

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TOMAŽ BAU

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program laboratorijske biomedicine

Ljubljana, oktober 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ BAU

**PRIMERJAVA REZULTATOV NT-proBNP V POLNI
KRVI IN SERUMU Z UPORABO DVEH
KEMILUMINISCENČNIH METOD**

**COMPARISON OF NT-proBNP IN WHOLE BLOOD
AND SERUM USING TWO CHEMILUMINESCENT
METHODS**

Ljubljana, oktober 2009

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za koristne napotke in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se g. Marjanu Hodniku in g. Matjažu Centu za njun prispevek k tej diplomski nalogi.

Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Janji Marc in doc. dr. Iztoku Grabnarju za njune koristne pripombe po pregledu diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Podpis:

Ljubljana, oktober 2009

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Janja Marc

Član diplomske komisije: doc. dr. Iztok Grabnar

1. VSEBINA

1. VSEBINA	4
2. UVOD	8
2.1. SRČNO ŽILNE BOLEZNI	8
2.1.1. <i>Srce</i>	9
2.1.2. <i>Tipi srčno-žilnih obolenj</i>	12
2.1.3. <i>Diagnostika srčnih bolezni</i>	16
2.2. SRČNO POPUŠČANJE.....	17
2.2.1. <i>Klasifikacija srčnega popuščanja</i>	19
2.2.2. <i>Razlogi za srčno popuščanje</i>	20
2.2.3. <i>Diagnoza srčnega popuščanja</i>	21
2.2.4. <i>Zdravljenje</i>	23
2.3. LABORATORIJSKI TESTI OB PREISKOVANCU (POCT – POINT OF CARE TESTING)	24
2.3.1. <i>Definicija</i>	24
2.3.2. <i>Zgodovinski pregled</i>	24
2.3.3. <i>Prednosti</i>	25
2.3.4. <i>Slabosti</i>	26
2.3.5. <i>Vrste POC – testiranja</i>	27
2.3.6. <i>Možnosti POC testiranj:</i>	28
2.4. MOŽGANSKI NATRIURETIČNI PEPTID (BNP).....	29
2.4.1. <i>Dednost in genske povezave med stopnjami plazemskih natriuretičnih peptidov</i>	31
2.4.2. <i>Razlike med BNP in ProBNP:</i>	32
3. NAMEN DELA	33
4. MATERIALI IN METODE.....	34
4.1. KLASIČNA METODA ZA DOLOČANJE NT-PROBNP	34
4.1.1. <i>Princip testa</i>	34
4.1.2. <i>Postopek testa</i>	35
4.1.3. <i>Lastnosti testa</i>	35
4.2. POC TESTIRANJE ZA DOLOČANJE NT-PROBNP	36
4.2.1. <i>Princip Testa</i>	36
4.2.2. <i>Postopek analize</i>	36
4.2.3. <i>Tehnične specifikacije</i>	37
4.3. STATISTIČNE METODE.....	39
5. REZULTATI.....	40
5.1. ZBIRANJE PODATKOV.....	40
5.2. STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	40
5.2.1. <i>Korelacija in regresija</i>	40
5.2.2. <i>Studentov parni t-test</i>	42
5.2.3. <i>Občutljivost in specifičnost POCT metode</i>	42
5.2.4. <i>Čas do izdaje rezultatov pri klasični metodi</i>	44
6. RAZPRAVA.....	45
7. SKLEPI	47
8. PRILOGA.....	48
9. LITERATURA.....	51

POVZETEK

Neprestano napredovanje v tehnologiji omogoča razvijanje novih metod in naprav, ki so hitrejše in enostavnejše za uporabo. V tej diplomski nalogi smo primerjali dve kemiluminiscenčni imunološki metodi za določanje peptida NT-proBNP, ki se razlikujeta v zahtevnosti uporabe analizatorja. Metodi smo primerjali, da bi ugotovili ali lahko POCT metoda zamenja klasično laboratorijsko testiranje. Za predstavnika klasične laboratorijske metode smo izbrali metodo ECLIA. Za predstavnika tako imenovanih laboratorijskih testov ob preiskovancu, znanih pod angleško kratico POCT (point of care testing), pa smo izbrali metodo CLEIA.

NT-proBNP se sprošča iz levega preddvora ob povečanem tlaku v levem preddvoru. Meritve tega peptida se uporablajo pri diagnozi in oceni napredovanja kroničnega srčnega popuščanja in pripomorejo k diagnozi akutnega koronarnega sindroma. Meritve NT-proBNP se lahko uporablajo tudi pri oceni zvečanja tveganja za kardiovaskularne bolezni in lahko napovejo umrljivost pri pacientih s stabilnim obolenjem koronarnih arterij.

V primerjavo je bilo vključenih 73 preiskovancev starih od 4 do 99 let. Od tega jih je bilo 31 ženskega spola 42 pa moškega spola.

Za ugotovitev povezanosti rezultatov obeh metod smo uporabili linearno regresijo. S Pearsonovim korelacijskim koeficientom smo ugotovili visoko stopnjo ujemanja rezultatov. Iz naklona regresijske premice je razvidno, da daje metoda CLEIA višje vrednosti kot ECLIA, kar smo potrdili s parnim Studentovim t-testom. Določili smo tudi občutljivost in specifičnost POCT metode v primerjavi s klasično metodo. Specifičnost POCT metode v primerjavi s klasično metodo je zelo dobra, občutljivost je slabša.

Zaradi visoke specifičnosti (95%) POCT metode v primerjavi s klasično metodo, bi POCT metoda lahko nadomestila klasično laboratorijsko testiranje. Toda pri diagnozi srčnega popuščanja moramo vrednosti NT-proBNP vedno vrednotiti v kontekstu kliničnih okoliščin in diagnozo potrditi z ultrazvokom srca, ki velja za zlati standard pri diagnozi srčnega popuščanja.

ABSTRACT

Continuous advancement in technology allows the development of new methods and devices that are faster and easier to use. We have compared two chemiluminescent immunological methods for the determination of peptide NT-proBNP, which differ in complexity of the analyzer. We compared the method to determine whether the POCT method can replace conventional laboratory testing. For a representative of classical laboratory methods were chosen method ECLIA. For representative of so-called point of care testing (POCT), we have chosen method CLEIA.

NT-proBNP is released from the left ventricle if the pressure in the left ventricle is elevated. Measurements of peptide are used in the diagnosis and evaluation of progression of chronic heart failure and contribute to the diagnosis of acute coronary syndrome. Measurements of NT-proBNP can also be used in assessing the risk for cardiovascular disease and may predict mortality in patients with stable coronary artery disease.

In our comparison we included 73 subjects, aged 4 to 99 years. 31 of these were female and 42 male.

In order to determine connection between methods, we used linear regression. With Pearson correlation coefficient, we found a high degree of correlation between results. Slope of the regression line has shown that CLEIA method gives higher values than ECLIA. We confirmed this with a paired Student t-test. We determined the sensitivity and specificity of POCT methods compared to a conventional method. The specificity of the POCT method was very good; the sensitivity was not so bad.

Because of the high specificity (95%) of POCT method, compared to a conventional method, the POCT method could replace conventional laboratory testing. But in the diagnosis of heart failure NT-proBNP levels should always be assessed in the context of clinical circumstances and diagnosis should be confirmed with heart ultrasound, which is a golden standard in the diagnosis of heart failure.

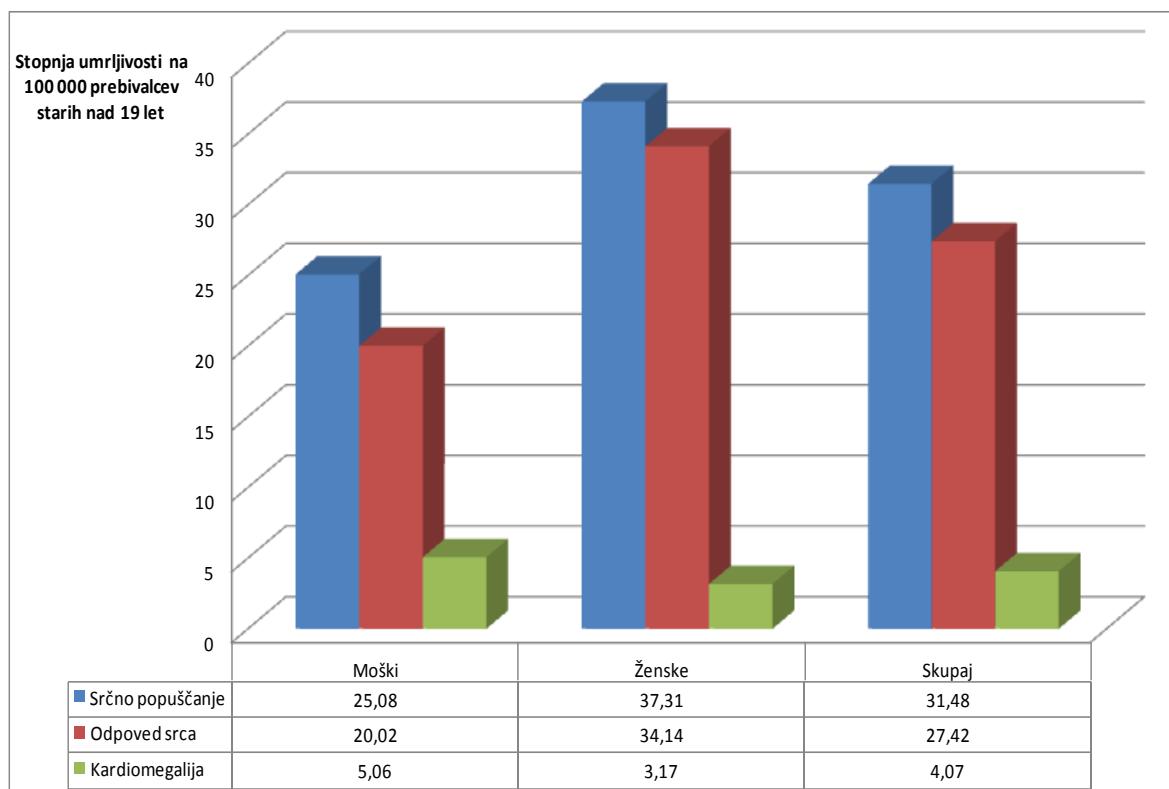
SEZNAM OKRAJŠAV

ACC / AHA: American College of Cardiology / American Heart Association
AK: amino kislina
ALP: alkalna fosfataza
AMI: akutni miokardni infarkt
ANP: atrijski natriuretični peptid
BNP: možganski natriuretični peptid
BSA: goveji serumski albumin
CLEIA: kemiluminiscenčna encimska imunološka metoda
CNP: C-tip natriuretični peptid
CRP: C-reaktivni protein
CT: računalniška tomografija
CV: Koeficient variacije
DV: desni ventrikel
ECLIA: elektro-kemiluminiscenčna imunološka metoda
EDTA: etilen diamin tetraocetna kislina
EKG: elektrokardiogram
ET (1,2,3) : endotelin (1,2,3)
LV: levi ventrikel
MOPS: 3-morfolinpropansulfonska kislina
MRA: magnetno resonančna angiografija
MRI: magnetna resonanca
NP: natriuretični peptid
NT-proBNP: N-končni možganski natriuretični peptid
NYHA: New York Heart Association
P: plazma
POCT (POC): point of care testing – laboratorijski testi ob preiskovancu
Pt: protitelo
S: serum
TEE: transezofagealni ehokardiogram
TNF: tumor nekrotizirajoči faktor
TPA: tri-propilamin

2. UVOD

2.1. Srčno žilne bolezni

Srčna kap in srčno-žilne bolezni so vzrok za največ smrti na svetu. Vsako leto na svetu zaradi njih umre 17,5 milijona ljudi, od tega v Evropi več kot 1,9 milijona. To predstavlja več kot polovico vseh smrti. V Sloveniji zaradi bolezni srca in ožilja po ocenah zboli povprečno 20.000 ljudi na leto, umre pa jih okoli 9000 (glej sliko 1). Tako bolezni srca in ožilja povzročijo skoraj 40 odstotkov vseh smrti v Sloveniji, kar je več kot jih umre zaradi vseh rakavih bolezni skupaj [1].

