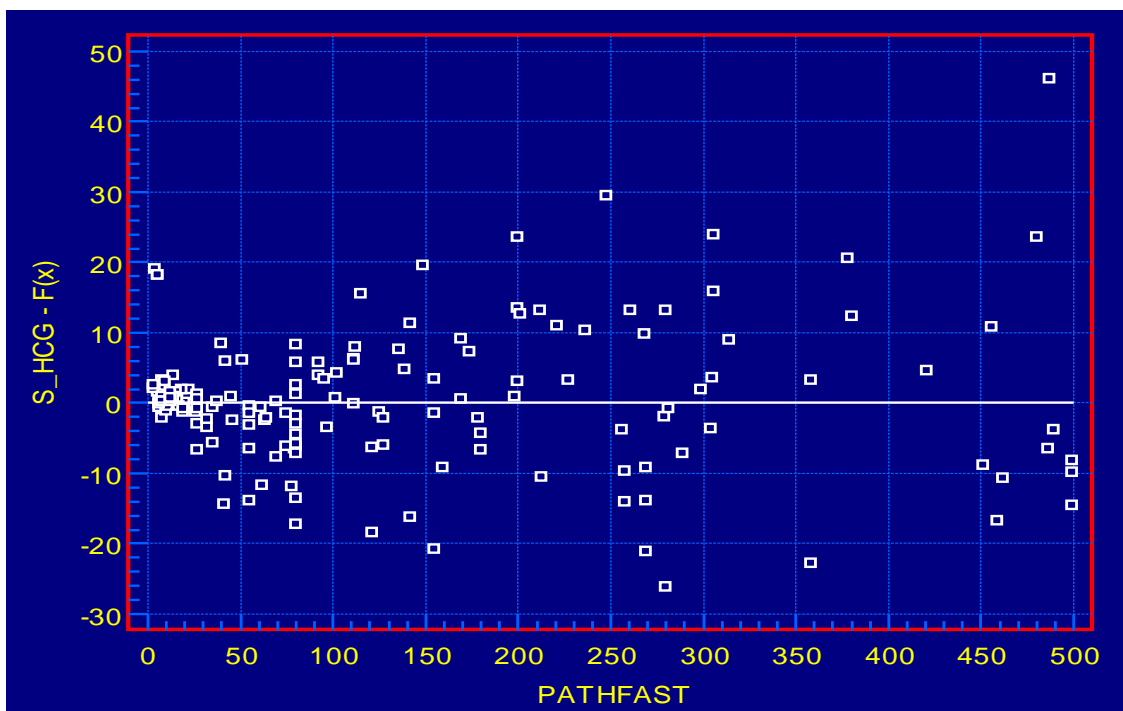
ENAČBA REGRESIJSKE PREMICE

$$Y = -2,8067 + 0,9228 X$$

Presečišče A : -2,8067
95% IZ: -3,5936 -do-2,2747

Naklon B : 0,9228
95% IZ : 0,9099 do 0,9376

Cusumov test za linearnost
Značilen odklon od linearnosti (P<0.05)



Slika 11: Primerjava rezultatov vrednosti β -hCG v heparinizirani polni krvi in plazmi (pri pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost) – odstopanje od normale

Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca za koeficient korelacije vrednosti β -hCG med heparinizirano polno krvjo in heparinizirano plazmo (34)

$$y = 1,036 \times 0,475$$

$$r=0,994 \text{ (n=70)}$$

Prikaz upadanja koncentracij hCG po posegu pri pacientkah s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti

V skupini 52 pacientk, vključenih v naše spremljanje, smo pri 12 pacientkah potrdili sum na izvenmaternično nosečnost. Za te pacientke smo opravili nekaj meritev koncentracije β -hCG v plazmi in polni krvi in spremljali naraščanje koncentracije β -hCG. Pri vseh pacientkah je ne glede na začetno izmerjeno vrednost β -hCG opazen prenizek odstotek povečanja vrednosti koncentracije β -hCG v 48 urah. Sočasno je pri teh pacientkah ginekolog opravil ultrazvočni pregled pacientk in na podlagi rezultatov obeh preiskav smo pravočasno potrdili sum na izvenmaternično nosečnost. Pri teh pacientkah je bil opravljen postopek umetne prekinitve nosečnosti, nato pa smo v sklopu spremljanja posmehne bolnice po posegu večkrat opravili meritve koncentracij β -hCG v serumu in polni krvi ter spremljali zmanjševanje koncentracij β -hCG. Običajno je β -hCG v telesu po prekinitvi

nosečnosti lahko prisoten še 4 tedne, kar je bilo v večini primerov naših pacientk dovolj za znižanje koncentracije β -hCG do koncentracije 15 mIU/ml, ki predstavlja mejno referenčno vrednost, oziroma do vrednosti 5 mIU/ml, ki predstavlja vrednost za nenoseče ženske. Za nas sta bili ti dve vrednosti mejnik, pri katerem smo te pacientke z merjenjem laboratorijskih vrednosti β -hCG v polni krvi in v plazmi prenehali spremljati.

Pregled izvedenih meritev vrednosti β -hCG v plazmi in polni krvi pri skupini pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost pred potrjenim sumom za dejansko prisotost izvenmaternične nosečnosti. Spremljanje 12 pacientk po potrditvi diagnoze, opravljenem posegu umetne prekinitve nosečnosti in spremljanjem laboratorijskih vrednosti β -hCG po opravljenem posegu, je vključen v preglednico XIII.

Preglednica XIII: Pregled upadanja koncentracij β -hCG po opravljenem posegu pri pacientkah s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti

Zaradi večjega števila izvedenih meritev so rezultati v tabeli predstavljeni na več straneh.

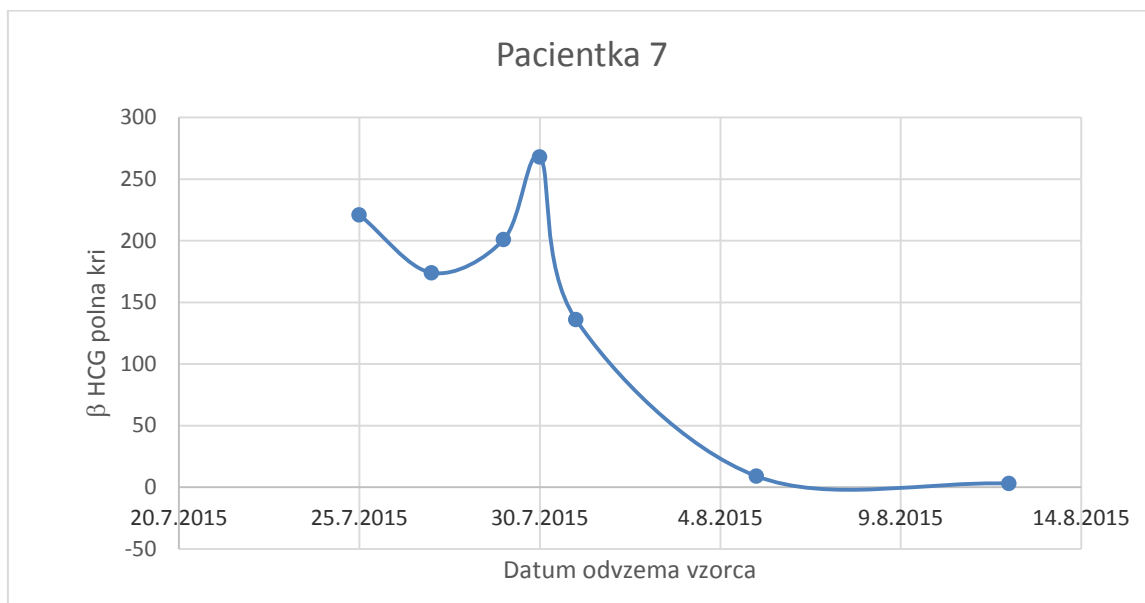
Št. pacientke/ vzorca #	št. Datum rojstva	Datum sprejema	S-HCG	Pathfast	ZN +/-	Prekinitev nosečnosti
Pac. št. 7 / # 124	28.12.1974	25.07.2015	212,1	221	potrjena ZN	
Pac. št. 7 / # 126		27.07.2015	165,0	174		
Pac. št. 7 / # 129		29.07.2015	195,3	201		
Pac. št. 7 / # 131		30.07.2015	254,3	268		poseg
Pac. št. 7 / # 133		31.07.2015	130,4	136		
Pac. št. 7 / # 136		05.08.2015	7,9	9		
Pac. št. 7 / # 145		12.08.2015	2,1	3		
Pac. št. 11 / # 86	05.11.1981	14.04.2015	206,1	212	potrjena ZN	
Pac. št. 11 / # 87		16.04.2015	255,5	248		poseg
Pac. št. 11 / # 92		22.04.2015	130,3	139		
Pac. št. 11 / # 104		22.05.2015	2,5	3		
Pac. št. 12 / # 120	06.12.1985	21.07.2015	180,9	198	potrjena ZN	
Pac. št. 12 / # 123		23.07.2015	87,9	92		

Št. pacientke/ št. vzorca #	Datum rojstva	Datum sprejema	S-HCG	Pathfast	ZN +/-	Prekinitev nosečnosti
Pac. št. 12 / # 125		26.07.2015	86,0	92		
Pac. št. 12 / # 127		28.07.2015	153,7	169		
Pac. št. 12 / # 139		5.8.2016	225,4	236		poseg
Pac. št. 12 / # 146		12.08.2015	88,3	95		
Pac. št. 12 / # 147		15.08.2015	76,8	80		
Pac. št. 12 / # 149		20.08.2015	4,0	8		
Pac. št. 13 / # 41	27.08.1982	20.02.2015	295,5	306	potrjena ZN	
Pac. št. 13 / # 42		22.02.2015	444,7	489		poseg
Pac. št. 13 / # 49		24.02.2015	404,6	451		
Pac. št. 13 / # 53		26.02.2015	412,9	462		
Pac. št. 19 / # 46	27.12.1986	23.02.2015	138,8	155	potrjena ZN	
Pac. št. 19 / # 52		25.02.2015	256,7	289		poseg
Pac. št. 19 / # 57		03.03.2015	66,6	80		
Pac. št. 19 / # 61		11.03.2015	4,1	8		
Pac. št. 26 / # 152	20.03.1985	24.08.2015	134,7	159	potrjena ZN	
Pac. št. 26 / # 154		26.08.2015	183,2	213		poseg
Pac. št. 26 / # 156		28.08.2015	111,3	125		
Pac. št. 26 / # 158		30.08.2015	57,5	80		
Pac. št. 27 / # 78	24.06.1984	03.04.2015	268,7	280	potrjena ZN	
Pac. št. 27 / # 82		07.04.2015	449,6	499		poseg
Pac. št. 27 / # 100		29.04.2015	23,2	27		
Pac. št. 31 / # 128	13.03.1990	28.07.2015	221,2	258	potrjena ZN	
Pac. št. 31 / # 132		30.07.2015	231,6	269		poseg
Pac. št. 31 / # 140		07.08.2015	69,3	80		
Pac. št. 31 / # 151		21.08.2015	6,6	10		

Št. pacientke/ vzorca #	št. rojstva	Datum sprejema	S-HCG	Pathfast	ZN +/-	Prekinitev nosečnosti
Pac. št. 37 / # 141	23.01.1993	11.08.2015	37,2	46	potrjena ZN	
Pac. št. 37 / # 142		12.08.2015	54,2	64		
Pac. št. 37 / # 150		20.08.2015	57,4	78		poseg
Pac. št. 37 / # 157		28.08.2015	2,6	6		
Pac. št. 38 / # 94	03.12.1986	22.04.2015	68,1	80	potrjena ZN	
Pac. št. 38 / # 96		23.04.2015	119,4	155		
Pac. št. 38 / # 95		23.04.2015	108,5	127		
Pac. št. 38 / # 102		08.05.2015	229,5	280		poseg
Pac. št. 38 / # 105		27.05.2015	2.0	5		
Pac. št. 48 / # 88	13.02.1985	16.04.2015	255,8	281		
Pac. št. 48 / # 89		18.04.2015	304,8	358		poseg
Pac. št. 48 / # 91		20.04.2015	274,1	304		
Pac. št. 51 / # 58	09.03.1984	03.03.2015	205,3	200	potrjena ZN	
Pac. št. 51 / # 69		25.03.2015	492,8	487		poseg
Pac. št. 51 / # 74		01.04.2015	162,3	169		
Pac. št. 51 / # 83		08.04.2015	34,1	55		
Pac. št. 51 / # 99		29.04.2015	2.0	5		