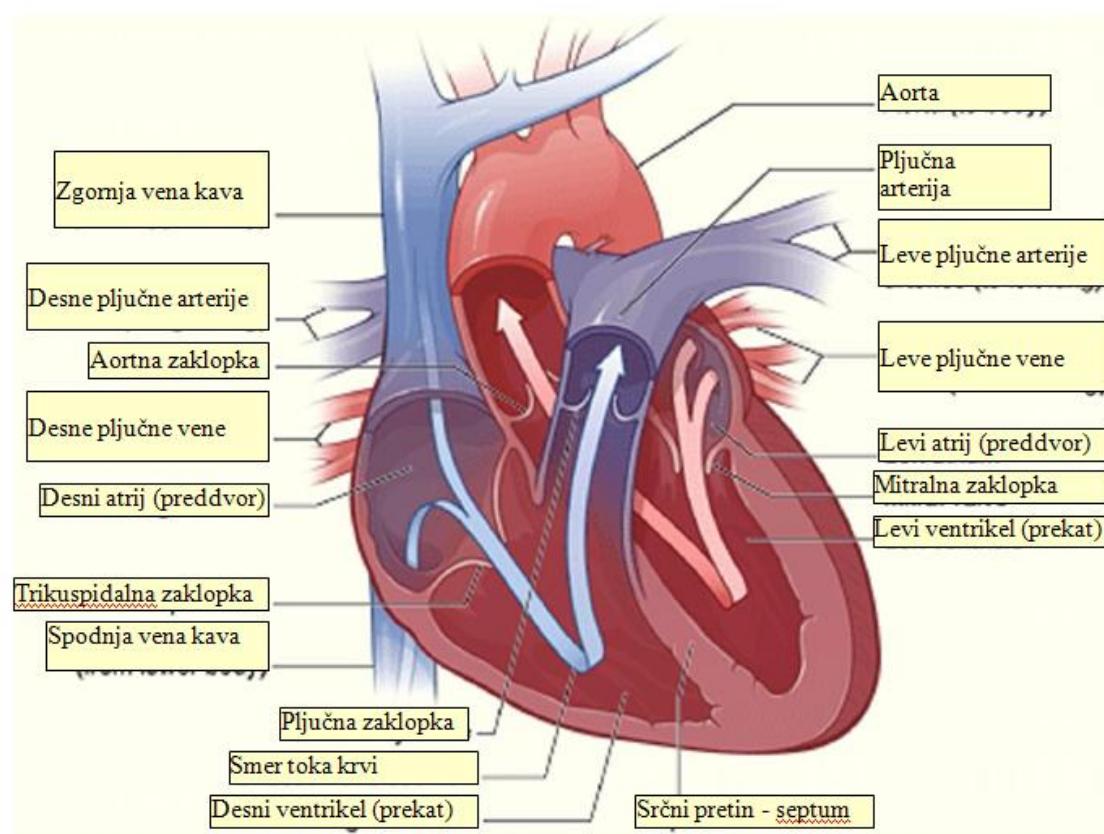


Slika 1– Srčno popuščanje, stopnje umrljivosti na 100 000 prebivalcev starih nad 19 let na leto po spolu, Slovenija 1997 – 2003 [2]

2.1.1. Srce

Srce leži v prsnici v votlini na trebušni preponi za prsnico v prostoru med levim in desnim pljučnim krilom. Oblika srca spominja na stožec, ki ima konico obrnjeno levo navzdol.

Srce je po zgradbi votel mišični organ. Srčne votline pokriva znotraj obloga, imenovana endokardij. Endokardij sestavlja plast izredno nizkih ploščatih krovnih celic (endotelij), pod njo pa je nežna plast veziva. Srčna mišica (miokardij) je mikroskopsko podobna skeletni mišici. Po delovanju pa je bolj podobna gladkemu mišičju, saj se srce krči povsem neodvisno od volje.



Slika 2 – Vzdolžni prerez srca

Z zunanje strani ovija srčno mišico serozna mrena, imenovana osrčnik (pericardium).

Osrčnik je pravzaprav dvojna vreča serozne mrene. Zunanji del mrene (stenski osrčnik) se prilega prsnici mreni obojih pljuč, spodaj pa je zrasel s trebušno prepono. Ojačuje ga še močna plast veziva. Notranji del mrene pa je zrasel s srčno mišico. V prostoru med stenskim in drobovnim osrčnikom je nekoliko serozne tekočine.

Celotno votlino v srcu deli mišičnat srčni pretin v levo in desno polovico. V vsaki polovici srca je po ena zaklopka, ki je pravzaprav loputasta guba endokardija s čvrstejšo vezivno osnovo. Zaklopka v levem srcu (mitralna zaklopka) je iz dveh, zaklopka v desnem srcu (trikuspidalna zaklopka) pa iz treh loput.

Nad vsako loputasto zaklopko je srčni preddvor (atrij), pod zaklopko pa srčni prekat.

Prosti rob loputaste zaklopke je pripet s tankimi nitastimi vezmi ob steno prekata na valjastih mišicah miokardijs; te zagotavljajo tesnost loputastih zaklopk med stiskanjem prekatov, da se kri ne vrača v preddvora.

Dovod oksigenirane krvi v srce se vrši preko koronarnih arterij. Izhajajo iz levega prekata in preskrbujejo celotno srce.

Votline v srcu in srčne zaklopke

V desni preddvor priteka kri iz vseh delov telesa: po spodnji veliki veni priteka iz spodnjih udov in trebuha, po zgornji veliki veni pa iz zgornjih udov, prsnega koša, iz vratu in glave. Iz desnega prekata odteka kri v pljuča po pljučni arteriji. Iz pljuč se kri vrača v srce, in sicer v levi preddvor. Iz levega prekata izhaja največja žila, glavna odvodnica ali aorta, ki vodi kri iz srca v vse telesne dele.

Srčnim zaklopkam daje oporo srčni skelet. To je čvrsto vezivno ogrodje, ki obročasto obdaja vse srčne zaklopke. Na srčnem skeletu je priraščen tudi miokardij. Mišična vlakna so usmerjena od srčnega skeleta spiralasto proti srčni konici. Podobno pa potekajo tudi navzgor v steni obeh preddvorov.

Srčne zaklopke usmerjajo kri na njeni poti skozi srce. Če so zaklopke okvarjene in slabo tesnijo, se kri delno vrača tja, od koder je pravkar pritekla. Ali iz prekata v preddvor ali iz odvodnice v prekat. Če pa se zaklopke nezadostno odpirajo, ustrezni predel srca ne more sproti iztiskati vse krvi, ki priteče skozi utesnjeno ustje. V obeh primerih kri zastaja pred nepravilno delujočo zaklopko. Ustrezni srčni predel se polagoma širi in srčna mišica začne omagovati, v cirkulaciji pa se pojavljajo čedalje hujše motnje.

Srčno prevajalo

Za delovanje srca je velikega pomena svojevrstno celičje v srcu, potekajoče tik pod endokardijem. Celice so po zgradbi podobne drugim mišičnim celicam v srcu, imajo pa

svojevrstno funkcijo: prevajajo namreč vzburjenja iz dveh centrov v samem srcu do celic miokardija. Prvi snop celic poteka od atrialnega centra, ki je v bližini ustja velikih ven, k mišičju obeh preddvorov. Drugi snop celic pa vodi iz atrioventrikularnega vozla, ki je v srčnem pretinu ob dnu desnega preddvora, k mišičju prekatov. Celotno snopje prevodnih celic v srcu se imenuje srčno prevajalo.

V sinusnem vozlu vznikajo pobude za krčenje srčne mišice, obenem pa sinusni vozel določa ritem srčnega utripanja. Srčna mišica prejema pobude od lastnega prevajala, poleg lega pa tudi iz osrednjega vegetativnega živčevja.

Vegetativno živčevje s pobudami v glavnem nadzira srčno akcijo tako, da jo nepretrgano prilagaja trenutnim razmeram. Za osnovna delovanje srca oz. ritmiko srčne akcije pa je odgovoren srčni avtomatizem. Pobude za skrčenje srčne mišice vznikajo, v srcu samem (sinusni vozel). Pri tem pa je v primerni količini in v določenem razmerju potrebna prisotnost kalija, kalcija in natrija.

Srčni utrip

Pri vsakem srčnem utripu kri iz obeh velikih ven napolni desni preddvor, kri iz pljuč pa po pljučnih venah levi preddvor. S krvjo napolnjena preddvora se skrčita, kar se imenuje stisljaj ali sistola preddvorov. Preddvora ob stisljaju izpraznita kri v prekate. Takoj sledi raztezljaj ali diastola preddvorov. Med tem sistola prekatov požene kri v arterije: desni prekat v pljučno arterijo, levi prekat pa v aorto. Že v začetku stisljaja prekatov se jadrasti zaklopki (mitralna in trikuspidalna) tesno zapreta, da se kri ne bi vračala v preddvore.

Stisljaju prekatov nemudoma sledi raztezljaj (diastola) prekatov.

Med silnim pritiskom krvi v odvodnice se ob stisljaju prekatov stena obeh odvodnic razširi, ker je prožna. Posebno velja to za začetni del aorte, ki je med vsemi žilami najprožnejši. Takoj ko stisljaj prekatov preide v raztezljaj, splahni potisna sila srca. Razširjeni začetni del odvodnice pritisne z vso silo kri v arterije pa tudi nazaj proti prekatom. Kri pri tem zalije žepkaste zaklopke, in te se tesno zapro.

Raztegnjeno srce nekaj trenutkov miruje in počiva; to je srčni odmor. Ta čas se srce ponovno polni s krvjo. Ko sta preddvora ponovno napolnjena, se opisano delo ponovi.

Stisljaj preddvorov traja približno 0,15 sekunde, stisljaj prekatov pa okrog 0,3 sekunde. Srčni odmor traja pri odraslem in mirujočem človeku nekako 0,4 sekunde. Od začetka enega do začetka naslednjega srčnega utripa mine približno 0,8 do 0,85 sekunde. Število srčnih utripov v minuti znaša torej povprečno 70. Številni notranji in zunanji dejavniki pa lahko hitro pospešijo ali zavrejo utripanje srca.

Prekata iztisneta pri vsakem stisljaju približno po 60 ml krvi v odvodnici, to je utripni volumen. Vsak prekat iztisne v minuti okrog 4 do 5 litrov krvi, kar je minutni volumen. Količina je odvisna od frekvence utripanja in od utripnega volumena ter se pri delu lahko občutno poveča. Pri težkem delu lahko znaša tudi 20 do 30 litrov krvi na minuto.

Uravnavanje srčne akcije

Središče za uravnavanje srčne akcije (kardialni center) je v hrbtenjači. Simpatično živčno nitje poteka iz kardialnega centra v podaljšani hrbtenjači navzdol v hrbtenjačo do nižjih centrov. S spinalnimi simpatičnimi živci pridejo ta vlakna do srca.

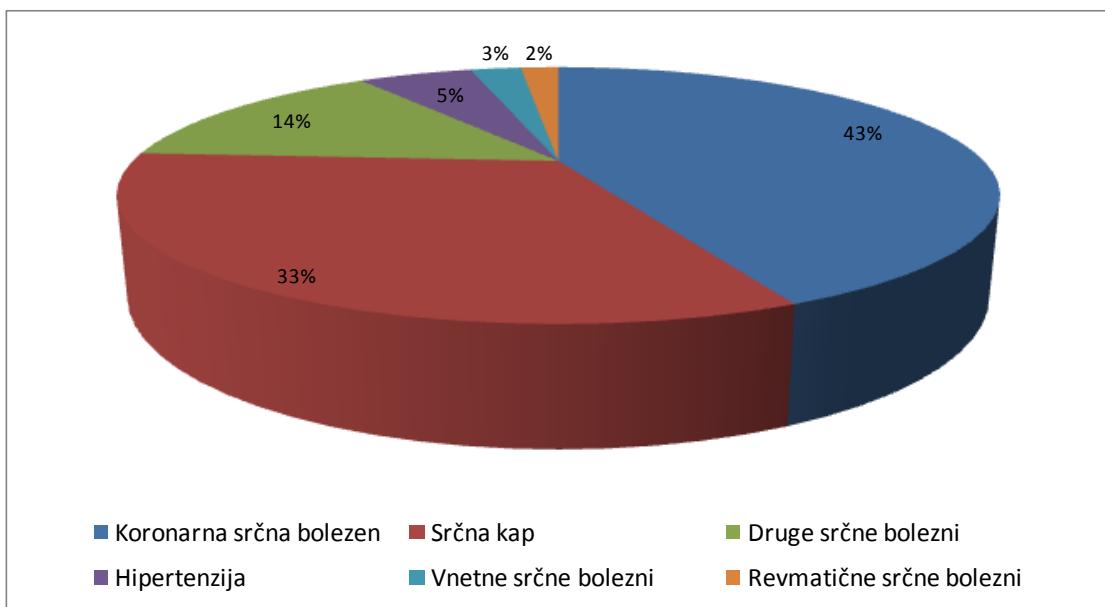
Simpatikus pospeši srčno akcijo, medtem ko jo parasimpatikus zavira. Simpatikus in parasimpatikus vplivata na: frekvenco, potisno silo srčne mišice, prevodnost srčnega prevajala in na vzdražnost sinusnega vozla [3].