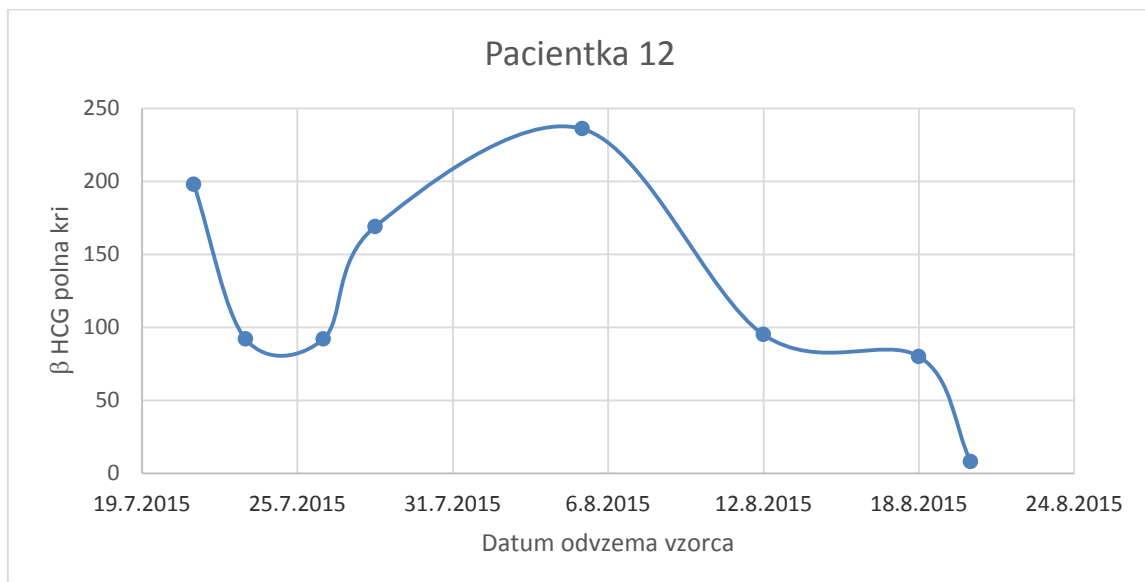
Iz preglednice XIII je razvidno, da smo pri 12 pacientkah od skupno 52 potrdili diagnozo izvenmaternične nosečnosti. Za ponazoritev gibanja koncentracij β -hCG pred umetno prekinitvijo nosečnosti in hitrost postopnega upadanja koncentracije β -hCG po umetni prekinitvi nosečnosti, smo iz celotne skupine izbrali 6 pacientk, z zadostnim številom meritev koncentracij β -hCG v obdobju spremljanja pacientk po operativnem posegu (slike od 12 do 17). Čeprav je koncentracija β -hCG pri posameznih pacientkah pred posegom naraščala različno hitro, pa je pri vseh pacientkah moč opaziti, da je trend naraščanja koncentracije β -hCG manjši od intervala naraščanja koncentracije β -hCG od 53 % do 66 % (v 48 urah), kar predstavlja mejno vrednost za sum na patološki potek nosečnosti.

Po datumu umetne prekinitve nosečnosti pa je v obdobju 3. – 4 tednov, kolikor znaša običajno laboratorijsko spremljanje koncentracij β -hCG, pri teh pacientkah opazen postopen upad koncentracij do referenčne vrednosti β -hCG 15 mIU/ml, oziroma do mejne vrednosti 5 mIU/ml za nenoseče ženske.



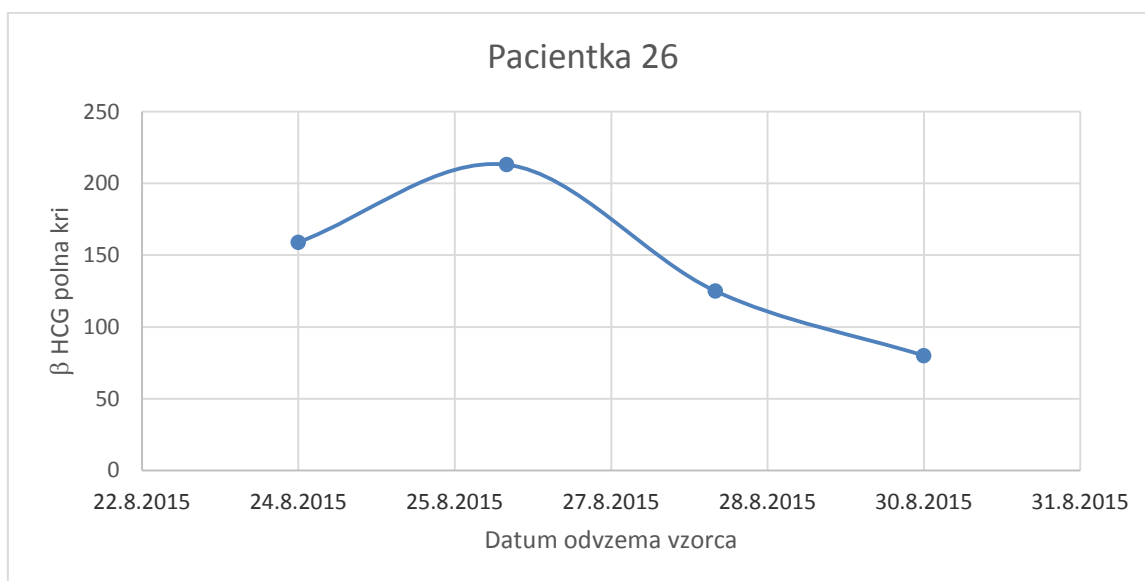
Slika 12: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 7 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)

Komentar rezultatov izmerjenih in slikovno ponazorjenih vrednosti za to pacientko se nahaja v razpravi.



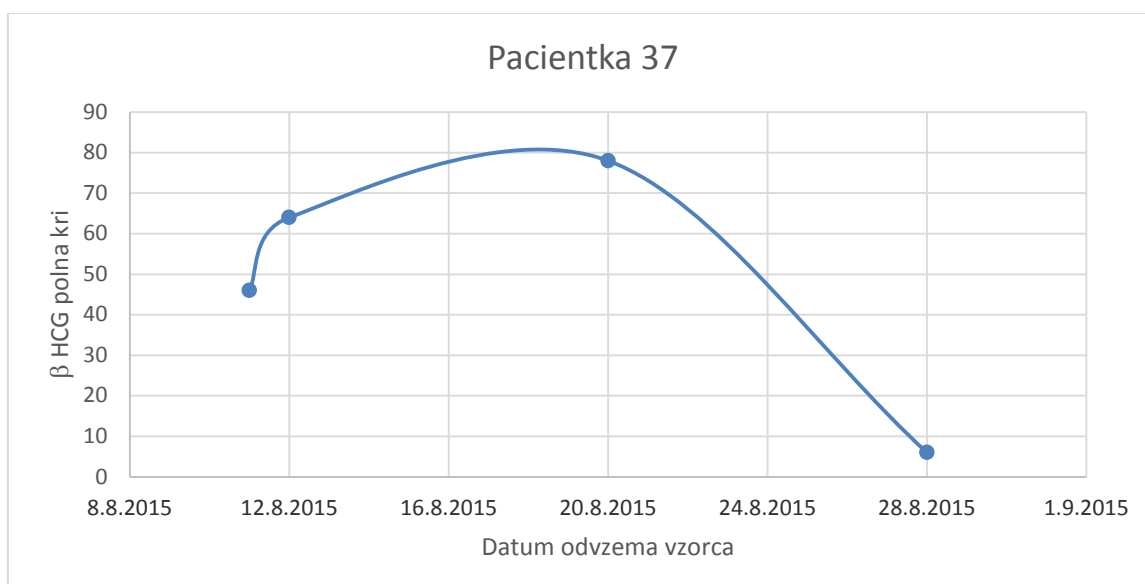
Slika 13: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri bolnici št. 12 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)

Komentar rezultatov izmerjenih in slikovno ponazorjenih vrednosti za to pacientko se nahaja v razpravi.



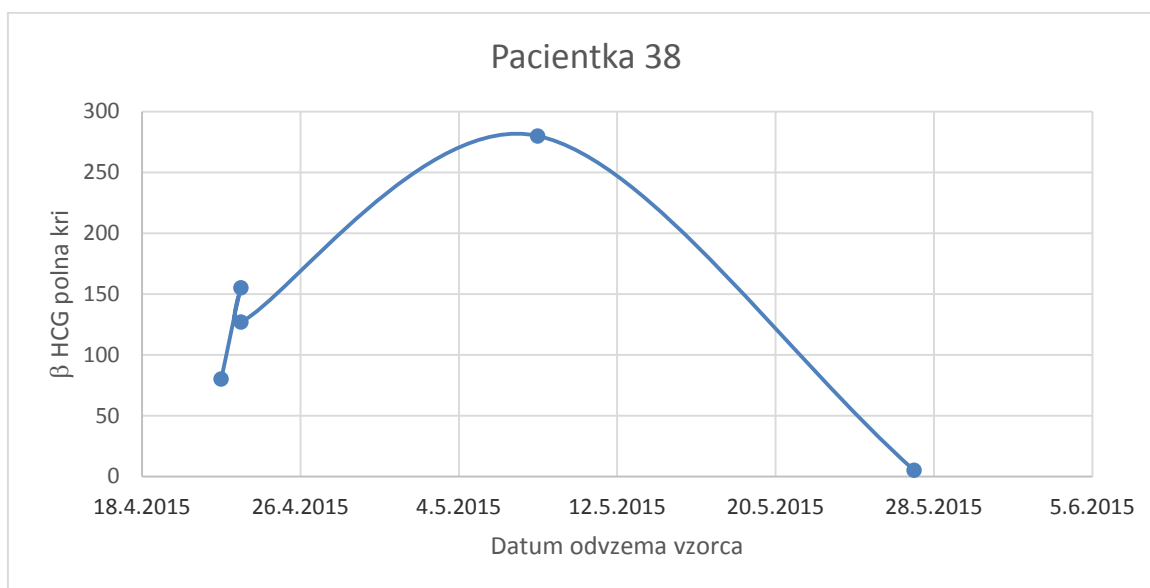
Slika 14: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri bolnici št. 26 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)

Komentar rezultatov izmerjenih in slikovno ponazorjenih vrednosti za to pacientko se nahaja v razpravi.



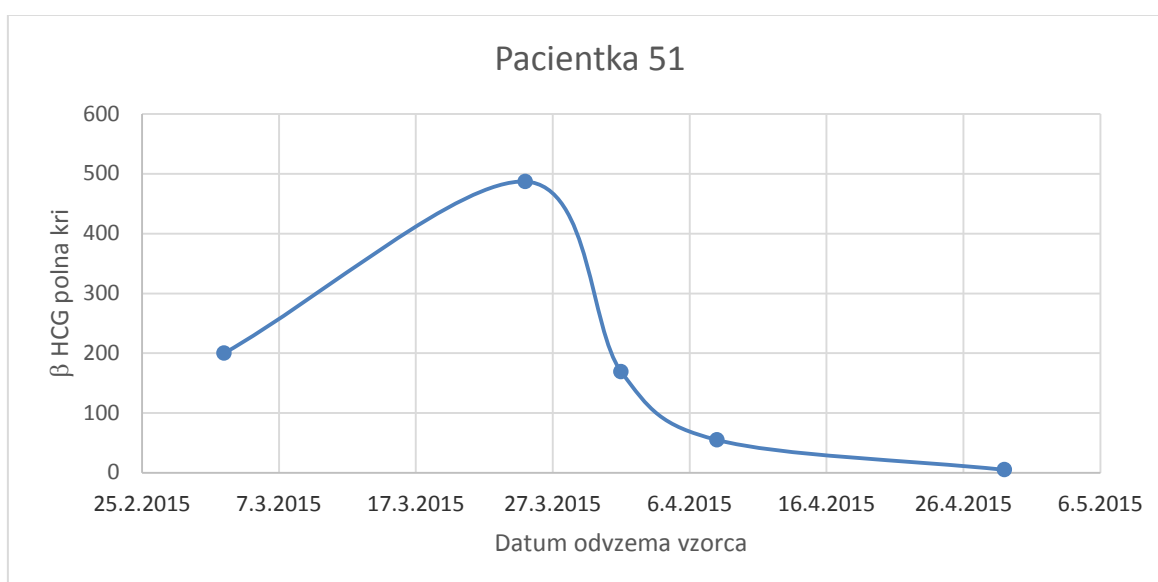
Slika 15: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 37 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)

Komentar rezultatov izmerjenih in slikovno ponazorjenih vrednosti za to pacientko se nahaja v razpravi.



Slika 16: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 38 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)

Komentar rezultatov izmerjenih in slikovno ponazorjenih vrednosti za to pacientko se nahaja v razpravi.



Slika 17: Prikaz gibanja koncentracij β -hCG pri pacientki št. 51 s potrjeno diagnozo izvenmaternične nosečnosti – pred in po umetni prekinitvi nosečnosti (pooperativno spremljanje pacientke)

Komentar rezultatov izmerjenih in slikovno ponazorjenih vrednosti za to pacientko se nahaja v razpravi.

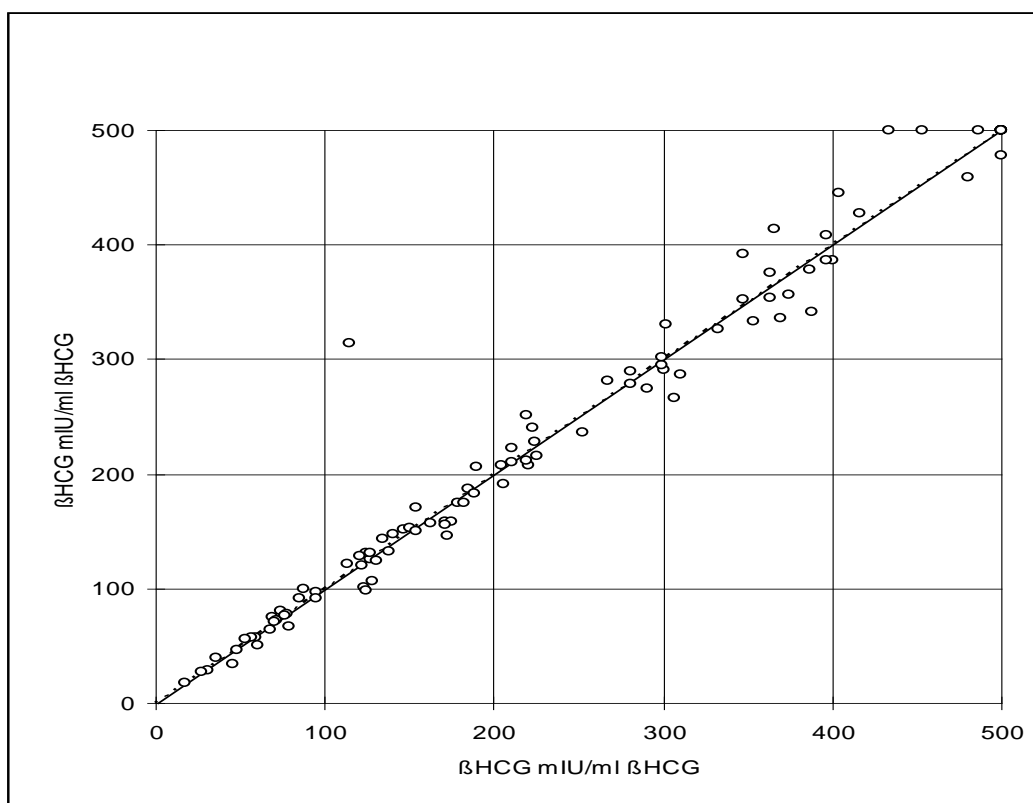
Kljub različnim oblikam krivulj postopnega upadanja koncentracij β -hCG pa lahko za celotno skupino pacientk, kjer smo pravočasno potrdili izvenmaternično nosečnost in pri katerih je bil izveden postopek umetne prekinitve nosečnosti, rečemo, da so izmerjene vrednosti β -hCG z ustrežno napovedno vrednostjo pokazale trend želenega postopnega upadanja koncentracij β -hCG po posegu. Izmerjene vrednosti koncentracij so pričakovane glede na teoretične, literaturno objavljene vrednosti za β -hCG.

4.6. Primerjava izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ (POCT analizator) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)

4.6.1. Rezultati validacije metode

Preglednica XIV: Rezultati primerjave izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)

Statistični parametri	Metoda X: PATHFAST HCG (mIU/ml)	Metoda Y: Siemens DCP Immulite HCG (mIU/ml)
MIN	5,80	1,00
MAKS	1422	1124
POVPR. VR.	315,1	244,2
MEDIANA	152,5	123,5
OBMOČJE	48,4	50,57
N (št. mer.)	100	100



Slika 18: Prikaz izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)

Rezultati primerjave izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator) (za izračun enačbe regresijske premice in koeficienta korelacije (r)).

$y = 0,836 x - 4,079$	$r = 0,969 (n=100)$
-----------------------	---------------------

Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca za primerjavo vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ in Siemens DCP Immulite (za izračun enačbe regresijske premice in koeficienta korelacije (r)). (34)

$y = 1,022 x - 2,10$	$r = 0,997 (n = 120)$
----------------------	-----------------------

5. RAZPRAVA

Koeficient korelacije vrednosti koncentracij β -hCG v heparinizirani plazmi in heparinizirani polni krvi

Namen diplomske naloge je bil prikazati oziroma preveriti ustreznost izvajanja analize vzorcev β -hCG iz polne krvi, smo pri preverjanju ustreznosti metode (tako validacije, kot v sklopu izvajanja meritev naše podskupine pacientk) naredili še primerjavo vrednosti β -hCG med heparinizirano plazmo in heparinizirano polno krvjo.

Včasih imamo na voljo vzorce plazme (za izvedbo biokemičnih analiz), ki so jih pacientkam odvzeli za potrebe ostalih preiskav, za nas pa to pomeni rezervni material za izvedbo meritev. Potrebno je bilo preveriti, ali lahko upoštevamo dobljene rezultate tako iz polne krvi kot tudi iz plazme in kakšna je moč povezave med obema spremenljivkama.

Pred začetkom izvajanja meritev smo najprej v preverili ustreznost POCT aparata v urgentni ambulanti za ginekologijo, Urgentnega bloka UKC v Ljubljani (UKCL), v populaciji slovenskih nosečnic. Nato smo dobljene vrednosti primerjali s priporočenimi vrednostmi proizvajalca za konkretni aparat in za konkretne statistične parametre za biokemični označevalec β -hCG. Meritve smo izvajali v obdobju od 1.12.2014 do 31.12.2014, kjer smo izmerili 100 vzorcev heparinizirane plazme in 100 vzorcev heparinizirane polne krvi, v populaciji skupine nosečnic, brez postavljenih dodatnih pogojev za vključitev v skupino preiskovank.

Koeficient korelacije za validacijo metode je znašal 0,980 in predstavlja zelo dobro linearno povezanost obeh spremenljivk (heparinizirane plazme in heparinizirane polne krvi) in na podlagi tega smo sklepali, da je v skupini nosečnic možno z enako pravilnostjo in napovedno vrednostjo meriti koncentracijo β -hCG iz plazme ali polne krvi. Rezultat naše metode je primerljiv s priporočeno referenčno vrednostjo proizvajalca za konkretni biološki označevalec.

Prednosti izvajanja analiz iz heparinizirane polne krvi so: ni nam potrebno čakati na rezultate, saj analiznega vzorca ni potrebno odnesti v laboratorij, ampak ga lahko

analiziramo na kraju odvzema samem; izpustimo lahko tudi fazo centrifugiranja vzorca. V urgentnih primerih, ko rezultat meritve potrebujemo takoj, je to zelo pomembno.

Po potrditvi ustreznosti validacije metode smo izvedli merjenje β -hCG v skupini pacientk s potrjeno nosečnostjo, ugotovljenim patološkim potekom nosečnosti ter sumom na izvenmaternično nosečnost. Meritve smo izvajali od 1.1.2015 do 31.8.2015, kjer smo izmerili 158 vzorcev heparinizirane plazme in 158 vzorcev heparinizirane polne krvi, 52 različnih pacientk, starih od 19 do 44 let. Za to podskupino pacientk s patološkim potekom nosečnosti smo se odločili zato, ker do sedaj ciljana raziskava napovednih vrednosti merjenja β -hCG še ni bila izvedena na slovenskih pacientkah.

Gre za podskupino pacientk kjer je nujna čimprejšnja in pravilna diagnoza izvenmaternične nosečnosti, in po potrditvi diagnoze, čimprejšnje ukrepanje (umetna prekinitve nosečnosti). V kolikor diagnoza ni postavljena pravočasno, nam lahko pacientka, v primeru natrgnaja ali razpoka mesta napačne ugnezditve oplojenega jajčeca, izkrvavi v 60 do 120 minutah. Dosedanji celotni čas, potreben izvedbo postopka, kot sledi: od oddaje naročila za preiskavo, odvzema vzorca, transporta vzorca do laboratorija, analizo vzorca v laboratoriju na klasičnem analizatorju, obdelavo rezultatov in objavo rezultatov v računalniškem sistemu, da ga klinik lahko prebere in se odloči za nadaljnje ukrepanje (TAT), sedaj znaša 220 minut, kar pa je v primeru potencialnega nujnega ginekološkega stanja (obilna krvavitev pacientke zaradi natrganja ali rupture strukture), predolga. Z uporabo POCT analizatorja, ki ga lahko uporabljamo ob pacientkini postelji, pa TAT lahko močno skrajšamo in pacientki zagotovimo pravočasno ukrepanje. Zato je bilo potrebno izvesti še primerjavo rezultatov meritev iz heparinizirane plazme in polne krvi za klasični analizator (Siemens DCP Immulite) in POCT analizator, ki je bil predmet naše diplomske naloge.

Ugotovili smo, da s POCT analizo TAT lahko skrajšamo na 40 – 50 minut, kot sledi: naročilo priskave: 2 minuti; odvzem in priprava vzorca pred preiskavo; 5 -10 minut; aplikacija vzorca na aparat; 1 minuta; POCT čas analize – 1 vzorec: 17 minut; več vzorcev hkrati: 26 minut. Odčitek rezultata iz sistema in odločitev za nadaljnje postopke zdravljenja oziroma ukrepanja: 2-10 minut. To pomeni, da bi lahko v primeru pacientke z akutno obilno krvavitvijo, ki je posledica ruptur strukture, kjer se je oplojeno jajčece

nepravilno ugneznilo; pri tej pacientki pravočasno izvedli potrebne preiskave za postavitve diagnoze in se odločili za začetek ustreznega ukrepanja.

Z validacijo metode smo ugotovili, da je korelacija izmerjenih vrednosti β -hCG tako za heparinizirano plazmo kot tudi za polno krvi med klasičnim analizatorjem in POCT zelo dobra in da je napovedna vrednost in pravilnost dobljenih rezultatov za oba tipa vzorcev (polna kri in plazma), dobra.

V skopu preverjanja točnosti, pravočasne diagnostike izvenmaternične nosečnosti smo pri 12 pacientkah od skupno 52, pravočasno potrdili izvenmaternično nosečnost. Po opravljeni umetni prekinitvi nosečnosti smo te pacientke z merjenjem laboratorijskih parametrov spremljali približno en mesec (literaturni podatek za prisotnost endogenega β -hCG v krvi) oziroma do referenčne vrednosti za spremljanje teh pacientk, ki znaša 15 mIU/ml, oziroma do mejne koncentracije 5 mIU/ml (za nenoseče ženske). Pri vrednosti te koncentracije β -hCG, lahko že rečemo, da so se vrednosti β -hCG po posegu normalizirale in da pacientka zagotovo ni več noseča.

Rezultate spremljanja postopnega upada koncentracije β -hCG pri 12 pacientkah s potrjenim sumom na izvenmaternično nosečnost in po opravljeni umetni prekinitvi nosečnosti smo posebej predstavili v preglednici XIII. Pri 6 pacientkah smo postopek upadanja koncentracij β -hCG slikovno ponazorili (slike 12 do 17) in podrobno pojasnili pomen izmerjenih vrednosti, kot sledi:

Pri pacientki številka 7 (slika 12) , je bil poseg umetne prekinitve nosečnosti opravljen 30.7.2015. Opazimo, da je en dan po opravljenem posegu izmerjena koncentracija β -hCG strmo padla na polovico vrednosti koncentracije β -hCG pred posegom, nato pa je v naslednjih 5 dneh padla na vrednost 9 mIU/ml, kar je nižje od naše referenčne vrednosti β -hCG za spremljanje pacientke (15 mIU/ml) in je zelo blizu vrednosti 5 mIU/ml za nenoseče ženske, kjer lahko z gotovostjo trdimo, da je okrevanje po operativnem posegu z vidika vrednosti hormona β -hCG v celoti zaključeno.