2.1.2. Tipi srčno-žilnih obolenj

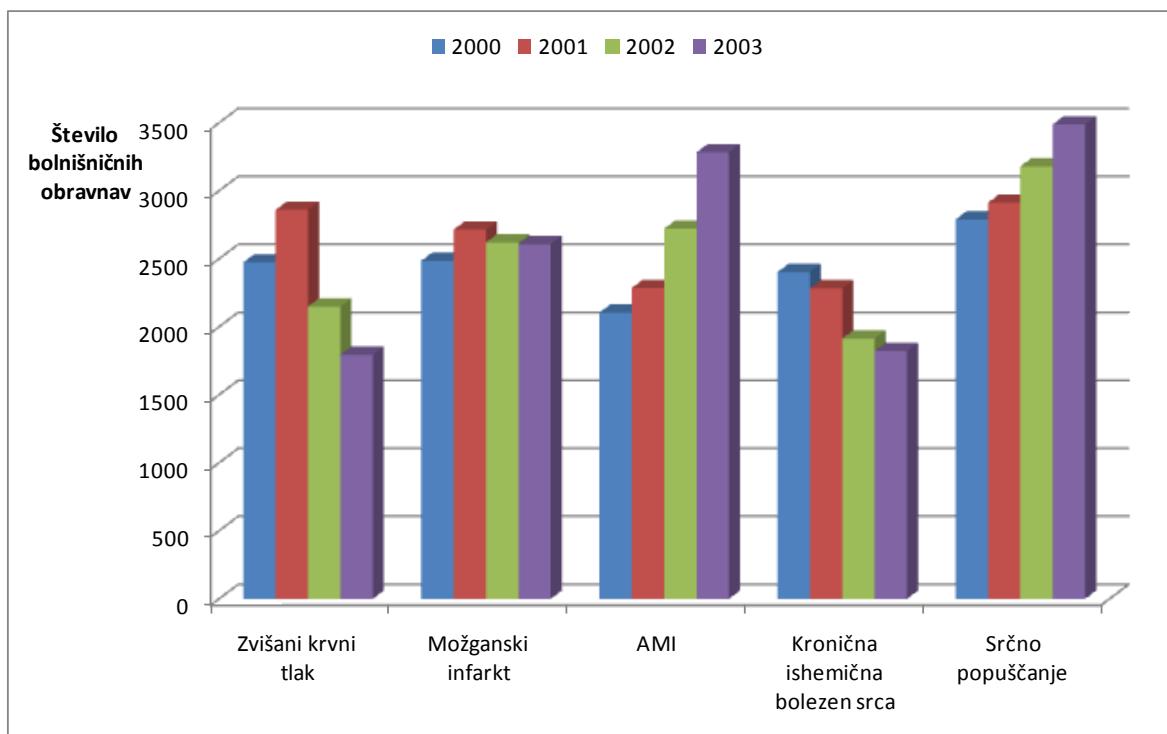
Razvrščeni glede na umrljivost, globalno gledano (glej sliko 3):

- Koronarna srčna bolezen
- Srčna kap
- Druge srčne bolezni (tumorji, okvare zaklopki...)
- Hipertenzija
- Vnetne srčne bolezni
- Revmatične srčne bolezni [4]

V Sloveniji je med srčno-žilnimi obolenji najpogosteje srčno popuščanje sledijo mu akutni infarkt srčne mišice, možganski infarkt, zvišan krvni tlak in kronična ishemična bolezen srca (glej sliko 4).



Slika 3 – umrljivost globalno, zaradi srčno žilnih bolezni



Slika 4 - število bolnišničnih obravnav zaradi zvišanega krvnega tlaka, možganskega infarkta, AMI, kronične ishemične bolezni in srčnega popuščanja v letih 2000 – 2003 v Sloveniji [2]

Bolezni in različna stanja srčne mišice onemogočajo normalno črpanje krvi. Poškodovane ali obolele žile povzročajo, da mora srce delati močneje, kot normalno. Neredni srčni ritem (aritmija), lahko povzroči neučinkovito črpanje krvi [5].

Koronarna ali ishemična srčna bolezen

Obolenje je posledica ateroskleroze koronarnih arterij. Pri tej bolezni se koronarne žile zožijo zaradi maščobnih oblog oziroma ateromov. Bolnik sprva pogosto sploh ne občuti težav, ko pa preskrba s krvjo v srcu ni več zadostna, občuti anginozne bolečine. Če koronarne bolezni ne zdravimo, se arterije vse bolj mašijo, možnost srčnega napada pa je vse večja. Koronarna srčna bolezen se lahko kaže kot angina pektoris, srčni infarkt, nenadna srčna smrt in srčno popuščanje.

Angina pektoris

Angina pektoris sama po sebi ni bolezen, marveč je le simptom osnovnega obolenja, najpogosteje koronarne srčne bolezni. Bolnik z angino pektoris občuti stiskajočo bolečino, ki se začne pod prsnico in pogosto izžareva v eno ali obe roki ter proti vratu, pojavlja pa se po telesnem naporu ali čustvenem stresu. Bolečina je prehodna in mine kmalu po tem, ko je konec napora ali stresa.

Srčni infarkt

Pri srčnem infarktu gre za okvaro dela srčne mišice ali miokarda. Do njega pride zaradi nenadnega pomanjkanja krvi, do katerega pride, ker se zamaši ena od koronarnih žil. Prizadeto območje srca neha pravilno delovati, zato je infarkt smrtno nevaren. Do srčnega napada lahko pride kadarkoli: lahko se pojavi povsem nenapovedano, ali pa se prizadeti človek že nekaj ur ali dni prej počuti zelo slabo. Do napada pogosto pride, ko je človek pod hudim čustvenim pritiskom.

Okvare srčnih zaklopk (valvularne srčne hibe)

Bolezni srčnih zaklopk so dandanes redkejše kot v preteklosti. Včasih je bil glavni vzrok revmatična vročica, ki pa je zdaj zelo redka; k temu so pripomogle boljše socialne razmere in antibiotično zdravljenje angine. Sedaj so predvsem posledica degenerativnih procesov in se pokažejo šele v starosti. Če jih ne odkrijemo pravočasno in odpravimo z operacijo, pripeljejo do srčnega popuščanja.

Bolezni srčne mišice (kardiomiopatije)

Kardiomiopatij je več vrst. Poleg koronarne srčne bolezni in arterijske hipertenzije jo povzročajo še številni drugi dejavniki: vnetja srčne mišice, presnovne motnje, vnetni procesi v srčni mišici, zelo pomembno vlogo imajo tudi dedni dejavniki. Vsi ti dejavniki vodijo do motenega delovanja srca bodisi tako, da je oslabljeno črpalno delovanje srca, bodisi tako, da je oviran vtok krvi v srce. Posledica je srčno popuščanje.

Motnje ritma - aritmije

Motnje v nastajanju in prevajjanju srčnih impulzov vodijo do srčnih aritmij. Srčne aritmije se kažejo s prepočasnim, prehitrim ali z neenakomernim srčnim ritmom. Natančno jih predelimo s snemanjem elektrokardiograma (EKG). Lahko gre le za manjše nepravilnosti, lahko pa je stanje bolj resno, na primer pri ventrikularni tahikardiji (hitrem utripanju prekatov) ali pri življenjsko ogrožajoči fibrilaciji, pri kateri prekata trzata neuskajeno.

Kronično srčno popuščanje ali srčna insuficienca

Pri kroničnem srčnem popuščanju bolnik ni neposredno življenjsko ogrožen, vendar srce ne zmore več normalno iztiskati krvi, zato ni dovolj učinkovito. Kronično srčno popuščanje je posledica različnih bolezni srca; najpogostejsa vzroka sta preboleli srčni infarkt in povišan krvni tlak. Veliko redkejši vzroki so okvare srčne mišice iz drugih razlogov in okvare srčnih zaklopk. Znaki srčnega popuščanja so majhna zmogljivost za telesne napore, težko dihanje, sprva med telesnimi naporji, nato tudi v mirovanju in otekline nog. Vzrok je zadrževanje vode v telesu. Več je v pljučih, kar povzroči težko dihanje, pa tudi drugod po telesu, kar se kaže v obliki oteklin nog, lahko pa tudi v obliki povečanih bolečih jeter in otekanja v trebuhi. Neposredni povod za srčno popuščanje pri kroničnem srčnem bolniku je neustrezen življenjski slog: pretirano uživanje soli, pitje alkohola in prekomerne telesne obremenitve, med boleznimi pa infekcije, motnje srčnega ritma, pljučne trombo-embolije in akutna slaba prekrvljenost (ishemija) srčne mišice.

2.1.3. Diagnostika srčnih bolezni

Danes je na voljo veliko diagnostičnih metod za odkrivanje srčnih bolezni. Metode ločimo na ne invazivne in invazivne diagnostične metode.

Ne invazivne diagnostične metode:

- elektrokardiogram (EKG),
- ambulantni EKG (dinamična elektrokardiografija, večurno spremljanje EKG – Holter),
- rentgensko slikanje prsnega koša,
- ehokardiografija,
- računalniška tomografija (CT),
- magnetna resonanca (MRI),
- magnetno resonančna angiografija (MRA),
- radioizotopska ventrikulografija,
- perfuzijska scintigrafija miokarda,
- laboratorijske preiskave.

Invazivne diagnostične metode:

- transezofagealni ehokardiogram (TEE),
- kateterizacija srca,
- rentgenska kontrastna ventrikulografija,
- koronarna angiografija,
- odvzem krvi, za laboratorijske preiskave [6]

2.2.Srčno popuščanje

Srčno popuščanje je stanje, pri katerem pride do napake v strukturi ali funkciji srca. Kar se odraža v nezmožnosti srca črpanja krvi, da bi zadostil telesne potrebe [7].

Kardiovaskularni sistem in ledvica odigrajo ključno vlogo pri zagotavljanju biokemijske homeostaze zunajcelične tekočine. Ne samo, da se odzivajo na veliko različnih hormonov (večina njih je zadolžena za vzdrževanje krvnega dotoka v tkiva in organe), so tudi sami po sebi endokrini organi. Ti hormoni vplivajo na uravnavanje krvnega tlaka in koncentracij serumskih elektrolitov preko zapletenih interakcij (glej tabelo 1).

Tabela 1 – hormoni, ki uravnavajo krvni tlak

Proizvedeni v			
kardiovaskularnem sistemu		ledvicah	
Hormon	Funkcija	Hormon	Funkcija
Atrijski natriuretični peptid (ANP)	↑ stopnja filtracije / ↓ reabsorpcija Na^+	Renin	↑ sistem angiotenzin-aldosteron
Endotelini (ET-1, ET-2, ET-3)	Vazokonstrikcija / ↑ NO	Prostaglandini	↓ reabsorpcija Na^+
Dušikov oksid (NO)	Vazodilatacija	Eritropoetin	↑ produkcija eritrocitov
		1,25 (OH)2 vitamin D	Homeostaza kalcija
		prekalikrein	↑ produkcija kinina
Vplivajo na			
kardiovaskularni sistem		ledvica	
Hormon	Funkcija	Hormon	Funkcija
Angiotenzin II	Vazokonstrikcija	Aldosteron	↑ Reabsorpcija Na^+
Arginin Vazopresin	Vazokonstrikcija	Arginin Vazopresin	Zadrževanje vode

Kateholamini	Vazokonstrikcija/dilatacija v skeletni muskulaturi	Kateholamini	Različno
Bradikinin / dušikov oksid	vazodilatacija	1,25 (OH)2 vitamin D	↑Reabsorpcij Ca ²⁺
Tromboksani	vazokonstrikcija		

Srčno popuščanje ločimo na sistolično ali diastolično. Sistolična disfunkcija je posledica slabe kontrakcije (krčenja) levega ventrikla, navadno izražena kot iztisnjena frakcija. Diastolično srčno popuščanje (pogosteje pri starejših), iztisnjena frakcija levega ventrikla je normalna. Do defekta naj bi prišlo pri sprostitvi levega ventrikla in je povezan z zapoznanim polnjenjem.

Disfunkcija LV se kaže kot povečan pritisk v levem atriju, zato se začne iz atrija sproščati atrijski natriuretični peptid (ANP). Ta peptid, sestavljen iz 28 aminokislin, poveča glomerularno filtracijo, zmanjša reabsorpcijo Na⁺ in inhibira ledvični sistem renin-angiotenzin-aldosteron. Možganski natriuretični peptid (BNP), spada v isto družino peptidov kot ANP in je sestavljen iz 32 aminokislin. Sinteza BNP-ja poteka tako v možganih kot v ventriklih. V krvni obtok se sprošča, kot odgovor na popuščanje ventriklov. Deluje enako kot ANP in na iste receptorje.