Pri pacientki številka 12 (slika 13), je bil poseg umetne prekinitve nosečnosti opravljen 5.8.2015. Opazimo, da je v enem tednu po opravljenem posegu izmerjena koncentracija β -hCG upadala bolj postopoma in je po 7 dneh znašala manj kot polovico vrednosti pred

opravljenim posegom. V naslednjih 3 dneh (do 18.8.2015) je bilo zmanjšanje koncentracije β -hCG zelo neznatno (manj kot 10 mIU/ml), nato pa je v naslednjih 5 dneh vrednost β -hCG strmo padla na 9 mIU/ml, kar je nižje od naše referenčne vrednosti β -hCG za spremljanje pacientke (15 mIU/ml) in je zelo blizu vrednosti 5 mIU/ml za nenoseče ženske, kjer lahko z gotovostjo trdimo, da je okrevanje po operativnem posegu z vidika vrednosti hormona β -hCG v celoti zaključeno.

Pri pacientki številka 26 (slika 14), je bil poseg umetne prekinitve nosečnosti opravljen 26.8.2015. Opazimo, da je v dveh dneh po opravljenem posegu izmerjena koncentracija β -hCG upadla skoraj na eno polovico vrednosti pred posegom, v naslednjih 2 dneh (30.8.2015) pa se je vrednost β -hCG zmanjšala na približno četrtno vrednosti pred posegom. Ker je bila hitrost postopnega upadanja koncentracije β -hCG dovolj velika, po tem datumu (čeprav je bila zadnja izmerjena vrednost 80 mIU/ml) pacientke z merjenjem laboratorijskih parametrov nismo več spremljali.

Pri pacientki številka 37 (slika 15), je bil poseg umetne prekinitve nosečnosti opravljen 20.8.2015. Opazimo, da je v osmih dneh po opravljenem posegu (28.8.2015) izmerjena koncentracija β -hCG znašala 6 mIU/ml, kar je nižje od naše referenčne vrednosti β -hCG za spremljanje pacientke (15 mIU/ml) in je zelo blizu vrednosti 5 mIU/ml za nenoseče ženske, kjer lahko z gotovostjo trdimo, da je okrevanje po operativnem posegu z vidika vrednosti hormona β -hCG v celoti zaključeno.

Pri pacientki številka 38 (slika 16), je bil poseg umetne prekinitve nosečnosti opravljen 8.5.2015. Opazimo, da je v devetnajstih dneh po opravljenem posegu (27.5.2015) izmerjena koncentracija β -hCG padla na 5 mIU/ml, kar predstavlja vrednost β -hCG za nenoseče ženske in kjer lahko z gotovostjo trdimo, da je okrevanje po operativnem posegu z vidika vrednosti hormona β -hCG v celoti zaključeno.

Pri pacientki številka 51 (slika 17), je bil poseg umetne prekinitve nosečnosti opravljen 25.3.2015. Opazimo, da je v sedmih dneh po opravljenem posegu (1.4.2015) izmerjena koncentracija β -hCG padla na 169 mIU/ml, kar znaša približno četrtno vrednosti pred posegom. V naslednjih 7 dneh (8.4.2015) je koncentracija postopoma upadla na 55 mIU/ml, kar znaša približno eno desetino vrednosti pred posegom. V 30 dneh po

opravljenem posegu pa je vrednost β -hCG dosegla vrednost 5 mIU/ml, kar predstavlja vrednost β -hCG za nenoseče ženske in kjer lahko z gotovostjo trdimo, da je okrevanje po operativnem posegu z vidika vrednosti hormona β -hCG v celoti zaključeno.

Kljub različnim oblikam krivulj postopnega upadanja koncentracij β -hCG pa lahko za celotno skupino pacientk, kjer smo pravočasno potrdili izvenmaternično nosečnost in pri katerih je bil izveden postopek umetne prekinitve nosečnosti, rečemo, da so izmerjene vrednosti β -hCG z ustrezno napovedno vrednostjo pokazale trend želenega postopnega upadanja koncentracij β -hCG po posegu. Izmerjene vrednosti koncentracij so pričakovane glede na teoretične, literaturno objavljene vrednosti za β -hCG.

Vzporedno s spremljanjem laboratorijskih vrednosti β -hCG pa je ginekolog spremljal te bolnice in nadzoroval stopnjo okrevanja po operativnem postopku. Ker je bila diagnoza izvenmaternične nosečnosti pravočasna, je bila s konservativno laparoskopsko metodo ohranjena rodnost in funkcionalna sposobnost teh nosečnic.

Sicer teh pacientk nadalje nismo spremljali, lahko pa rečemo, da bi spontano lahko ponovno zanosile že 2 meseca po opravljenem postopku umetne prekinitve nosečnosti ali pa bi jih po najmanj 6 mesecih lahko ponovno vključili v postopek umetne oploditve (IVF) oziroma zdravljenja morebitne neplodnosti.

Eksperimentalni rezultati izvedenih meritev spremljanja pacientk s sumom na izvenmaternično nosečnost, v sklopu te diplomske naloge, so ustrezali tako rezultatom validacije metode, ki smo jo izvedli na istem POCT analizatorju, v populaciji slovenskih nosečnic kot tudi priporočenim referenčnim vrednostim proizvajalca za posamezne konkretne statistične parametre. Z izvedenimi meritvami β -hCG v naši, sicer manjši, skupini slovenskih nosečnic, s sumom na izvenmaternično nosečnost, smo potrdili rezultate študij, ki so jih potrdili tudi drugi raziskovalci.

V literaturi najdemo nasprotujoče si sklepe, glede napovedne vrednosti merjenja β -hCG pri potrditvi diagnoze izvenmaternične nosečnosti (od zelo dobre napovedne vrednosti serije izmerjenih koncentracij β -hCG do popolne neuporabnosti takšnih rezultatov).

Prognoza smeri nadaljnega razvoja oziroma izboljšave obstoječih diagnostičnih metod

Obstoječi metodi za diagnostiko izvenmaternične nosečnosti sta kombinacija ultrazvočnega pregleda nosečnice in izvedba niza krvnih preiskav, ki pa so med drugim zelo drage. Tudi sam diagnostični proces lahko pri nosečnici s sumom na izvenmaternično nosečnost privede do značilnih psiholoških težav nosečnice, ki pa se jim želimo izogniti ali njihovo pojavnost vsaj čim bolj zmanjšati.

Raziskave potekajo v smeri iskanja univerzalnega biološkega označevalca, ki bi ustrezal naslednjim želenim lastnostim za detekcijo izvenmaternične nosečnosti:

- uporabnost označevalca za zgodnjo diagnostiko (zaželeno v prvem tromesečju, t.j. do zaključka 12. tedna oziroma pred zaključkom placentacije in materine srčno-žilne remodelacije);
- označevalec bi z zadostno verjetnostjo in tudi zanesljivostjo podal oceno prisotnega tveganja za razvoj patologije v nosečnosti, oziroma bi lahko nakazal podtip ene od oblik patoloških nosečnosti;
- da bi z njim lahko pri nosečnicah rutinsko določali pred obstoječe patogene, katerih funkcija zaenkrat še ni povsem pojasnjena, sumijo pa, da imajo ključno vlogo pri samem razvoju patoloških oblik nosečnosti;
- da bi omogočal enostavnost izvajanja meritev in možnost rutinske diagnostične uporabe, v sklopu diagnostičnih metod, ki jih sedaj že uporabljamo v prenatalni skrbi. To bi znižalo samo ceno izvajanja omenjene preiskave in omogočilo boljše dostopnost diagnostike širšemu krogu nosečnic po svetu.

Možni kandidati za nadaljnji razvoj idealnega biološkega označevalca so: inhibin A, aktivin A, aktivin B, VEGF, IL-6, IL-8, TNF- α , CA-125, relaksin, ...

Ne glede na kritike, da je cena večkratnega merjenja β -hCG v sklopu laboratorijskih preiskav, previsoka, menim, da bo merjenje β -hCG še naprej ostalo standardni diagnostični postopek tako za potrjevanje nosečnosti, kot tudi za napovedovanje in diferenciacijo patologij med nosečnostjo. Postopek izvajanja preiskave je dobro poznan in široko uporabljan. Z večanjem števila pacientk, vključenih v različne raziskave, bomo o prednostih pa tudi o omejitvah same metode, v prihodnje vedeli več. Nova spoznanja pa bodo nedvomno dodatno doprinesla k optimizaciji metode in njeni boljši stroškovni

učinkovitosti. Ker je metoda preprosta in jo je moč uporabljati tako v centralnih laboratorijih na klasičnih analizatorjih, kot tudi v sklopu merjenj ob pacientkini postelji, bo v prihodnje zaradi pogostejšega izvajanja teh meritev, cena reagentov tudi dodatno padla, kar bo omogočilo cenovno dostopnost aparatov in reagentov tudi tistim državam in ustanovam, ki si do sedaj omenjene preiskave cenovno niso zmogle privoščiti.

Nedvomno pa sama cena preiskave še vedno odtehta morebitne dodatne zaplete za nosečnico (izguba reproduktivne sposobnosti, operativni posegi, hospitalizacija, v nekaterih primerih celo smrt bolnice), ki pa so nedvomno časovno bolj potratni in s stališča stroškovne učinkovitosti obravnave teh bolnic absolutno predragi in se jim posledično želimo izogniti v kar se da veliki meri.

6. SKLEPI

Na podlagi primerjave koncentracij β -hCG iz heparinizirane plazme in polne krvi, katerih vrednosti smo izmerili na POCT analizatorju PATHFAST™, so sklepi diplomske naloge naslednji:

- **Merjenja vrednosti β -hCG lahko namesto v centralnem laboratoriju z enako kakovostjo in napovedno vrednostjo nadomestimo z merjenjem vrednosti β -hCG na POCT analizatorju** (prednosti; cenejša izvedba analize, krajši TAT, ustrezna primerljivost rezultatov tako za heparinizirano plazmo kot heparinizirano polno kri in posledično krajša obravnava pacientk v urgentni ginekološki ambulanti).
- **Za določanje vrednosti β -hCG lahko vzorec heparinizirane plazme nadomestimo s heparinizirano polno krvjo**
Čeprav želimo analize vzorcev prvenstveno izvajati iz polne krvi, smo pri preverjanju ustreznosti metode (tako validacije, kot v sklopu izvajanja meritev naše podskupine pacientk) naredili še primerjavo vrednosti med heparinizirano plazmo in heparinizirano polno krvjo. Včasih se nam namreč zgodi, da imamo vzorce plazme (za biokemične analize) na voljo v sklopu ostalih preiskav (za nas to predstavlja rezervni material). Na podlagi statistične obdelave dobljenih vrednosti lahko sklepamo, da je mogoče pri določanju koncentracije β -hCG, plazmo zamenjati s polno krvjo, saj so vrednosti znotraj meja dovoljenega. Prednosti izvajanja analiz iz heparinizirane polne krvi so: ni nam potrebno čakati na rezultate, saj analiznega vzorca ni potrebno odnesti v laboratorij, ampak ga lahko analiziramo na kraju odvzema samem; izpustimo lahko tudi fazo centrifugiranja vzorca. V urgentnih primerih, ko rezultat meritve potrebujemo takoj, je to zelo pomembno.
- Izračunani KV za meritve znotraj dneva pri vzorcih plazme je znašal 3,45 %, pri polni krvi pa 4,08. KV med dnevi je znašal od 4,6 % do 7,7 %. Iz tega sklepamo, da se izmerjene vrednosti med različnimi dnevi med seboj bistveno ne razlikujejo in kažejo na to, da ni prisotnih morebitnih motenj, ki bi lahko bistveno spremenile rezultat.
- Izračunana vrednost korelacije pri validaciji metode znaša 0,980 kar kaže na zelo visoko stopnjo linearne povezanosti obeh spremenljivk. Izračunana vrednost korelacije pri izvajanju meritev pri podskupini nosečnic s sumom na

izvenmaternično nosečnost je 0,8448, kar kaže na visoko stopnjo linearne povezanosti. Razlog za manjšo povezanost je lahko v tem, da posamezne meritve, ki zelo odstopajo od povprečja vplivajo na obseg merilnega območja in na povprečno vrednost, čeprav dejansko nekega resnega vpliva na same vrednosti meritev nimajo.