Krvne koncentracije BNP se uporabljajo za diagnozo srčnega popuščanja (vzrok zadihanosti). Pri kliničnih študijah, imajo meritve BNP zmožnost detekcije srčnega popuščanja z občutljivostjo skoraj 100% in specifičnostjo 85%

Poleg aktivacije ledvičnega sistema renin-angiotenzin-aldosteron in nasproti deluječa peptida ANP/BNP, zmanjšan iztis krvi iz srca pri srčnem popuščanju aktivira tudi številne lokalne hormone vključene v nadzor vazokonstrikcije. Ti hormoni so: endotelini – zelo potentni hormoni, ki primarno delujejo preko parakrinega sistema, da zvečajo vazokonstričnsko napetost. Pri srčnem popuščanju lahko zaznamo visoke koncentracije in so pokazatelj slabe prognoze. [8] [9]

2.2.1. Klasifikacija srčnega popuščanja

Možnih je več načinov:

- stran srca udeležena (popuščanje leve ali desne strani srca)
- ali je stanje posledica krčenja ali relaksacije (sistolična disfunkcija ali diastolična disfunkcija)
- ali je problem primarno v povečanem venoznem povratnem toku (tlaku) ali nezmožnosti zagotovitve zadostnega arterijskega pretoka srca
- ali je popuščanje posledica nizkega srčnega iztisa z visoko žilno odpornostjo ali velik srčni iztis z nizko žilno odpornostjo

Funkcijska klasifikacija po New York Heart Association (NYHA)

Tabela 2 – funkcijska NYHA klasifikacija srčnega popuščanja

Razred	klasifikacija
I	Ni omejitve pri aktivnostih, ni simptomov pri običajnih aktivnostih.
II	Rahla omejenost pri aktivnostih, osebi je pri počitku udobno toda pri običajnih fizičnih naporih pride do utrujenosti, hitrega – nerednega utripa srca in zadihanosti.
III	Opazna omejenost pri aktivnostih, osebi je pri počitku udobno, toda že običajni naporji sprožijo simptome.
IV	Kakršna koli fizična aktivnost privede do neudobja in simptomi se pojavijo pri počitku.

Ti razredi dokumentirajo resnost simptomov in jih lahko uporabimo za oceno odziva na terapijo. Čeprav je uporaba široko razširjena, NYHA razredi nimajo visoke ponovljivosti in ne morejo zanesljivo napovedati prehujene razdalje ali vadbene tolerance pri formalnih testih.

Delovna skupina ACC / AHA (American College of Cardiology / American Heart Association) je v svojih nasvetih iz leta 2001, predstavila 4 stopnje srčnega popuščanja:

- A. Osebe s visokim tveganjem za razvoj SP v prihodnosti, ampak še brez simptomov.
- B. Strukturne spremembe srca, brez simptomov v kateremkoli stadiju.
- C. Prejšnji ali zdajšnji (trenutni) simptomi srčnega popuščanja v povezavi s strukturnimi spremembami srca, vendar obvladljivo s terapijo (zdravili).
- D. Napredovana bolezen, zahtevano bolnišnično zdravljenje, presaditev srca ali protibolečinsko terapijo.

Označevanje po ACC sistemu je uporabno predvsem v tem, da stanje A predstavlja stanje pred srčnim popuščanjem in se lahko s pravilno terapijo prepreči napredovanje. Za to stanje ni ustreznega vzporednika s NYHA klasifikacijo. ACC stanje B ustreza stanju NYHA I. Stanje C korelira s NYHA II in III, ACC stanje D pa s NYHA IV.

2.2.2. Razlogi za srčno popuščanje

- Ishemična srčna bolezen – srčno popuščanje s visokim iztisom
- Aortna ali mitralna regurgitacija (volumski stres) – anemija
- Aortna ali mitralna stenoza (stres posledica pritiska) – tirotoksikoza
- Kongenitalna kardiomiopatija – septikemija
- Konrestivni perikarditis – Pagetova bolezen
- Zloraba alkohola – akromegalija

Tabela 3 – simptomi srčnega popuščanja po organih

Sistem	Sprememba
Srce	Hipertrofija levega ventrikla Dilatacija levega ventrikla Spremembe kalcij-krožeči proteini Preklop na smrtne izoforme kontraktilnih proteinov Sproščanje atriskih natriuretičnih peptidov Sproščanje možganskih natriuretičnih peptidov (BNP) Sproščanje provnetnih citokinov (TNF)
Pljuča	Prekomerna ventilacija Povečanje mrtvega prostora

Ledvice	Sproščanje renina Sproščanje eritropoetina Zmanjšanje glomerulne filtracije Retencija (zadrževanje) natrija in vode
Nevrohipofiza	Sproščanje antidiuretičnega hormona (vazopresina)
Nadledvične žleze	Povečanje aldosterona Sproščanje kateholamina
Avtonomni živčni sistem	Aktivacija simpatika
Arterije	Vazokonstrikcija Sproščanje endotelina
Skeletno mišičje	Disfunkcija endotela Spremembe metabolizma Atrofija (zmanjšanje organa) Sproščanje provnetnih citokinov (TNF)

[10]

2.2.3. Diagnoza srčnega popuščanja

- Zdravstvena in družinska zgodovina
- Fizični pregled
- Testi (EKG, rentgen prsnega koša)
- Laboratorijske preiskave (BNP krvni test)

Splošni zdravnik diagnosticira diastolično popuščanje s pomočjo prsnega rentgena, ki lahko pokaže kongestijo, brez bistvene dilatacije levega ventrikla. Za potrditev je potreben ekokardiograf .

Laboratorijski testi:

Hematološki testi lahko pokažejo anemijo, ki jo povezujemo s slabo prognozo – mehanizmi še niso raziskani.

Odpoved ledvic je drug slab prognostični pokazatelj, saj zmanjša izbiro možnih terapij.

Serumski elektroliti lahko pokažejo:

- hipokaliemijo, ki poveča tveganje za aritmije
- hiperkaliemijo, ki lahko omeji uporabo inhibitorjev sistema renin – angiotenzin
- hiponatriemija, indikator aktivacije sistema renin – angiotenzin, kar je slab prognostični znak
- ocena ščitnične funkcije: detekcija okultnih tirotoksikoz ali miksedemov. Pri ne razloženih primerih, lahko primerne biopsije vodijo do diagnoze amiloidoze.
Dodatno se oceni še stanje železa za izključitev hemokromatoze. Biopsija miokarda lahko izključi specifične primere razširjene kardiomiopatije, ampak redko razkrije specifično diagnozo.
- Ocena serumskih proteinov BNP in NT proBNP lahko uporabno pripomore k klinični preteklosti pacienta in fizičnim pregledom pri diagnozi srčnega popuščanja. Meritve serumskega BNP-ja so pokazale dodano vrednost pri klinični oceni diferencialne dispenije pri ne srčnih vzrokih za srčno popuščanje. BNP se primarno sprošča iz ventriklov in je povečan, ko je zvečan polnilni pritisk v ventriklu. Je dokaj občutljiv pokazatelj pri pacientih s simptomatskim srčnim popuščanjem – ali zaradi sistolične ali diastolične disfunkcije. Je manj občutljiv pri starejših pacientih, ženskah in pacientih s kronično obstrukcijsko pljučno boleznijo (*COPD - Chronic obstructive pulmonary disease*)

EKG in rentgen prsnega koša

EKG lahko pokaže skrito ali sekundarno aritmijo, srčni infarkt, nespecifične spremembe – ki pogosto vključujejo nizko napetostne, intraventrikularne prevodniške okvare, hipertrofijo levega ventrikla in nespecifične spremembe polarizacije. Rentgen pokaže velikost in obliko srčne silhuete. Kardiomegalija je pomembno odkritje in je slab prognostični znak. Znaki hipertenzije pljučnih ven vključuje relativne razširitve zgornjih ven, perivaskularni edem (nejasnost zunanje linije žil), intersticijski edem in pojav

alveolarne tekočine. Pri akutnem srčnem popuščanju te ugotovitve zmerno sovpadajo s pljučnim žilnim pritiskom. Toda pacienti s kroničnim srčnim popuščanjem lahko kažejo relativno normalne pljučne žile, navkljub povečanemu pritisku. Pleuralne efuzije so pogoste in po navadi bilateralne ali na desni strani.[11]

2.2.4. Zdravljenje

Cilj zdravljenja je zmanjšati periferni upor (vazodilatacija) in zmanjšati celokupen volumen plazme, da s tem razbremenimo srce. Diuretiki ostajajo prva izbira terapije. Zaradi vpletenost endokrinskega sistema, velika večina zdravil vpliva na endokrini sistem.

2.3.Laboratorijski testi ob preiskovancu (POCT – Point of Care Testing)

2.3.1. Definicija

Laboratorijsko testiranje ob preiskovancu je laboratorijsko testiranje, ki se izvede v bližini pacientove oskrbe. Izraz POCT za laboratorijsko testiranje ob preiskovancu je nadomestil izraze kot so: analiza ob postelji (near patient testing ali bedside testing), hitri test (Quick test, Rapid test), suha kemija (Dry chemistry)... Pomembno je, da razlikujemo med posameznimi izrazi, čeprav imajo isti pomen se razlikujejo po različnih načinih izvedbe analize.

2.3.2. Zgodovinski pregled

V preteklosti je diagnostična tehnologija vplivala na to, kje se testiranje izvaja. Veliki in kompleksni laboratorijski analizatorji so omogočali učinkovito in gospodarno testiranje v centralnih laboratorijih. Z razvojem centralnega laboratorija, so se metode kontrole kakovosti znatno izboljšale in s tem smo dobili bolj pravilne in natančne rezultate. Za trenutni tehnološki napredok je značilna mikrokemija (biosenzorji in analiza celokupne krvi), mikrokomputerizacija (microcomputerization), miniaturizacija in ne invazivni postopki testiranja. Ti napredki omogočajo izvajanje zapletenih testiranj POC. Ekonomski zahteve po skrajšanju dolžine bivanja, zmanjšanju stroškov zdravljenja v bolnišnici in upravljanje z omejenimi viri, ne da bi ogrožali bolnikov izid zdravljenja, je spodbudilo sistem zdravstvenega varstva, k izvajanju POC testiranja. Vendar pa izvajanje POC testiranja, brez dokazila o učinkovitosti, postavlja pomembna vprašanja. Ta vprašanja vključujejo: stroške, nadzor kakovosti, omejitve osebja, prednosti in pomanjkljivosti obstoječega laboratorija in regulativo. [12]

2.3.3. Prednosti

POCT postaja vse bolj priljubljena oblika testiranja, saj ponuja kar nekaj prednosti pred klasičnimi laboratorijskimi analizami.

- Prenosljivost
- Hitri rezultati
- Majhni volumni vzorca
- Vzorce ni potrebno predhodno predelati
- Enostavnost uporabe

Testiranje se navadno izvede na majhnih, prenosnih, ročnih napravah, ki jih z luhkoto prenašamo iz oddelka na druge lokacije. Za razliko od klasičnega testiranja, se lahko POCT izvaja v bolnišnicah (npr.: ob pacientovi postelji, v pacientovi kopališči...), zdravstvenih domovih, tudi doma pri pacientu.

Čas analize pri POCT je kratek – do nekaj minut. Kar dovoljuje izdajo rezultatov, medtem ko je pacient še na pregledu. To zmanjša čas potreben za postavitev in izvajanje ustreznih terapije. Kadar je usmerjanje pacienta odvisno od laboratorijskih izvidov, lahko laboratorijsko testiranje predstavlja ozko grlo. Podaljšajo se čakalni časi in poslabšajo se izidi zdravljenja. Skrajša se tudi čas katerega porabi zdravnik za diagnozo pacienta.

Majhni volumni vzorca so še posebej dobrodošli pri pacientih s problemi s strjevanjem krvi, novorojenčkih in ostalih pri katerih bi bil odvzem standardnih volumnov problematičen. POCT po navadi deluje na nespremenjenih vzorcih, kar zmanjša količini potrebnega vzorca in čas do analize.

Naprave na katerih se izvajajo testi ob preiskovancu so enostavne za uporabo. Kar pomeni da lahko teste izvaja ne-laboratorijsko osebje, teste lahko izvajajo tudi sami preiskovanci, doma. Veliko takih naprav vsebuje posebna varovala, ki preprečujejo izdajanje rezultata, če je med postopkom prišlo do kakršne koli napake.

S priročnimi inštrumenti lahko ob preiskovancu določujemo: glukozo, hemoglobin, nekatera zdravila, CRP (C reaktivni protein), holesterol, označevalce za obolenje srca, koagulacijske teste, osnovne analize urina...

2.3.4. Slabosti

- Zanesljivost rezultatov
- Problem osebja, ki izvaja analizo
- Neprimerna in prepogosta uporaba
- Neskladnost s predpisi
- Cena

Upravljanje kakovosti POCT predstavlja izziv, zaradi številnih naprav in načinov izvedbe testiranj. Večja kot je priljubljenost takih naprav, bolj problematična postaja kakovost rezultatov.

Problem predstavlja zavajajoči rezultati. Razlike v populaciji pacientov pogosto vodijo do razlik med rezultati POCT in rezultati klasičnega testiranja. Nekaterih metaboliti, zdravila, endogene snovi in drugi faktorji lahko vplivajo na rezultat. Razumeti morajo tudi razlike v koncentracijah analitov v polni krvi in serumu oziroma plazmi. V situacijah, ko se rezultati klasičnega testiranja ne ujemajo s rezultati POCT, osebje velikokrat ne ve kateremu rezultatu zaupati. Lahko se ponovi ali en ali oba testa. V tem primeru POCT ne predstavlja pridobitve ampak še dodatno podaljša čas in poveča ceno testiranja.

Z uporabo POC testiranja se je analiza krvnega vzorca, prenesla v roke ljudem, ki nimajo ustreznih znanj in izkušenj v laboratorijski analitiki. Zato teste ob preiskovancu uvrščamo med dopolnilne teste in ne teste, ki bi zamenjali analizo vzorca v kliničnem laboratoriju.

Pomembno pri uvajanju POCT je ustrezno izobraževanje osebja, ki bo izvajalo analizo. Samo s ustreznim programom zagotavljanja kakovosti, ki vključuje standardne operacijske postopke, kontrola kakovosti in laboratorijski nadzor (zunanja ocena kakovosti) lahko zagotovimo ustrezne in zanesljive rezultate. Zaradi zahtev po pravilnem rezultatu in potencialne posledice nepravilnega rezultata, je zelo pomembno, da se zanesljivost rezultatov prenese iz kliničnih laboratorijev na POC teste.

Namen vsakega analiznega postopka je, ne glede na to kje se izvaja in kdo z njim upravlja, da dobimo prave rezultate. Laboratorijsko testiranje ob preiskovancu postaja pomembno dopolnilo pri postavljanju diagnoze in izbiri ustrezne terapije. Vendar še ne morejo v vseh primerih zamenjati tradicionalne laboratorijske analize.[13][14]

2.3.5. Vrste POC – testiranja

POC testiranje zajema najrazličnejše možnosti testiranj. Testiranja se lahko razdeli na: in-vivo, ex-vivo in in-vitro tehnike; ki so usmerjene ali k kliniku, ali k pacientu. K kliniku usmerjeno testiranje izvaja zdravnik klinik ali njegov pomočnik, zdravniške sestre, ali drugo usposobljeno osebje. Pri testiranju usmerjenem k pacientu, pa test izvede uporabnik sam ali kdo od njegovih bližnjih.

In vitro testiranje se lahko izvaja ob ali blizu pacienteve postelje (npr.: hodnik, pisarna, klinika...). Razpoložljiva tehnologija pogosto določa mesto izvedbe testiranja. Ročne in prenosne naprave lahko uporabljam ob postelji. Največja prednost prenosnih naprav je v tem, da so nezahtevne za vzdrževanje, robustne in enostavne za uporabo. Prenosljivi analizatorji zahtevajo posebni voziček za premikanje med lokacijami. Če je aparat vključen v informacijsko mrežo, lahko podatke POC testiranja pošljemo v centralni laboratorij, kjer jih ocenijo in odobrijo. Tako so lahko zdravniku podatki hitro na voljo.

Razvijajoče tehnologije omogočajo izvedbo in vivo testiranj. Intravenske, intra-arterijske, subkutane in transkutane tehnike omogočajo meritve pO₂, pH, pCO₂, glukoze, laktata in elektrolitov. Razvijajo tudi ne invazivne tehnologije za meritve analitov v izdihanem zraku in preko lumna prebavnega trakta. Trenutno in vivo analizatorji merijo analite neposredno v pacientu (intravensko ali intra-arterijsko). Ex vivo naprave merijo analite zunaj telesa bolnika (npr.: intra-arterijski kateter povezan z analizatorjem). Nekatere naprave omogočajo vračilo vzorca (krvi) preiskovancu.

2.3.6. Možnosti POC testiranj:

I. In vivo and ex vivo testing

A. K kliniku usmerjeni testi

1. Invazivno tipalo (*in vivo*)
 - intravensko
 - intrarterijsko
 - subkutano
2. Neinvazivno tipalo (*ex vivo*)
 - Izdihan zrak
 - Urin
 - Transkutano
 - Črevesni lumen

B. K pacientu usmerjeni testi

1. Transkutano
2. Izdihan zrak

II. In vitro testing

A. K kliniku usmerjeni testi

1. Prenosljivi, prenosni in ročni analizatorji
2. Kit testi za kri in urin
3. Fiksni ali analizatorji dodeljeni mestu
4. Avtomatske delovne postaje

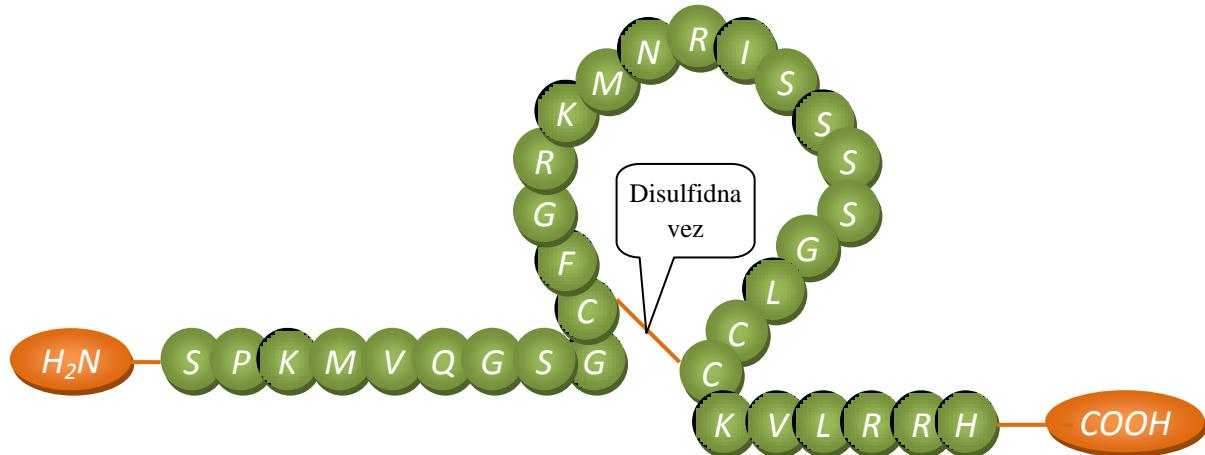
B. K pacientu usmerjeni testi

1. Ročni analizatorji
2. Kit testi za kri in urin

[15]

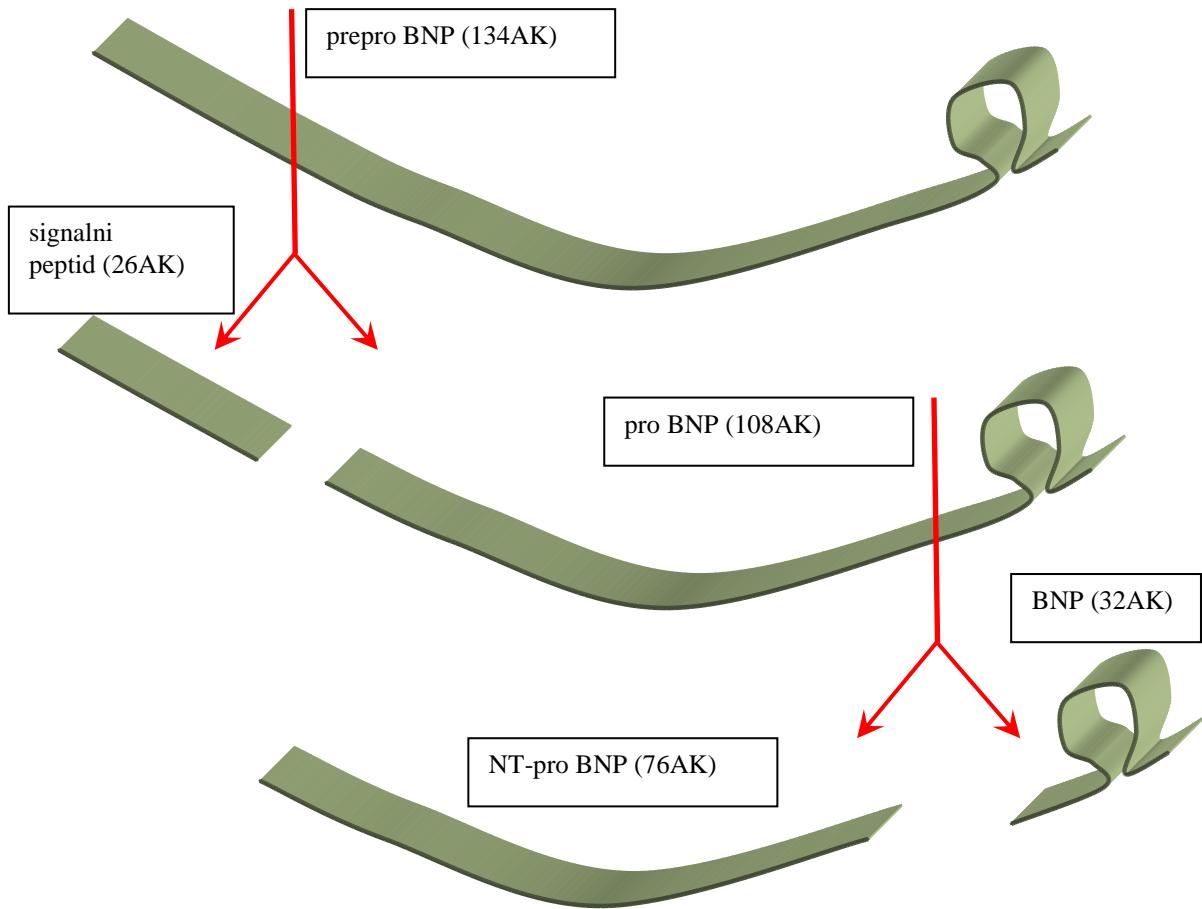
2.4. Možganski natriuretični peptid (BNP)

Možganski natriuretični peptid (BNP) je bil izoliran leta 1988. Takrat so mu določili aminokislinsko zaporedje (glej sliko 5)[16].



Slika 5: Shematski prikaz sekvence aminokislin, ki sestavljačjo humani BNP

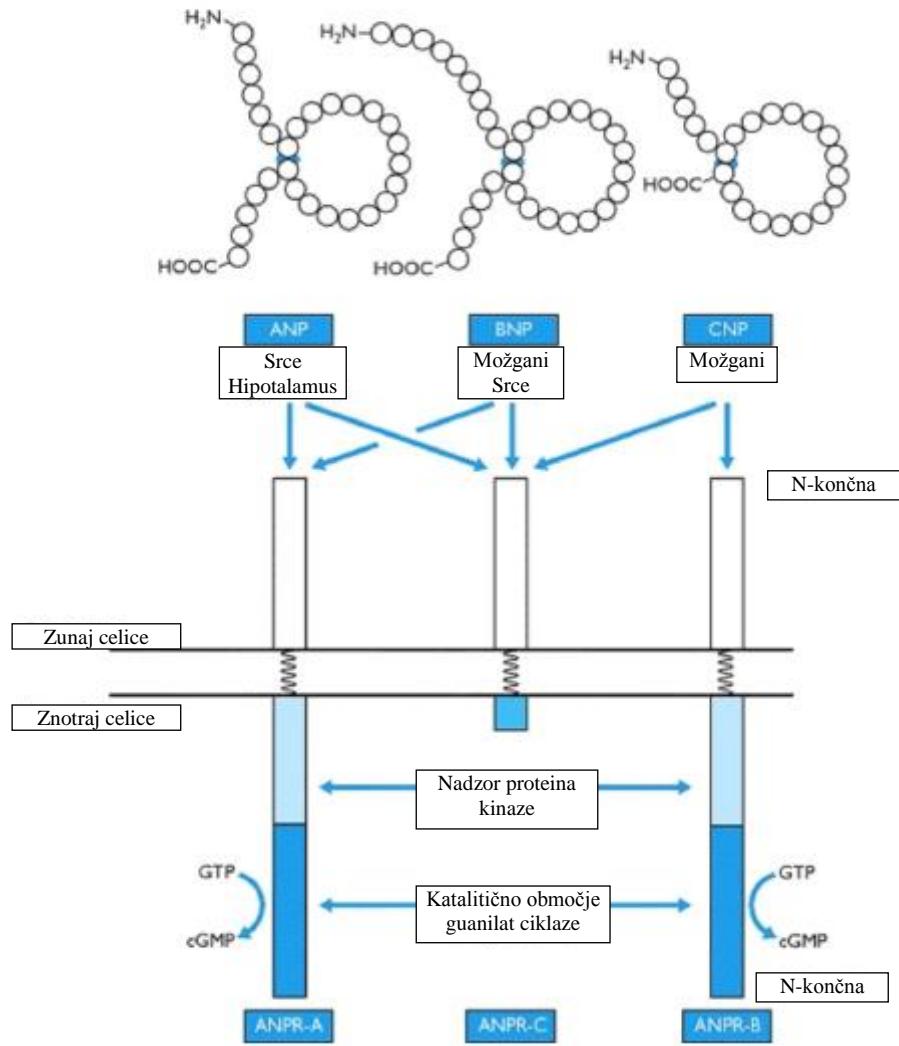
ProBNP se sentitizira v miocitih (srčne celice) iz prepro BNP, kar predstavlja izhodiščni 134 aminokislinski ostanek molekule. Ta molekula se nadalje cepi na dva dela. 108 aminokislinski ostanek predstavlja proBNP dozorelo obliko hormona, ki se proteolitsko razreže v biološko aktivno obliko sestavljeni iz 32 aminokislin in na NT-proBNP (76 AK) obliko, katere biološka funkcija še ni poznana (glej sliko 6) [17].