- Izračunani statistični parametri so pokazali, da so rezultati kljub moji neizkušenosti in odsotnosti strokovne usposobljenosti za delo v kliničnem laboratoriju potrdili primernost metode. Dobljene vrednosti so bile primerljive s priporočenimi referenčnimi vrednostmi proizvajalca in objavljenimi literaturnimi podatki. Kljub večjim nihanjem koncentracij β -hCG v skupini nosečnic s prisotno patologijo ali brez nje, meritve in izračuni statističnih parametrov niso pokazali bistvenih odstopanj in potrebe po izvedbi dodatnih meritev.
- V obdobju 8 mesecev smo opravili 158 meritev pri 52 pacientkah s sumom na izvenmaternično nosečnost. Diagnozo smo pravočasno potrdili pri 12 pacientkah, ki so bile ustrezno obravnavane (prekinitev nosečnosti) in klinično in laboratorijsko spremljane v obdobju po opravljenem posegu. Funkcionalna sposobnost rodil in rodnost sta bili v tej skupini pacientk v celoti ohranjeni.
- Pri pacientkah s potrjenim sumom na izvenmaternično nosečnost smo s slikovnim prikazom vrednosti posameznih meritev dokazali, postopen trend upadanja koncentracij β -hCG po umetni prekinitvi nosečnosti. Tako, kot je za vsako pacientko specifična začetna koncentracija β -hCG kot tudi njeno naraščanje med normalno in patološko nosečnostjo, pa je nedvomno mogoče razbrati postopen upad koncentracije β -hCG skozi celotno časovno obdobje spremljanja pacientk (približno en mesec po opravljenem posegu) oziroma do referenčne vrednosti koncentracije β -hCG 15 mIU/ml, oziroma do 5 mIU/ml, ki predstavlja vrednost za nenoseče ženske.

LITERATURA

1. Berkow, R, Beers, M.H. in Fletcher, A.J. MSD Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo. [avt. knjige] Beers M.H., Fletcher A.J. Berkow R. *MSD Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo*. Ljubljana : Mladinska knjiga, 2005, str. 1-1515.
2. Obreza, A. Farmaceutvski terminološki slovar. [avt. knjige] Obreza A. *Farmaceutvski terminološki slovar*. s.l. : ZRC, ZRC SAZU, 2011, str. 1-371.
3. Kališnik, M., in drugi. Slovenski medicinski slovar. *Slovenski medicinski slovar*. Ljubljana : Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Mladinska knjiga, 2002, str. 1-1007.
4. Osredkar, J. Downov sindrom - laboratorijska diagnostika; Medicinski razgledi letnik 34. številka 3 (1995) str. 343-366. [Elektronski] 3 1995.; dostop: 9. 10 2016; pridobljeno iz <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-UG3EA2CK>.
5. Placentation. [Elektronski] Wikipedia, 29. 6 2016.; dostop: 15. 7 2016; pridobljeno iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Placentation>.
6. Placenta. [Elektronski] Wikipedia, 2016.; dostop: 20. 7 2016; pridobljeno iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Placenta>.
7. Blejec, T. Fiziološke spremembe v nosečnosti – prilagoditev nosečnice na nosečnost; Prispevek na konferenci. [Elektronski] 2004.; dostop: 6. 9 2016.; pridobljeno iz <http://www.ztm.si/uploads/publication/967/971.pdf>.
8. Lozeau, A. M. in Potter, B. Diagnosis and Management of Ectopic Pregnancy. [Elektronski] University of Wisconsin Medical School-Madison, Madison, Wisconsin, 1. 11 2005. ; dostop: 15. 8 2016., pridobljeno iz <http://www.gynecologia.com/ve/PDF/Ectopico%202005.pdf>.
9. Murray, H., in drugi. *Diagnosis and treatment of ectopic pregnancy*. s.l. : CMAJ , 2005, str. 173;905-912.
10. Marolt Meden, B. Zunajmaternična nosečnost (Po operaciji (laparoskopski poseg) spontano zanosi v maternici 70 odstotkov žensk). [Elektronski] Dnevnik, 13. 9 2007.; dostop: 15. 6 2016; pridobljeno iz <https://www.dnevnik.si/268293/zdravje/arhiv/268293>.
11. Grmec, Š. Izbrana nujna stanja v ginekologiji in porodništvu; . *NUJNA stanja: priročnik; 5. izdaja*. Ljubljana : Združenje zdravnikov družinske medicine SZD, 2008, str. str 143-167.
12. Mamoru, M., in drugi. Embryo loss pattern is predominant in miscarriages with normal chromosome karyotype among women with repeated miscarriage. [Elektronski] 2016.; dostop: 5. 9 2016; pridobljeno iz <http://humrep.oxfordjournals.org/content/19/11/2644.long#target-1>.

13. Tsikouras, Panagiotis in drugi, in. Ectopic Pregnancy – Modern Diagnosis and Management; chapter 1. [Elektronski] IN TECH, 10 2011; dostop: 23. 8 2016; pridobljeno iz <http://www.intechopen.com/>.
14. Sepillian, V.P., Wood, E. in drugi, in. Ectopic Pregnancy - Medscape update 2016 Jul. [Elektronski] 7 2016.; dostop: 20. 7 2016; pridobljeno iz <http://emedicine.medscape.com/article/2041923-overview#showall>.
15. Pavlev, P.E. in Zubieta-Calleja, G. Variations in plasma hormone during pregnancy (42 weeks). [Elektronski] New Human Physiology, 2004; dostop: 15. 8 2016.; pridobljeno iz <http://www.zuniv.net/physiology/book/chapter29.html>.
16. Nosečnost. [Elektronski] Wikipedia, 15. 5 2015; dostop: 12. 7 2016.; pridobljeno iz <https://sl.wikipedia.org/wiki/Nose%C4%8Dnost>.
17. Lodrant, S., Kocjan, M in Binter, J. Vse o nosečnosti in porodu. *Vse o nosečnosti in porodu*. Izola : Meander, 2005, str. str. 60-65;.
18. Johnson, R., in drugi. Vse o nosečnosti in otrokovem prvem letu (Najpopolnejši vodnik za bodoče starše). *Mayo Clinic complete book of pregnancy & baby's first year*. Ljubljana : Educy, 2003, str. p 1-680.
19. Švarc-Urbančič, T. in Videmšek, M. S športom v zdravo nosečnost. *S športom v zdravo nosečnost*. Ljubljana : Fakulteta za šport, 1997.
20. Cacciatore, B., Stenman, U.-H. in Ylöstalo, P. *Early screening for ectopic pregnancy in high-risk symptom-free women*. s.l. : Lancet, 1994, str. 343;517-518.
21. Human chorionic gonadotropin. [Elektronski] Wikipedia, 2016.; dostop: 29. 8 2016; pridobljeno iz: https://en.wikipedia.org/wiki/Human_chorionic_gonadotropin.
22. Stenman, Ulf-Håkan, in drugi. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. [Elektronski] Hum Reproduction Update, 11 2006; dostop: 9. 9 2016; pridobljeno iz <http://humupd.oxfordjournals.org/content/12/6/769.long>.
23. Human Chorionic Gonadotropin (HCG). [Elektronski] WebMD, 2016; dostop: 10. 7 2016; pridobljeno iz <http://www.webmd.com/baby/human-chorionic-gonadotropin-hcg#1>.
24. Nisula, BC., in drugi. Metabolic fate of human choriogonadotropin. [Elektronski] 1989; dostop: 5. 9 2016; pridobljeno iz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2689781>.
25. Lučovnik, M., in drugi. Prekinitve nosečnosti zaradi razvojnih nepravilnosti plodov - analiza 4-letnega obdobja.; Zdravniški vestnik letnik 78. številka 1 (2009) str. I-91-I-95;. [Elektronski] 1 2009; dostop: 9. 10 2016; pridobljeno iz <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-UEMCJMWO>.
26. Bricelj, K., in drugi. Analiza četvernega testa za odkrivanje trisomije 21 in trisomije 18 v drugem trimesečju nosečnosti; Zdravniški vestnik letnik 83. številka 9 (2014) str. 597-602.

- [Elektronski] 9 2014; dostop: 9. 10 2016; pridobljeno iz <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-FRGXSMSH>.
27. Malone, FD1, in drugi. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. [Elektronski]; dostop: 12.9.2016; pridobljeno iz <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa043693>.
 28. Vozelj, M. Imunologija; 1. izdaja. *Imunologija; 1. izdaja*. Ljubljana : DZS, 1996, str. 7-373.
 29. Osredkar, J., Meglič, L. in Cvjetičanin, B. Uporaba analizatorja POCT v urgentnem. *Zdrav. Vestnik*. 2009, str. I-292-I-293.
 30. McCudden, CR, Willis, MS in Grenache, DG. Persistent Low Concentration of Human Chorionic Gonadotropin in a Nonpregnant Woman. [Elektronski] *Clinical Chemistry*, 2008; dostop: 28. 7 2016; pridobljeno iz <http://clinchem.aaccjnls.org/content/54/1/209>.
 31. Pathfast™ Operator's Manual; Version 2.0 (limited accessibility). 2005.
 32. PATHFAST® Immunoanalyzer Technical Specifications. [Elektronski] LSI Medience Corporation, 2016; dostop: 15. 6 2016; pridobljeno iz <http://www.pathfast.com/pathfast-immunoanalyzer-technical.php>.
 33. PATHFAST® Immunoanalyzer Operation. [Elektronski] LSI Medience Corporation, 2016; dostop: 15. 6 2016; pridobljeno iz <http://www.pathfast.com/pathfast-immunoanalyzer-operation.php>.
 34. PATHFAST® HCG REAGENT FOR PATHFAST®. [Elektronski] Mitsubishi Chemical Europe GmbH, 2016; dostop: 5. 8 2016; pridobljeno iz http://www.pathfast.eu/images/stories/download/data_HCG.pdf.
 35. Quantitative measurement of all analyses in parallel, Trop I sensitive, NTproBNP, D-Dimer, hsCRP, Myoglobin, HCG, CK-MB mass, PATHFAST™. [Elektronski] Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Germany, 2014; dostop: 7. 9 2016; pridobljeno iz http://medesa.cz/wp-content/uploads/dokumenty/1114-0000/PROSPEKT%20ENG_Pathfast.pdf.
 36. Nikolić, B. STATISTIKA (skripta). [Elektronski] Edukacijsko-rehabilitacijski fakultet Sveučilišta Zagrebu; dostop: 2. 9 2016; pridobljeno iz http://www.erf.unizg.hr/stari_web/Studenti/Dokumenti/StatistikaZadaci.doc.
 37. Petz, B. *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Zagreb : SNL, 1985, str. 21, 37-312.
 38. Rejc, B., Geršak, K. in Osredkar, J. Oksidacijski stres in nosečnost; *Farmaceutski vestnik*; 2012, letnik 63, številka 3. [Elektronski] 3 2012.; dostop: 10. 9 2016; pridobljeno iz <http://www.dlib.si/preview/URN:NBN:SI:DOC-ZN8ZADPZ/e1dba399-933d-4db5-9341-9490d034270a>.

39. Chohan, N.D., in drugi. *CLINICAL LABORATORY TESTS, values and implication, 3rd Edition*. s.l. : Springhouse, 2001, str. 1-692.
40. What's Magtration® Technology? [Elektronski] Precision System Science Co., Ltd., 2016.; dostop: 12. 7 2016; pridobljeno iz <http://www.pss.co.jp/english/technology/introduction/technology1-1.html>.
41. Moore, J., Tay, JI. in Walker, J. *Ectopic Pregnancy*. s.l. : British Medical Journal, 2000
42. Erondu, FO, et al. Atypical Clinical Sonographic Presentation of Ectopic Pregnancy: A Case Report. [Online] May 2010; dostop: 23 8 2016; pridobljeno iz <http://www.interestjournals.org/JMMS>.

DODATEK

7. Validacija analizne metode za merjenje koncentracije β -hCG v heparinizirani polni krvi in heparinizirani plazmi

7.1. Ponovljivost znotraj dneva

Ponovljivost znotraj dneva pomeni, da preverjamo, kako se razlikujejo rezultati enega vzorca pri več ponovitvah, ki jih naredimo v enem dnevu in kakšna so odstopanja. (36) (37) V primeru prevelikih odstopanj, lahko posumimo, da je nekje prišlo do napake. V ta namen smo izvedli po 20 meritev s 3 paralelkami vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi.

Izmerjene vrednosti so prikazane v preglednici XV, izračunani ustrezni statistični parametri pa so predstavljeni v preglednici XVI.

Zaradi večjega števila izmerjenih vrednosti, so rezultati v tabeli predstavljeni na več straneh.