Slika 6 – sinteza BNP-ja

Ločimo tri type natriuretskih peptidov: atrijski (ANP), možganski (BNP) in C-tip (CNP). Vsi trije hormoni, čeprav jih proizvajajo različni geni, imajo obroč iz 17 aminokislin, ki ga zaključuje disulfidni most med ostanki cisteina (glej sliko 7).

BNP spada v družino strukturno podobnih peptidnih hormonov, vključno s atrijskim natriuretičnim peptidom (ANP), tip-C natriuretičnim peptidom (CNP) in urodilatinom. Te peptide prepoznamo preko obroča sestavljenega iz 17 aminokislinskih, ki nastane z disulfidno vezjo med dvema ostankoma cisteina (glej sliko 5). Struktura obroča kaže visoko stopnjo identifikacije med različnimi natriuretičnimi peptidi (11 od 17 AK ostankov je identičnih vsem predstavnikom skupine natriuretičnih peptidov). BNP molekula je sestavljena iz 32 AK ostankov z disulfidno vezjo med Cys10 in Cys26 (glej sliko 5) [18].



Slika 7 – strukture in mesta sinteze natriuretičnih peptidov in njihovih receptorjev

2.4.1. Dednost in genske povezave med stopnjami plazemskih natriuretičnih peptidov

Za enkrat še ni znano do kakšne mere genski faktorji vplivajo na koncentracijo natriuretičnih peptidov v plazmi.

Poizkusi na transgenih miših, ki vsebujejo gene druge vrste, so pokazale, da nezadostno izražanje gena za NP povezujemo z visokim krvnim pritiskom in hipertrofijo levega ventrikla. Prekomerno izražanje gena pa povezujemo z znižanim krvnim tlakom.

Poleg genov, ki kodirajo NP-je ali njegove receptorje vplivajo na koncentracijo NP tudi drugi geni. Torej tudi ti geni predstavljajo pomemben aspekt pri določanju dovzetnosti za hipertenzijo ali srčno odpoved [19].

2.4.2. Razlike med BNP in proBNP:

- BNP ima krajšo razpolovni čas (20 minut) kot proBNP (60-120 minut).
- Testi BNP merijo Natrecore (nesiritridⁱ) kot BNP; testi, ki temeljijo na proBNP ne zaznajo tega zdravila.
- Za razliko od BNP, je izločanje proBNP pogojeno s ledvično funkcijo.
Interpretacije obeh analitov so odvisne od ledvične odpovedi.
- proBNP ima bistveno boljšo analitsko natančnost. To pomeni da bodo rezultati blizu referenčne meje bolj točni. [20]

ⁱ Nesiritide (Natrecor) je rekombinantno zdravilo iz BNP, ki se ga uporablja za zdravljenje akutne

3. NAMEN DELA

Namen te diplomske naloge je primerjati dve različni imunološki kemiluminiscenčni metodi, za določanje NT-proBNP v serumu, plazmi ali polni krvi. Metodi se razlikujeta v načinu izvedbe. Za predstavnika klasične laboratorijske metode, ki jo izvajamo v klinično-kemijskem ali urgentnem laboratoriju smo izbrali metodo ELCIA. Za predstavnik metode, ki jo izvajamo ob preiskovancu t.i. POCT metodo, pa smo izbrali metodo CLEIA.

V primerjavo je bilo vključenih 73 preiskovancev starih od 4 do 99 let. Od tega jih je bilo 31 ženskega spola 42 pa moškega spola.

Sledila je statistična analiza pridobljenih podatkov s katero smo poskušali ugotoviti ali:

- dajeta metodi statistično primerljive rezultate,
- kakšna je občutljivost in specifičnost POCT metode v primerjavi s klasičnim laboratorijskim testiranjem, pri diagnozi srčnega popuščanja
- se občutljivost in specifičnost spremenita če za obe metodi uporabimo enake referenčne vrednosti, za diagnozo srčnega popuščanja

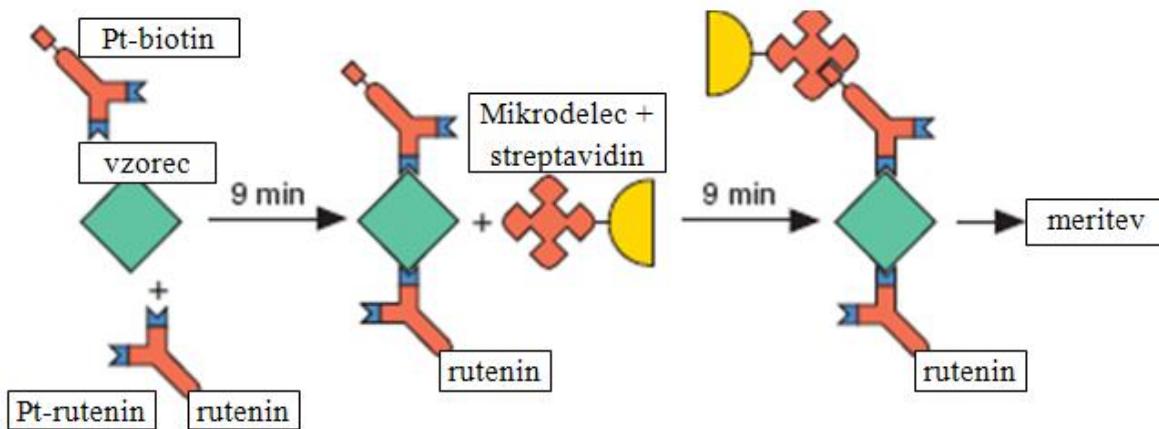
Pogledali smo še koliko časa traja do izdaje rezultatov, pri klasični laboratorijski analizi.

4. MATERIALI IN METODE

4.1. Klasična metoda za določanje NT-proBNP

Kot primer klasične metode za določanje NT-proBNP smo izbrali kemiluminiscenčno imunološko metodo ECLIA (elektro-kemiluminiscenčna imunološka metoda), ki se izvaja na analizatorju ELECSYS®, proizvajalca Roche Diagnostics.

4.1.1. Princip testa



Slika 8 – princip ECLIA metode

Pri prvi inkubaciji se tvori sendvič imunokompleks med antigeni v vzorcu in z biotinom označenimi monoklonskimi protitelesi ter z ruteninom označenimi protitelesi (glej sliko 8).

Po končani inkubaciji se dodajo s streptavidinom označeni mikrodelci z magnetnimi lastnostmi, na katere se preko biotina, vežejo pravkar nastali imuno kompleksi. Sledi inkubacija. Po njej se reakcijska zmes prenese v merilno celico, kjer se mikrodelci ulovijo na površino elektrode. Nevezane molekule se sperejo iz celice. Elektrodi se doda napetost, ki sproži kemiluminiscenčno emisijo, katero izmeri fotopomnoževalka.

Rezultati se kvantificirajo s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo instrument generira preko dvotočkovne kalibracije in glavne krivulje reagenčne kode.

Po končani reakciji, se magnetni mikrodelci sprostijo s površine merilne celice in se jih spere stran. Površina se dobro sčisti in celica je pripravljena za nove meritve [21].

4.1.2. Postopek testa

1. 20 µL vzorca dodamo z biotinom in ruteninom označena poliklonska ovčja protitelesa (se vežejo na različne regije NT-proBNP) in inkubiramo za 9 minut.
2. Nato dodamo s streptavidinom obdane magnetne mikrodelce in vse skupaj se inkubira za nadalnjih 9 minut.
3. Po 9 minutah se reakcijska mešanica prenese v merilno celico, kjer se mikrodelci ujamejo na površino elektrode s pomočjo magneta. Neoznačen del se odstrani s spiranjem merilne celice.
4. V zadnjem koraku se vključi napetost na elektrodi in v prisotnosti TPA pufra (vsebuje tri-propilamin), se zabeleži elektrokemiluminiscentni signal s pomočjo fotopomnoževalke.

Metoda je bila standardizirana s pripravo standardne raztopine s tehtanjem čistega NT-proBNP peptida, ki je bil dodan v human serumu, ki ne vsebuje NT-proBNP.

4.1.3. Lastnosti testa

Metoda ima spodnjo mejo detekcije 1 ng/l. Razpon meritve je od 1 do 25000 ng/l.

Funkcionalna občutljivost (koncentracija, ki jo lahko določimo s natančnostjo 20% znotraj analitičnega koeficiente variacije) je določena pri 10 ng/l. Pri koncentracijah nad 70 ng/l je znotraj analitična natančnost pod 4% CV in med-analitična pod 5% CV.

Vzorci plazme pridobljene s EDTA ali heparinom vračajo med 90% in 110% v primerjavi z enakimi vzorci seruma. Ponovljivost pri 1:2 redčitvi je med 90% in 100% v primerjavi z neredčenimi vzorci. Do 100.000 ng/l ni opaziti Hookovega efekta.

Hemolitični (< 0,621 mmol Hb), lipemični (< 17,1 mmol/L) ali ikterični (< 428 µmol/L bilirubina) vzorci ne vplivajo na meritve, prav tako ne povišane vrednosti protiteles (biotina) ali heterofilnih protiteles (humana protitelesa proti ovčjim antigenom).

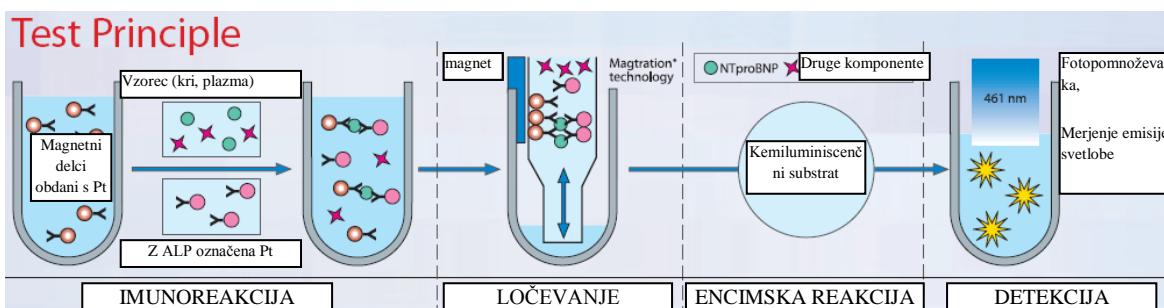
Redčitve

Vzorce s koncentracijami nad 35.000 ng/L lahko redčimo s redčitveno raztopino. Priporočena redčitev je 1:2. Koncentracija redčenega vzorca mora presegati vrednost 15.000 ng/L. Če redčimo ročno, moramo rezultat na koncu pomnožiti s redčitvenim faktorjem. Če redčitev opravi analizator, to tudi upošteva pri izračunu rezultata. [22], [23],[24]

4.2.POC testiranje za določanje NT-proBNP

Kot primer POCT metode za določanje NT-proBNP smo izbrali kemiluminiscenčno imunološko metodo CLEIA (kemiluminiscenčna encimska imunološka metoda, ki se izvaja na analizatorju PATHFAST®, proizvajalca Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.

4.2.1. Princip Testa



Slika 9 – princip CLEIA metode

Instrument izkorišča t.i. Magtration® tehnologijo za ločevanje vezane in nevezane frakcije med posameznimi koraki analize. Pri tej proceduri se vzorcu dodajo poliklonska protitelesa proti NT-proBNP označena s alkalno fosfatazo in magnetni delci prevlečeni s poliklonskimi protitelesi proti NT-proBNP. Protitelesa se vežejo na različne regije NT-proBNP, tvori se "sendvič" imunokompleks tako z encimsko označenimi protitelesi, kot s magnetnimi delci prevlečenimi s protitelesi. Po odstranitvi nevezanih protiteles označenih s encimom, se imunokompleksu doda kemiluminiscenčni substrat. Po kratki inkubaciji instrument izmeri luminiscenco encimske reakcije. Intenziteta izmerjene luminisceence je povezana s koncentracijo NT-proBNP v vzorcu izračunana s pomočjo standardne krivulje (glej sliko 9) [25].

4.2.2. Postopek analize

- Aparat sprejme 6 vzorcev ki se izvajajo istočasno.
- Najprej analizator odčita vrsto reagenta in s tem se določi vrsto analize ki se bo izvajala, v našem primeru NT-proBNP.
- Analizator preveri tip vzorca, ki bo analiziran. Če gre za polno kri pri izračunu koncentracije upošteva predhodno določen hematokrit. Privzeta vrednost je 40%.
- Prevzem tipov v katerih se vršijo reakcije.