Preglednica XV: Izmerjene vrednosti β -hCG iz vzorcev plazme in vzorcev polne krvi za preverjanje ponovljivosti znotraj dneva

Št. meritve	Heparinizira -na plazma 1 (hCG (IU/l))	Heparinizira- na plazma 2 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na plazma 3 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 1 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 2 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 3 (hCG (IU/l))
1	0,226	278	27,4	20,7	395	31,7
2	0,299	288	27,3	19,6	373	31,2
3	0,297	297	26,9	20,0	351	31,0
4	0,237	293	26,3	20,8	370	29,7
5	0,338	299	27,9	20,0	387	28,9
6	0,171	293	28,2	19,2	348	28,8
7	0,438	308	24,8	20,2	377	31,2
8	0,193	300	26,4	21,5	411	29,4

Št. meritve	Heparinizira -na plazma 1 (hCG (IU/l))	Heparinizira-na plazma 2 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na plazma 3 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 1 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 2 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 3 (hCG (IU/l))
9	0,275	316	26,8	20,7	406	30,7
10	0,229	301	26,7	21,1	387	28,4
11	0,275	303	26,3	20,2	414	29,4
12	0,447	305	26,4	20,4	374	28,6
13	0,241	305	27,6	19,7	384	31,8
14	0,260	290	26,6	19,8	379	31,4
15	0,316	299	28,4	21,1	389	31,0
16	0,226	283	28,1	20,2	406	29,5
17	0,462	303	26,8	20,2	371	29,3
18	0,310	292	26,4	21,2	370	28,8
19	0,467	288	25,9	21,1	398	32,7
20	0,352	274	25,7	19,9	386	32,2

Preglednica XVI: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za preverjanje ponovljivosti znotraj dneva

	Heparinizira -na plazma 1 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na plazma 2 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na plazma 3 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 1 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 2 (hCG (IU/l))	Heparinizira -na polna kri 3 (hCG (IU/l))
VSOTA	6,059	5915	536,9	407,6	7674	605,4
MIN	0,171	274	24,8	19,2	348	28,4
MAKS	0,467	316	28,4	21,5	414	32,7
POVPR. VR.	0,303	296	26,8	20,4	384	30,3
SD	0,090	10,44	0,904	0,623	18,13	1,347
KV (%)	29,7	3,53	3,37	3,06	4,73	4,45
N (št. mer.)	20	20	20	20	20	20

7.2. Ponovljivost med dnevi

Ponovljivost med dnevi opisuje sipanje rezultatov analiz istega kontrolnega vzorca v različnih serijah. (36) (37) Tri kontrolne vzorce nizke, srednje in visoke vrednosti smo na analizatorju določali v obdobju 20 dni. Vsak dan smo naredili po 4 ponovitve. Za kontrolne vzorce smo uporabili material, ki ima identične značilnosti kot plazma. Preverili smo določanje nizkih, srednjih in visokih koncentracij β -hCG.

Izmerjene vrednosti β -hCG v heparinizirani plazmi in polni krvi so prikazane v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Vrednosti izmerjenih vzorcev β -hCG heparinizirane plazme in polne krvi (določitev ponovljivosti med dnevi)

Zaporedni dnevi izvajanja meritev	Datum	QC 1		QC 2		QC 3	
		(hCG (IU/l))		(hCG (IU/l))		(hCG (IU/l))	
1.	1.12.2014	18,9	18,7	68,5	69,0	282	305
	1.12.2014	20,6	20,4	69,4	71,8	299	186
2.	2.12.2014	19,4	21,5	69,6	71,4	300	311
	2.12.2014	19,4	18,9	68,6	59,1	297	306
3.	3.12.2014	19,0	20,8	74,7	68,9	327	306
	3.12.2014	19,8	20,3	69,0	71,5	284	293
4.	4.12.2014	19,4	18,1	70,4	68,1	291	286
	4.12.2014	16,8	21,2	75,3	68,7	327	301
5.	5.12.2014	18,7	19,2	74,8	71,7	302	286
	5.12.2014	19,7	19,1	82,3	64,6	318	294
6.	8.12.2014	20,5	18,9	70,8	70,1	322	316
	8.12.2014	19,7	19,2	71,5	69,0	288	294
7.	9.12.2014	19,3	19,3	70,4	70,6	297	305
	9.12.2014	18,6	20,4	71,8	70,1	316	312
8.	10.12.2014	18,1	18,5	71,7	67,4	323	307

Zaporedni dnevi izvajanja meritev	Datum	QC 1 (hCG (IU/l))		QC 2 (hCG (IU/l))		QC 3 (hCG (IU/l))	
	10.12.2014	17,9	21,0	71,5	70,0	303	323
9.	11.12.2014	21,2	20,4	70,0	67,4	302	306
	11.12.2014	18,8	18,7	69,9	72,7	296	278
10.	12.12.2014	20,0	18,5	64,0	65,7	285	269
	12.12.2014	17,3	18,7	75,7	76,6	318	310
11.	15.12.2014	19,9	17,1	63,3	63,2	257	272
	15.12.2014	17,5	20,0	68,6	68,3	285	282
12.	16.12.2014	20,0	18,6	71,3	67,1	293	284
	16.12.2014	18,9	17,6	67,7	63,9	283	276
13.	17.12.2014	17,6	17,2	65,3	65,6	284	286
	17.12.2014	17,0	18,3	67,9	68,8	279	293
14.	18.12.2014	18,7	19,4	70,6	68,7	275	278
	18.12.2014	19,2	19,3	72,8	69,2	301	281
15.	19.12.2014	20,0	18,7	66,3	66,6	296	300
	19.12.2014	17,9	18,3	69,0	66,3	284	276
16.	22.12.2014	17,7	17,9	73,5	64,0	335	272
	22.12.2014	18,5	19,7	69,1	71,6	286	314
17.	23.12.2014	19,7	17,4	64,2	63,4	271	275
	23.12.2014	18,5	18,1	65,3	66,4	293	288
18.	24.12.2014	18,7	17,4	65,9	67,6	292	281
	24.12.2014	17,8	18,0	66,2	68,8	295	294
19.	29.12.2014	18,0	18,4	70,3	68,8	299	309
	29.12.2014	18,8	17,6	65,6	65,6	286	280
20.	30.12.2014	17,7	18,3	67,4	68,1	295	311
	30.12.2014	19,4	18,8	67,7	68,1	282	285

Izračunane statistične vrednosti β -hCG v heparinizirani plazmi in polni krvi so prikazane v preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za preverjanje ponovljivosti med dnevi

	QC 1		QC 2		QC 3	
	(hCG (IU/l))		(hCG (IU/l))		(hCG (IU/l))	
VSOTA	754,6	757,7	2788,1	2724,5	11848,7	11629,4
MIN	16,8	17,1	63,3	59,1	257	186
MAKS	21,2	21,5	82,3	76,6	335	323
POVPR. VR.	18,9	18,9	69,7	68,1	296	291
SD	1,03	1,14	3,73	3,13	16,66	22,35
KV%	5,45	6,01	5,35	4,59	5,62	7,69
N(število meritev)	40	40	40	40	40	40

7.3. Analitična občutljivost metode določanja β -hCG/meja detekcije (LoD)

Je najmanjša izmerjena koncentracija na osnovi katere lahko določimo prisotnost analita z zadostno statistično gotovostjo. (36) (37) Analitično občutljivost lahko izračunamo z uporabo različnih pristopov. Izmerili smo jo z uporabo proizvajalčevega kalibratorja 1 (Calibrator 1; 0 mIU/ml)) in v eni seriji izmerili koncentracije β -hCG 20 ustreznim slepim vzorcem.

Analitično občutljivost smo izračunali kot navidezno vsebnost analita, ki ustreza povprečni vrednosti kalibratorja 1 ter ji za določanje koncentracije pri slepih vzorcih prišteli dvakratno vrednost standardne deviacije (2 SD) (Preglednica XIX in Preglednica XX).

Izmerjene vrednosti slepih vzorcev β -hCG za določitev analitične občutljivosti so prikazane v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Vrednosti slepih vzorcev β -hCG za določitev analitične občutljivosti (LoD)

Številka meritve	(CAL-1)
	(mIU/l)
1.	0,07695
2.	0,02375
3.	0,04465
4.	0,13585
5.	0,0133
6.	0,04465
7.	0
8.	0,038
9.	0,09312
10.	0,06497
11.	0,2413
12.	0,05529
13.	0,00095
14.	0,05035
15.	0,064
16.	0
17.	0,0040
18.	0,0214
19.	0,15865
20.	0,00495

Izračunane statistične vrednosti β -hCG za določitev analitične občutljivosti so prikazane v preglednici XX.

Preglednica XX: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za določitev analitične občutljivosti (LoD)

Statistični parametri	(CAL-1) (mIU/l)
VSOTA	1,136144
MIN	0
MAKS	0,2413
POVPR. VREDNOST	0,057
SD	0,062
KV%	108,77
N(število meritev)	20

7.4. Funkcionalna občutljivost metode določanja β -hCG/meja detekcije (LoQ)

Izmerili smo sipanje dobljenih rezultatov oz. velikost narejene statistične napake. (36) (37) Funkcionalno občutljivost (vrednost 20 % CV) smo preverili tako, da smo štiri združene vzorce, sestavljene iz različnih vzorcev plazme (Pool 1-4) preverjali štiri dni. Vsak dan smo za vsak vzorec izvedli pet meritev. Z združevanjem vzorcev smo pripravili vzorec z nizkimi, srednjimi in visokimi koncentracijami β -hCG.

Izmerjene vrednosti združenih vzorcev β -hCG heparinizirane plazme z nizkimi, srednjimi in visokimi koncentracijami β -hCG za določitev funkcionalne občutljivosti so prikazane v preglednici XXI.

Preglednica XXI: Izmerjene vrednosti združenih vzorcev β -hCG heparinizirane plazme z nizkimi, srednjimi, visokimi koncentracijami β -hCG (določanje funkcionalne občutljivosti (LoQ))

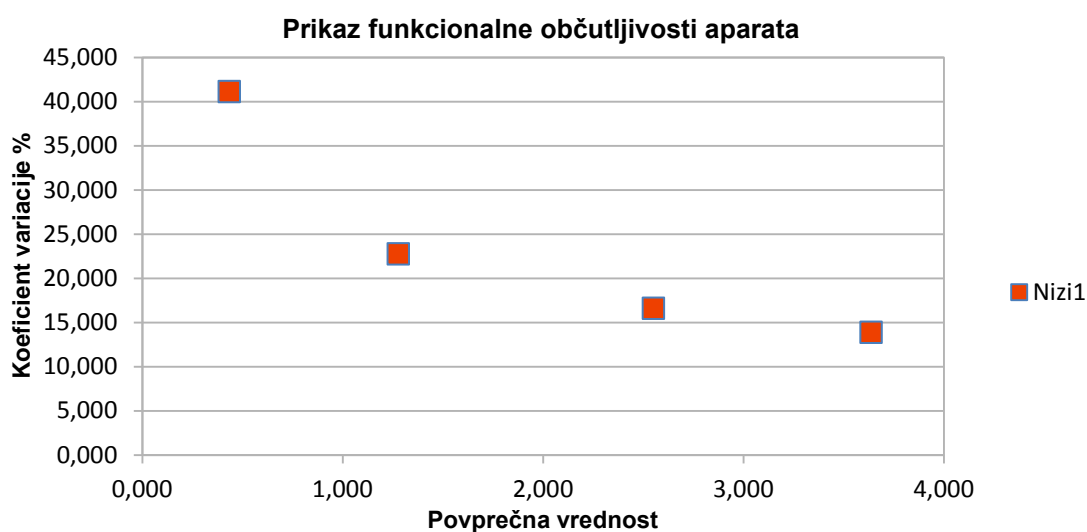
Zaporedni dnevi izvajanja meritev	Datum	Združeni vzorci	Združeni vzorci	Združeni vzorci	Združeni vzorci
		1 -Nizke	2 -Srednje	3 -Srednje	4 -Visoke
		vrednosti konc.	vrednosti konc	vrednosti konc	vrednosti konc
		(Low)	(Medium)	(Medium)	(High)
		(hCG (IU/l))	(hCG (IU/l))	(hCG (IU/l))	(hCG (IU/l))
1.	15.12.2014	0,317	1,205	2,874	4,285
	15.12.2014	0,274	1,154	3,378	4,460
	15.12.2014	0,332	1,040	3,296	3,821
	15.12.2014	0,382	1,349	2,884	3,883
	15.12.2014	0,574	1,236	2,606	4,110
2.	16.12.2014	0,493	1,844	2,699	4,213
	16.12.2014	0,283	1,926	3,142	4,202
	16.12.2014	0,321	1,813	2,575	3,986
	16.12.2014	0,513	1,627	2,348	3,687
	16.12.2014	0,320	1,370	2,750	3,636
3.	17.12.2014	0,765	1,257	1,792	2,894
	17.12.2014	0,942	1,071	2,348	2,987
	17.12.2014	0,656	1,123	2,019	2,853
	17.12.2014	0,439	1,082	2,050	3,131
	17.12.2014	0,386	1,102	2,379	3,049
4.	18.12.2014	0,321	0,989	2,421	3,780
	18.12.2014	0,365	1,071	2,616	3,512
	18.12.2014	0,374	1,051	2,513	3,811
	18.12.2014	0,278	1,123	2,204	3,378
	18.12.2014	0,335	1,112	2,122	3,059

Izračunane statistične vrednosti β -hCG za določanje funkcionalne občutljivosti so prikazane v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Izračunane statistične vrednosti β -hCG za določanje funkcionalne občutljivosti (LoQ)

	Združeni vzorci 1 - Nizke vrednosti konc. (Low) (hCG (IU/l))	Združeni vzorci 2 - Srednje vrednosti konc (Medium) (hCG (IU/l))	Združeni vzorci 3 - -Srednje vrednosti konc (Medium) (hCG (IU/l))	Združeni vzorci 4 -Visoke vrednosti konc (High) (hCG (IU/l))
VSOTA	8,672	25,544	51,016	72,739
MIN	0,274	0,989	1,792	2,853
MAKS	0,942	1,926	3,378	4,460
POVPR. VR.	0,434	1,277	2,551	3,637
SD	0,178	0,291	0,424	0,505
KV%	41,162	22,772	16,626	13,889
N(število meritev)	20	20	20	20

Slikovni prikaz funkcionalne občutljivosti aparata PATHFAST™ (LoQ) je vključen v sliko 19.