- Vzorčenje, jemanje vzorca, konjugacija, dodajanje posebnih magnetnih delcev, mešanje. Sledi imunološka reakcija (5 minut).
- Poteka ločitev na osnovi magnetov, sledi spiranje, in redisperacija (spiranje in magnetna ločitev), dodajanje kemiluminiscentnega substrata.
- Mešanje, encimska reakcija (1 minuta), meritev emisije svetlobe.
- Odstranitev tipsov, izpis rezultatov.

4.2.3. Tehnične specifikacije

- Za testiranje potrebujemo 100 μ l cele krvi ali plazme (Na/Li-heparin, Na/K-EDTA)
- Območje občutljivosti: 15 – 30.000 ng/l
- Meja detekcije: 15 ng/l
- Korelacija med celokupno krvjo in plazmo: $y = 1,04x + 2,9$; $r = 0,991$, $n = 48$ (y : celokupna kri; x :plazma)
- Princip meritve: s pomočjo kemiluminisceence in Magtration® tehnologije^[ii]
- Zmožnost: 6 vzorcev in/ali parametrov na cikel, 18 vzorcev na uro
- Vzorci: Kri, plazma, serum
- Čas meritve: manj od 17 minut
- Temperatura meritve: 37,5°C
- Pomnilnik: podatki o pacientu 1000, QC: 1800, CAL: 300

Pathfast NT-pro BNP test je dobavljen kot reagenčni kit. Vsak kit vsebuje zadosti reagentov za do 60 določitev. Kalibratorji so vključeni v reagenčni kit.

Tabela 4 – Vsebina reagenčnega kita:

Komponenta	Količina
Reagenčna kartuša	6 kartuš x 10 pladnjev
Kalibrator 1	2 vijali po 1,0 ml
Kalibrator 2	2 vijali
Diluent kalibratorja	2 vijali po 1,0 ml

Reagenčna kartuša vsebuje 16 vdolbin. Vdolbine 1,6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16 so prazne.

Ostale pa so napolnjene s sledečimi regenti:

ⁱⁱ Megtration® je registrirana znamka pri Precision System Science

Tabela 5 – Reagenti

<i>Opis reagenta</i>	<i>Volumen</i>	<i>Vdolbina</i>
Alkalna fosfataza konjugirana z anti NT-pro BNP poliklonskimi protitelesi (ovčja) v MOPS* pufru, s konzervansom (Micr-O-protect**).	50 µl	2
Pufer za spiranje: MOPS pufer (pH 7,5) in 0,05% natrijevega azida (konzervans).	400 µl	3, 4, 5
Magnetni delci prevlečeni s proti NT-proBNP poliklonskimi ovčjimi protitelesi v MOPS pufru.	50 µl	7
Razredčitveni pufer vzorca: MOPS pufer (pH 7,9) z ovčjimi IgG in konzervansom (Micr-O-protect).	25 µl	11
Kemiluminiscenčni substrat: CDP-Star (Applied Biosystems).	100 µl	13

*MOPS: 3-morfolinpropansulfonska kislina ** Etanolna raztopina bromo nitro dioksana in metilizotiazolona, deluje kot konzervasn

Kalibratorji:

- Kalibrator 1: izotonična raztopina NaCl v vodi, Na-azid kot konzervans.
- Kalibrator 2: Liofiliziran preparati iz NT-proBNP, BSA, in konzervansa.
- Razrečilo kalibratorja: vodna raztopina z 0,05% Na-azidom.

[26], [27]

4.3. Statistične metode

Za statistično analizo podatkov smo izbrali naslednje statistične metode:

- Linearna regresija, nam opiše obliko povezave izmerjenih koncentracij obeh metod.
- 95% interval zaupanja za naklon in odsek premice.
- Moč povezave metod smo ocenili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom.
- Parni Studentov t-test za ugotovitev ali dajeta metodi statistično različno velike rezultate.
- Občutljivost POCT metode v primerjavi s klasičnim testiranjem.
- Specifičnost POCT metode v primerjavi s klasičnim testiranjem.

Pridobljene podatke smo vnesli v Microsoftov[®] urejevalnik tabel Excel. Poleg koncentracij smo vnesli tudi čas sprejema vzorca in odobritve rezultata za klasično metodo.

5. REZULTATI

Za primerjanje metod smo naključno izbrali 73 preiskovancev, od tega jih je 31 ženskega, 42 pa moškega spola. Stari so bili od 4 do 99 let.

5.1.Zbiranje podatkov

Meritve koncentracije NT-proBNP v serumu z analizatorjem Elecsys so bile opravljene v sklopu rutinskih preiskav v Kliničnem centru, Ljubljana. Meritve koncentracij NT-proBNP v polni krvi z analizatorjem Pathfast pa na sedežu podjetja Genos d.o.o., Ljubljana.

5.2.Statistična analiza podatkov

Najprej smo izračunali srednje vrednosti dveh meritev koncentracij dobljenih s metodo CLEIA. Sledila je primerjava rezultatov obeh metod.

5.2.1. Korelacija in regresija

Povezavo izmerjenih koncentracij med metodama prikazuje slika 10 in jo opiše model linearne regresije. Za oceno moči povezave smo lahko uporabili Pearsonov koreacijski koeficient, saj je za NT-proBNP značilna normalna porazdelitev [28]. Ocenili smo tudi 95% interval zaupanja za odsek in naklon premice (glej tabelo 6).

Pri modelu linearne regresije in izračunu korelacije smo zanemarili rezultat št. 42, ker je bila izmerjena koncentracija pri klasični metodi (ECLIA) višja od 35.000 ng/L, kar je izven delovnega območja metode.

Enačba regresijske premice je: $y = 1,0891x + 91,122$ (glej sliko 10).

Z verjetnostjo tveganja 5% se naklon premice nahaja znotraj intervala **1,0623 – 1,1159** in odsek premice znotraj intervala **-46,51 – 228,76** (glej tabelo 6).

Izračunan Pearsonov koreacijski koeficient je **r = 0,9947**. Ter nam nakazuje močno korelacijo, metodi dajeta visoko primerljive rezultate.

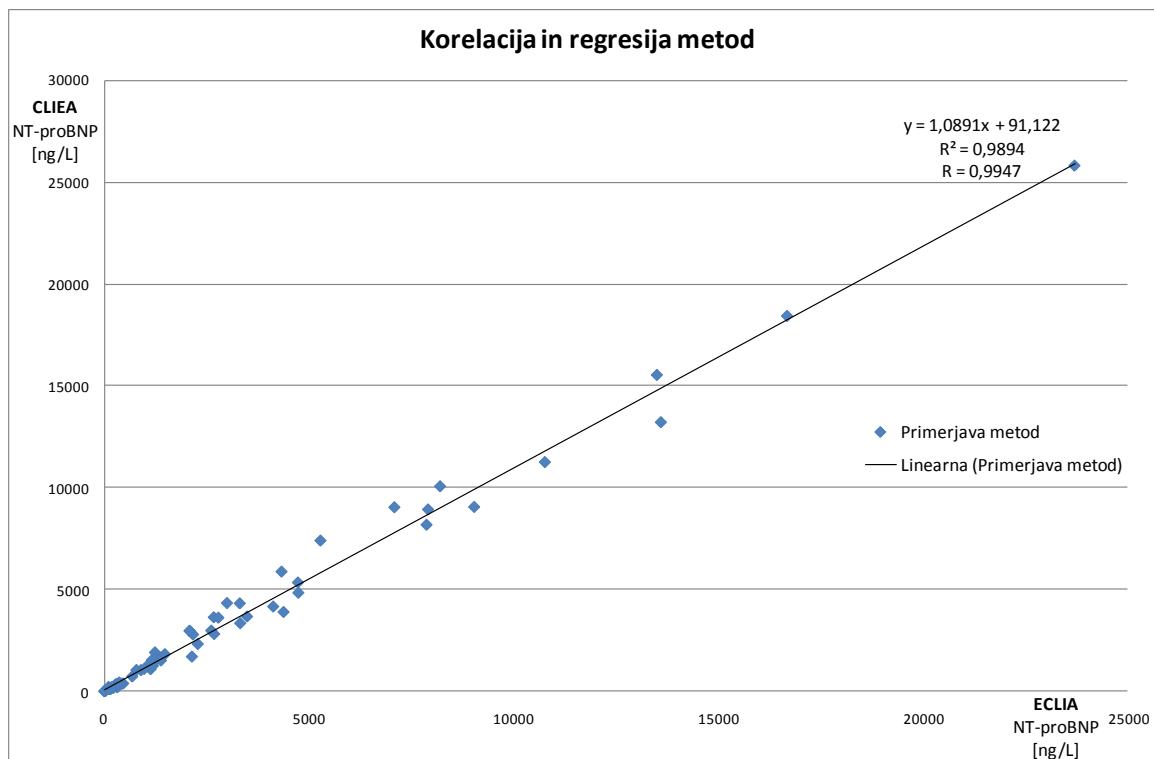
Iz naklona regresijske premice ($1,0891 > 1$) je razvidno, da so rezultati dobljeni s CLEIA metodo višji od rezultatov dobljenih z ELCIA metodo. Ali je razlika statistično značilna smo izračunali s parnim Studentovim t-testom (glej poglavje 5.2.2).

Tabela 6 – Izračun: Pearsonov koreacijski koeficient in 95% interval zaupanja

<i>Regresija</i>	
Pearsonov koreacijski koeficient	0,9947
R kvadrat	0,9894
Prilagojen R kvadrat	0,9893
Standardna napaka	488,03
Število preiskovancev	72

ANOVA						
	df	SS	MS	F	Significance F	
Regresija	1	1561398010	1561398010	6555,727649	6,53639E-71	
Residual	70	16672117,36	238173,1051			
Total	71	1578070128				

	Koeficient	Standardna napaka	t Stat	P-value	Spodnji 95%	Zgornji 95%
Odsek na premici	91,1219	69,0122	1,3204	0,1910	-46,5186	228,7624
Naklon premice	1,0891	0,0135	80,9674	0,0000	1,0623	1,1159



Slika 10 – Linearna regresija metod ECLIA in CLEIA

5.2.2. Studentov parni t-test

Iz naklona regresijske premice je razvidno, da so rezultati dobljeni z POCT metodo višji od rezultatov dobljenih z klasično metodo. Zato smo izračunali Studentov parni t-test, da bi ugotovili če je razlika statistično signifikantna, pri stopnji tveganja 5%. Postavili smo ničelno hipotezo, da med izmerjenimi koncentracijami ni razlike in alternativno hipotezo, ki razliko potrjuje.

Pri izračunu t-testa smo zanemarili rezultat št. 42, ker je bila izmerjena koncentracija pri klasični metodi (ECLIA) višja od 35.000 ng/L, kar je izven delovnega območja metode.

Izračunana vrednost parnega t-test je 4,72; kar je več od kritične vrednosti odčitane iz tabele ($t_{krit.} = 1,99$). Ničelno hipotezo zavrnemo, metoda CLEIA daje statistično značilno višje rezultate od metode ECLIA, pri stopnji tveganja 5% in sicer povprečno za 343,7 ng/L (glej tabelo 7). Do enakega zaključka pridemo tudi če primerjamo vrednost p, ki je signifikantno nižja od 0,05 ($p = 1,1 \times 10^{-5}$).