Slika 19: Prikaz funkcionalne občutljivosti aparata PATHFAST™ (LoQ)

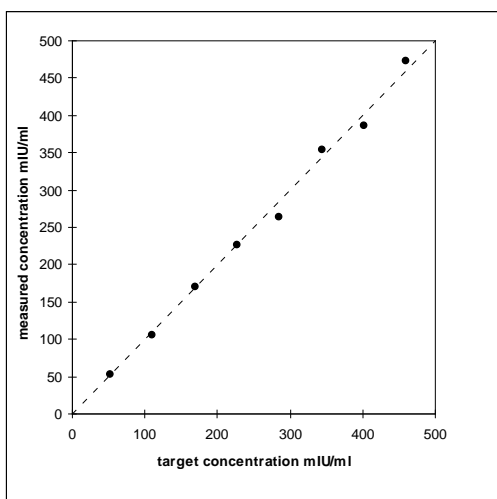
7.5. Linearnost razredčitve

Na treh različnih vzorcih heparinizirane plazme, katerih koncentracije β -hCG so bile znotraj celotnega merilnega območja, smo izvedli serijo 11 razredčitev v dveh paralelkah, z uporabo raztopine natrijevega klorida ($\text{NaCl} = 0,15 \text{ mol/l}$).

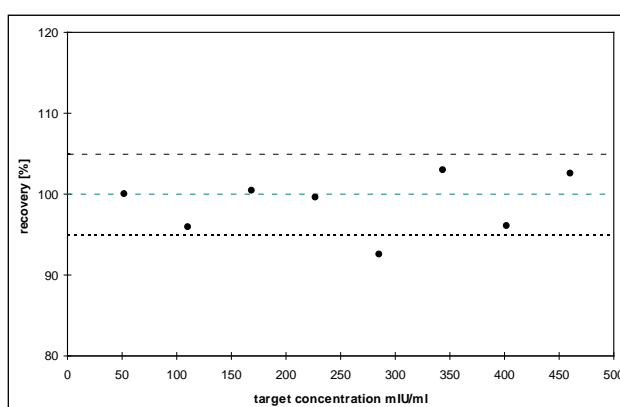
Podatke za nerazredčene vzorce in podatke po izvedeni seriji razredčitev smo ovrednotili z uporabo standardne laboratorijske metode za oceno linearnosti razredčitve. (Preglednica XXIII, Preglednica XXIV, Preglednica XXV).

Preglednica XXIII: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Stopnja razredčitve		HCG izmerjena vrednost (mIU/ml)			Teoretična vrednost (mIU/ml)	Recovery HCG (%)
Nizka	Visoka	N1	N2	Povprečna vrednost (MEAN)		
1,0	0,0	0,029	4,04	2,03	-6,15	/
0,9	0,1	48,6	55,7	52,15	52,15	100,0
0,8	0,2	108,0	104,0	106,0	110,5	96,0
0,7	0,3	167,0	172,0	169,5	168,8	100,4
0,6	0,4	218,0	234,0	226,0	227,0	99,5
0,5	0,5	266,0	262,0	264,0	285,0	92,5
0,4	0,6	359,0	349,0	354,0	343,0	103,0
0,3	0,7	382,0	390,0	386,0	401,0	96,0
0,2	0,8	484,0	460,0	472,0	460,0	102,5
0,1	0,9	>500	>500	>500	/	/
0,0	1,0	>500	>500	>500	/	/



Slika 21: Prikaz sipanja izmerjenih in teoretičnih vrednosti vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)



Slika 201: Prikaz sipanja povprečnih vrednosti od normale vzorca plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

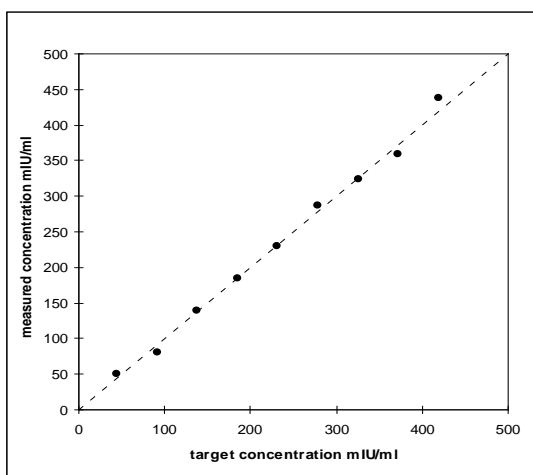
Enačba premice in koeficient korelacije (r) za (linearnost razredčitve) za vzorce plazme 1 po seriji razredčitev z raztopino NaCl

$$y = 583 x - 6,145$$

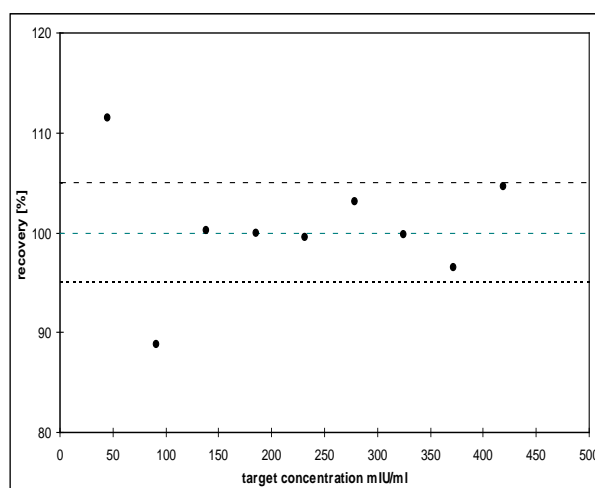
$$r = 0,9975$$

Preglednica XXIV: Izmerjene vrednosti hepariniziranega vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Stopnja razredčitve		HCG izmerjena vrednost (mIU/ml)		Povprečna vrednost (MEAN)	Teoretična vrednost hCG (mIU/ml)	Recovery (%)
Nizka	Visoka	N1	N2			
1,0	0,0	<0	<0	41,9	/	/
0,9	0,1	49,5	50,3	49,9	44,75	111,5
0,8	0,2	82,1	80,3	81,2	91,5	88,7
0,7	0,3	137,0	140,0	138,5	138,3	100,2
0,6	0,4	191,0	179,0	185	185	100
0,5	0,5	229,0	232,0	230,5	231	99,5
0,4	0,6	289,0	285,0	287	278	103,1
0,3	0,7	323,0	326,0	324,5	325	99,8
0,2	0,8	373,0	345,0	359	372	96,5
0,1	0,9	435,0	441,0	438	419	104,6
0,0	1,0	>500	>500	/	/	/



Slika 22: Prikaz sipanja povprečnih vrednosti od normale vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)



Slika 23: Prikaz sipanja izmerjenih in teoretičnih vrednosti vzorca plazme 2 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Enačba premice in koeficient korelacije (r) za (linearnost razredčitve) za vzorce plazme 2 po seriji

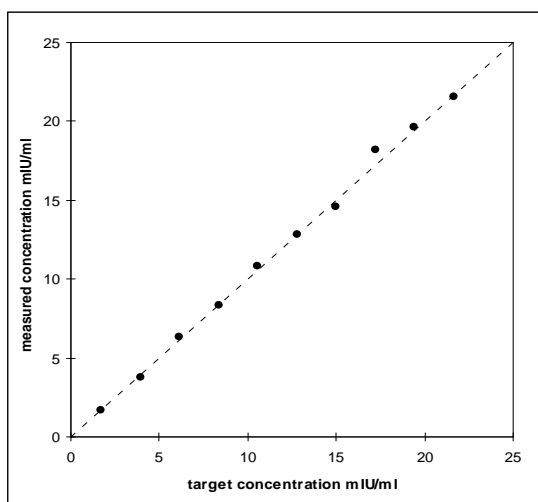
razredčitev z raztopino NaCl

$$y = 467,5 x - 2,0$$

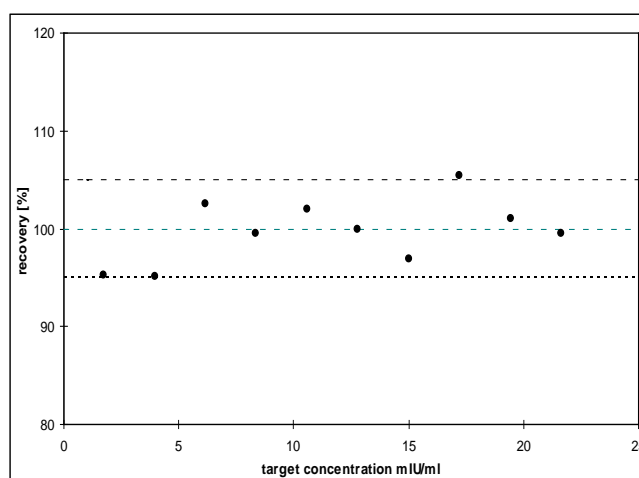
$$r = 0,9975$$

Preglednica XXV: Izmerjene vrednosti β -hCG hepariniziranega vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Stopnja razredčitve		HCG izmerjena vrednost (mIU/ml)			Povprečna vrednost (MEAN)	Teoretična vrednost HCG (mIU/ml)	Recovery (%)
Nizka	Visoka	N1	N2				
1,0	0,0	0,022	0,039	0,0305	/	/	
0,9	0,1	1,59	1,72	1,655	1,74	95,3	
0,8	0,2	3,76	3,75	3,755	3,95	95,1	
0,7	0,3	6,38	6,3	6,32	6,16	102,6	
0,6	0,4	8,36	8,3	8,33	8,38	99,5	
0,5	0,5	10,40	11,2	10,80	10,59	102	
0,4	0,6	12,60	13,0	12,80	12,8	100	
0,3	0,7	14,30	14,8	14,55	15,01	96,9	
0,2	0,8	18,20	18,1	18,15	18,15	105,4	
0,1	0,9	19,50	19,8	19,65	19,65	101,1	
0,0	1,0	21,30	21,8	21,55	21,65	99,5	



Slika 24: Prikaz sipanja izmerjenih in teoretičnih vrednosti vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)



Slika 25: Prikaz sipanja povprečnih vrednosti od normale vzorca plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl (določanje linearnosti razredčitve)

Enačba premice in koeficient korelacije (r) za (linearnost razredčitve) za vzorce plazme 3 po seriji razredčitev z raztopino NaCl

$$y = 22,125 x - 0,475$$

$$r = 0,9986$$

Priporočene referenčne vrednosti proizvajalca

Dokazana linearnost razredčitve v območju koncentracij do 500 mIU/ml.

7.6. Korelacija rezultatov β -hCG med heparinizirano polno krvjo in plazmo

Izmerili smo 100 vzorcev plazme in 100 vzorcev polne krvi ter primerjali, kako se rezultati ujemajo (Preglednica XXVI) in izračunali ustrezne statistične parametre (Preglednica XXVI) ter jih grafično prikazali.

Preglednica XXVI: Izmerjene vrednosti vzorcev heparinizirane plazme in heparinizirane polne krvi za izračun korelacije

Številka vzorca	β-hCG v heparinizirani polni krvi (IU/l)	β-hCG v heparinizirani plazmi (IU/l)
1	281	289
2	301	291
3	224	228
4	140	148
5	171	159
6	363	376
7	146	151
8	310	287
9	482	490
10	115	122
11	238	246
12	438	445
13	204	207
14	115	325
15	294	275
16	347	353
17	400	387
18	281	279
19	453	472

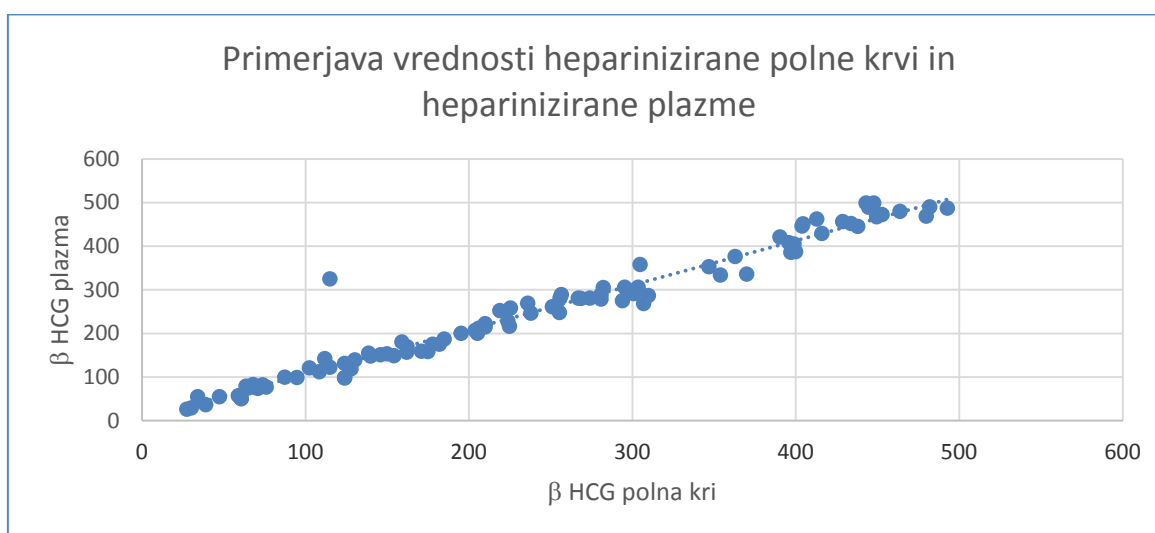
Številka vzorca	β -hCG v heparinizirani polni krvi (IU/l)	β -hCG v heparinizirani plazmi (IU/l)
20	95	99
21	127	123
22	175	158
23	178	175
24	225	216
25	370	336
26	354	334
27	219	252
28	210	222
29	162	157
30	73,9	82
31	69,5	76
32	124	131
33	210	215
34	307	268
35	416	429
36	480	469
37	30,3	29,2
38	59,1	57,1
39	303,6	306
40	112	142
41	295,5	306
42	444,7	489
43	108,6	112
44	63,7	79
45	71	74

Številka vzorca	β -hCG v heparinizirani polni krvi (IU/l)	β -hCG v heparinizirani plazmi (IU/l)
46	138,8	155
47	443,1	499
48	64,9	75
49	404,6	451
50	159,1	180
51	47,5	55
52	256,7	289
53	412,9	462
54	404	446
55	154,3	149
56	76,1	77,1
57	396	408
58	205,3	200
59	185	187
60	434	452
61	397	386
65	124	98,1
66	60,8	50,3
67	195,3	200
68	447,9	499
69	492,8	487
70	27,5	26,3
71	282,3	305
72	39,1	36,6
73	150	153
74	162,3	169

Številka vzorca	β -hCG v heparinizirani polni krvi (IU/l)	β -hCG v heparinizirani plazmi (IU/l)
75	102,5	121
76	428,9	456
77	390,4	421
78	268,7	280
79	251,2	261
81	463,8	480
82	449,6	467
83	34,1	55
84	87,5	99,6
85	182	175
86	206,1	212
87	255,5	248
88	255,8	281
89	304,8	358
90	236,2	269
91	274,1	281
92	130,3	139
93	225,6	258
94	68,1	83
95	128	119
96	60,8	50,3
97	267	281
98	399	405
99	302	299
100	124	98,3

Preglednica XXVII: Izračunani statistični parametri vzorcev heparinizirane plazme in polne krvi za izračun korelacije

Statistični parametri	Metoda X: PATHFAST β -hCG (mIU/ml)	Metoda Y: DPC Immulite β -hCG mIU/ml
VSOTA	22644,200	23559
MIN	27,500	26
MAKS	492,800	499
POVPR. VR.	235,877	245
SD	133,636	139,06
KV (%)	56,7	56,67
Mediana	221,5	237,0
Korelacija	0,980202917	
Pearson	0,980202917	
N (št. mer.)	96	96



Slika 26: Primerjava rezultatov heparinizirane polne krvi in plazme (za izračun korelacije)

Izračunani koeficient korelacije za primerjavo polne krvi in plazme

$r = 0,980$

Koeficient korelacije je merilo linearne povezanosti med dvema spremenljivkama. (37)
(36)

Namen izračuna korelacijskega koeficienta je ugotavljanje morebitne medsebojne povezave med dvema spremenljivkama, ki ni samo naključna ter ugotavljanje stopnje medsebojne povezanosti obeh spremenljivk, če predpostavimo, da med njima zveza obstaja. Koeficient korelacije je relativen glede na izmerjene meritve ali izračunane rezultate, okoliščine in pogoje dela ter uporabljene aparature. Ker je koeficient korelacije odvisen od prej naštetih okoliščin, ga je potrebno v sklopu teh okoliščin tudi interpretirati (preglednica XXVII).

7.7. Primerjava izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ (POCT) in Siemens DCP Immulite (klasični analizator)

Preglednica XXVIII: Primerjava izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ in Siemens DCP Immulite

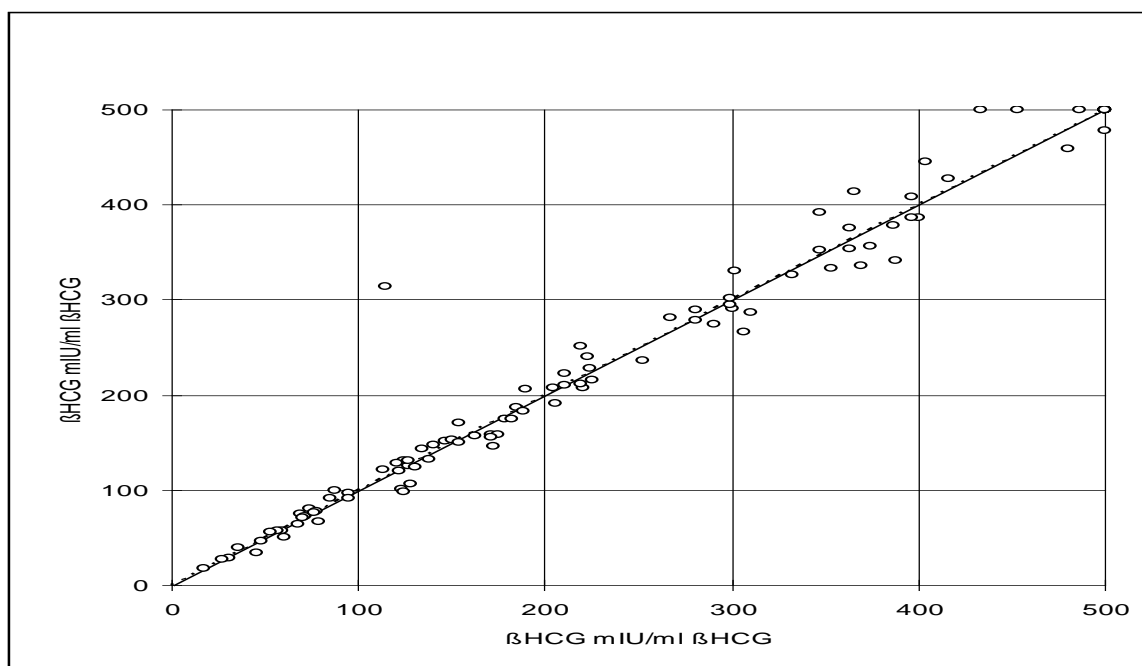
Številka vzorca	PATHFAST HCG (mIU/ml)	PATHFAST redčenje z raztopino NaCl (mIU/ml)	DPC Immulite HCG mIU/ml	Številka vzorca	PATHFAST HCG (mIU/ml)	PATHFAST redčenje z raztopino NaCl (mIU/ml)	DPC Immulite HCG mIU/ml
1	> 500	1242	954	51	13,8		1,56
2	379		348	52	13,9		3,72
3	158		130	53	12,2		6,34
4	324		242	54	> 500	1353	977
5	318		243	55	55,8		44,6
6	142		123	56	43		34,3
7	> 500	780	637	57	> 500	597	492
8	218		193	58	17,4		8,19

Številka vzorca	PATHFAST HCG (mIU/ml)	PATHFAST redčenje z raztopino NaCl (mIU/ml)	DPC Immulite HCG mIU/ml	Številka vzorca	PATHFAST HCG (mIU/ml)	PATHFAST redčenje z raztopino NaCl (mIU/ml)	DPC Immulite HCG mIU/ml
9	118		108	59	15,8		5,85
10	> 500	687	604	60	292		245
11	> 500	858	618	61	11		2,52
12	385		318	62	176		154
13	212		170	63	334		272
14	211		167	64	> 500	831	669
15	317		263	65	16,5		6,75
16	309		260	66	5,8		1,75
17	8,92		1,45	67	154		134
18	145		124	68	17,9		10
19	> 500	717	530	69	> 500	657	550
20	340		269	70	29,7		22,6
21	370		276	71	> 500	1269	913
22	299		243	72	> 500	1053	815
23	19,3		7,75	73	> 500	759	638
24	> 500	1293	1124	74	6,11		< 1
25	64,8		53,7	75	> 500	858	722
26	151		117	76	154		141
27	> 500	1095	821	77	> 500	804	714
28	26,6		19,3	78	27,9		24,1
29	25,7		19,3	79	10,2		1,54
30	410		320	80	64,8		29,9
31	> 500	543	448	81	25,7		25,8

Številka vzorca	PATHFAST HCG (mIU/ml)	PATHFAST redčenje z raztopino NaCl (mIU/ml)	DPC Immulite HCG mIU/ml	Številka vzorca	PATHFAST HCG (mIU/ml)	PATHFAST redčenje z raztopino NaCl (mIU/ml)	DPC Immulite HCG mIU/ml
32	15		6,88	82	52,2		42,5
33	78,4		62,1	83	14,2		8,01
34	9,94		4,94	84	11,9		4,93
35	53,1		40,6	85	13,6		6,36
36	44,9		43,1	86	12,5		3,76
37	438		336	87	59,5		36,4
38	41,9		41,6	88	97,5		62,5
39	> 500	1422	952	89	25,1		19,4
40	166		139	90	14,3		4,22
41	> 500	945	662	91	> 500	753	643
42	58,4		51,9	92	461		399
43	> 500	825	737	93	205		178
44	11,5		3,07	94	458		436
45	> 500	1164	972	95	126		100
46	250		209	96	358		316
47	21		7,25	97	25,7		18,1
48	> 500	843	6,88	98	49,7		17,3
49	410		347	99	8,75		5,15
50	83,4		51,6	100	37,8		25,8

Preglednica XXIX: Rezultati primerjave izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ in Siemens DCP Immulite

Statistični parametri	Metoda X: PATHFAST HCG (mIU/ml)	Metoda Y: DPC Immulite HCG mIU/ml
MIN	5,80	1,00
MAKS	1422	1124
POVPR. VR.	315,1	244,2
MEDIANA	152,5	123,5
OBMOČJE	48,4	50,57
N (št. mer.)	100	100



Slika 27: Prikaz izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ in Siemens DCP Immulite

Rezultati primerjave izmerjenih vrednosti β -hCG med aparatoma PATHFAST™ in Siemens DCP Immulite za izračuna enačbe regresijske premice in koeficienta korelacije (r)

$$y = 0,836 x - 4,079$$

$$r = 0,969$$