Tabela 7 – t-test, ali so rezultati pridobljeni s metodo CLEIA višji

parni Studentov t-test

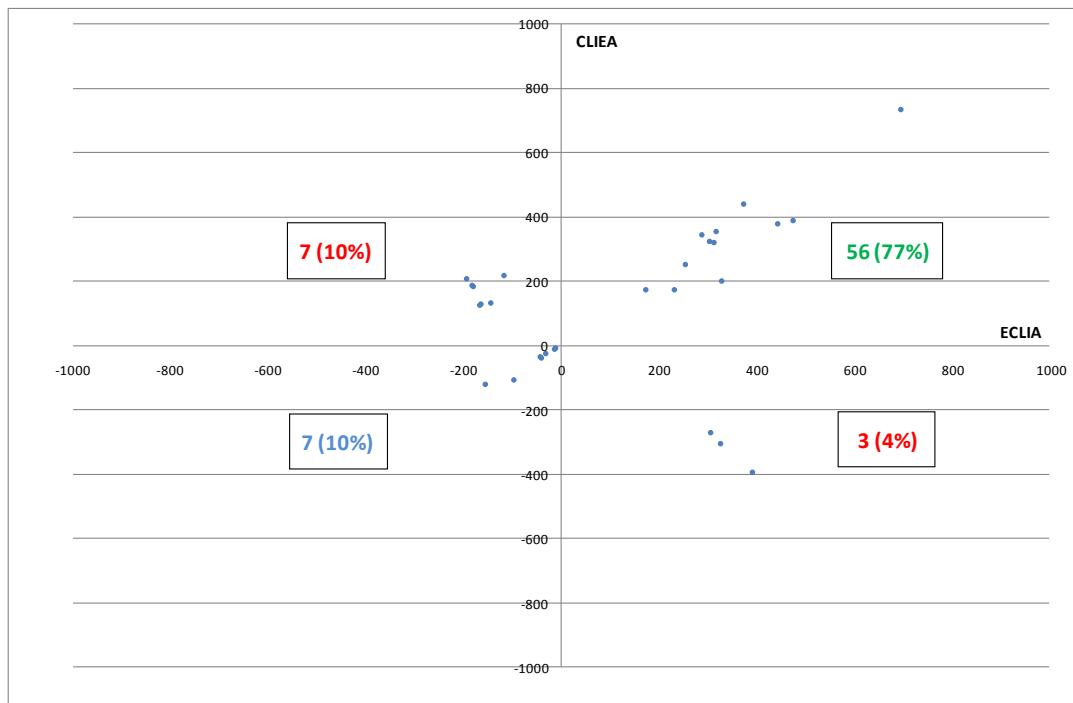
	<i>CLEIA</i>	<i>ECLIA</i>
Srednja vrednost	3179,3	2835,6
Varianca	22226339,8	18541218,0
Število preiskovancev	72	72
Pearsonov koreacijski koeficient	0,9947	
Predpostavljena razlika srednjih vrednosti	0	
df	71	
t statistika	4,719089563	
p(T<=t) dvostransko tveganje	1,15445E-05	
t kritični, dvostransko tveganje	1,993943341	

5.2.3. Občutljivost in specifičnost POCT metode

Izračunali smo občutljivost in specifičnost POCT metode, glede na rezultate klasične metode. Za izračun smo uporabili referenčne vrednosti posamezne metode (glej tabelo 8).

Obe metodi skupaj sta enako določili 56 (77%) pozitivnih rezultatov (polje desno zgoraj) in 7 (10%) negativnih rezultatov (polje desno spodaj). 3 (4%) rezultatov je klasična metoda prepoznala kot pozitivne, POCT metoda pa negativne (polje desno spodaj). 7

(10%) rezultatov je klasična metoda prepoznala kot negativne, POCT metoda pa za pozitivne (polje levo zgoraj). Za lažji pregled smo prikazali le območje okrog referenčnih vrednosti (glej sliko 11).



Slika 11 – Primerjava rezultatov z uporabo referenčnih vrednosti posamezne metode

Izračunana občutljivost POCT metode (CLEIA) glede na pozitivne rezultate dobljene s klasično metodo je 95%. Izračunana specifičnost POCT metode (CLEIA) glede na negativne rezultate dobljene s klasično metodo je 50%.

Tabela 8 – referenčne vrednosti za NT-proBNP, pri določanju srčnega popuščanja

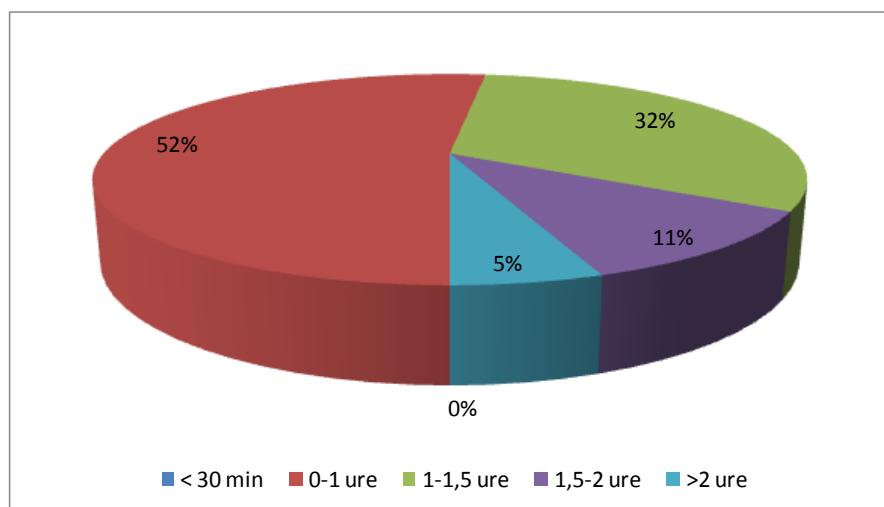
<u>Referenčne vrednosti za NT-proBNP, ki se uporabljajo pri klasični laboratorijski analizi</u> [29]	<u>Referenčne vrednosti za NT-proBNP, ki se uporabljajo pri POCT</u> [25]
<p><i>Ženske:</i></p> <p>pod 50 let: <155 ng/L</p> <p>50-60 let: <222 ng/L</p> <p><i>Moški:</i></p> <p>pod 50 let: <84 ng/L</p> <p>50-60 let: <194 ng/L</p>	<p>Preiskovanci < 75 let: 125 ng/L</p> <p>Preiskovanci ≥ 75 let: 450 ng/L</p>

5.2.4. Čas do izdaje rezultatov pri klasični metodi

Najhitrejši čas od sprejema preiskovanca do izdaje rezultata pri klasični laboratorijski metodi je bil 33 minut najdaljši pa 4 ure in 8 minut. Povprečni čas potreben za izdajo rezultatov je 1 ura in 10 minut.

Primerjali smo še deleže rezultatov pridobljenih v časovnih intervalih (glej sliko 12):

- pod 30 minut – noben rezultat;
- 30 minut do 1 ura: 52% (38 rezultatov)
- 1 ura do 1,5 ure: 32% (23 rezultatov)
- 1,5 ure do 2 ur: 11% (8 rezultatov)
- Nad 2 urami: 5% (4 rezultati)



Slika 12 – časi do odobritve rezultatov pri klasični metodi, deleži rezultatov po časovnem intervalu

6. Razprava

Smernice evropskega društva za kardiologijo (European Society of Cardiology) nakazujejo na uporabnost NT-proBNP-ja pri diagnozi srčnega popuščanja. Uporaben je predvsem pri izključitvi bolezni [30].

Določanje natriuretičnih peptidov je zlasti izboljšalo diagnostično učinkovitost pri odkrivanju srčnega popuščanja pri bolnikih, ki so zaradi akutne dispneje napoteni na urgentne oddelke. Za te bolnike so opredelili tudi mejne vrednosti, pri katerih lahko z veliko verjetnostjo izključimo oziroma potrdimo srčno popuščanje. Izključitvena vrednost je 300 ng/L, pri vključitvenih vrednostih pa moramo upoštevati še starost: pri mlajših od 50 let nad 450 ng/L, med 50. in 75. letom nad 900 ng/L in nad 75. letom nad 1800 ng/L [31].

Evropsko združenje kardiologov v zadnjih smernicah o srčnem popuščanju iz leta 2008, navaja, da je pri vrednosti pod 400 ng/L srčno popuščanje malo verjetno, pri vrednostih nad 2000 ng/L zelo verjetno, vmesne vrednosti predstavljajo sivo cono [32].

Izračunan Pearsonov koreacijski koeficient ($r = 0,99$) kaže na močno korelacijo, metodi dajeta visoko primerljive rezultate. Iz naklona linearne regresijske premice je razvidno, da so rezultati izmerjeni s CLIEA metodo višji od tistih s dobljenih s metodo ECLIA. To smo potrdili s Studentovim parnim t-testom ($p < 0,05$). Iz tega lahko sklepamo, da je med metodama konstantna razlika.

Pri bolnikih z že znanim kroničnim srčnim popuščanjem se meritve NT-proBNP uporablajo za spremljanje poteka bolezni, kot prognostični kazalec in tudi za odločanje glede terapevtskih ukrepov. Pri odkrivanju srčnega popuščanja ima visoko občutljivost (90%) in razmeroma dobro specifičnost (60 do 70%). Občutljivost je največja pri napredovalih oblikah srčnega popuščanja, vrednosti so tu zelo velike, najslabša pa pri bolnikih, ki že prejemajo terapijo, kjer so vrednosti BNP lahko nizke. Vedno moramo vrednosti NT-proBNP vrednotiti v kontekstu kliničnih okoliščin, saj nanju vplivajo še številni dejavniki, kot so starost, spol, telesne sestava oziroma indeks telesne mase, delovanje ledvic in drugih obolenj [33].

Mi smo občutljivost in specifičnost POCT metode primerjali s klasično metodo, saj nismo imeli na voljo podatkov kateri preiskovanci so resnično bolni. Občutljivost POCT metode v primerjavi s klasično metodo je zelo visoka. Obe metodi enako določita 95% pozitivnih rezultatov. Specifičnost POCT metode v primerjavi s klasično metodo je razmeroma dobra. Obe metodi enako določita 50% negativnih rezultatov.

POC testiranje vse pogosteje uporablja v kardiovaskularni medicini, ker omogoča hitre rezultate in s tem hitro prilagajanje terapije. To sovpada s sodobnim pristopom k organizaciji oskrbe bolnika s stabilnim srčnim popuščanjem. Pri čemer so vse preiskave izvedene in vodene s samo enim obiskom. Kar je bolj priročno za pacienta, saj zmanjša število potrebnih obiskov na kliniko [34].

Ena od uporabnosti NT-proBNP se pokaže tudi pri ugotavljanju disfunkcije levega ventrikla po akutnem srčnem infarktu, saj ima visoko negativno napovedno vrednost. Meritve opravljene tik pred odpustom bolnika, ki je utrpel akutni srčni infarkt, pokažejo boljši vpogled v stanje levega ventrikla, kot meritve opravljene ob sprejemu v bolnišnico ali od kliničnih in radioloških pregledov [35].

7. SKLEPI

Namen diplomskega dela je bil primerjati rezultate NT-proBNP dveh imunoloških kemiluminiscenčnih metod. Metodi smo primerjali, da bi ugotovili ali lahko POCT metoda zamenja klasično laboratorijsko testiranje.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Izračunan Pearsonov koreacijski koeficient ($r = 0,99$) nam prikazuje, da metodi dajeta visoko primerljive rezultate.
- Studentov parni t-test je potrdil ($p < 0,05$), so rezultati dobljeni s POCT metodo statistično signifikantno višji od tistih dobljenih s klasično metodo. Zato za obe metodi ne smemo uporabljati enakih referenčnih vrednosti.
- Specifičnost POCT metode v primerjavi s klasično metodo je zelo dobra, občutljivost je slabša. Za določitev diagnostične specifičnosti in občutljivost POCT metode, bi morali imeti na razpolago podatke kateri preiskovanci so resnično bolni.
- Ker ima POCT metoda v primerjavi s klasično metodo visoko specifičnost (95%), bi lahko nadomestila klasično laboratorijsko testiranje. Za obe metodi pa je zaželeno, da se rezultati preverijo še s ultrazvokom srca, ki je zlati standard pri diagnozi srčnega popuščanja.

8. PRILOGA

Podatki uporabljeni v diplomske nalogi:

N	ECLIA		CLEIA			Spol Starost	
	Čas do odobritve rezultatov [h:mm]	NT-proBNP [ng/L]	NT-proBNP [ng/L]		Povprečje NT-proBNP [ng/L]		
1	1:20	193	205,6	209,5	208	Ž	74
2	1:09	1197	1479,1	1274,6	1377	Ž	74
3	1:14	4341	5787,6	5975,5	5882	M	73
4	1:06	44	35,4	33,5	34	M	75
5	0:45	797	1062,2	1040,6	1051	Ž	71
6	1:13	13606	11855,6	14580,8	13218	M	76
7	0:46	391	397,8	393,7	396	M	78
8	1:43	10773	10860,4	11662,2	11261	M	72
9	0:54	2107	2839,2	3075,8	2957	M	82
10	0:55	288	334,5	353,6	344	M	62
11	1:20	318	349,4	359,1	354	M	74
12	0:53	474	384,2	394,5	389	M	65
13	4:08	1250	1919,0	1913,9	1916	Ž	75
14	1:10	304	316,1	333,5	325	M	62
15	3:20	4741	5126,4	5570,1	5348	M	69
16	1:16	1175	1353,5	1360,5	1357	Ž	99
17	1:02	1267	1574,1	1561,5	1568	M	62
18	1:00	32	25,4	23,1	24	M	53
19	1:02	2180	2824,3	2769,1	2797	Ž	65
20	1:23	3009	4350,1	4327,2	4339	Ž	83
21	1:05	329	172,9	224,9	199	M	38
22	0:33	12	6,6	7,6	7	M	30
23	2:00	4391	4009,1	3789,9	3899	M	47
24	0:59	306	283,3	262,4	273	M	75
25	1:58	908	1041,7	1053,2	1047	Ž	24

26	1:18	3332	3347,0	3349,5	3348	M	77
27	1:00	1143	1042,3	1138,3	1090	M	76
28	0:51	442	386,6	369,8	378	M	52
29	0:35	2686	3714,5	3566,0	3640	M	60
30	0:43	8214	10542,4	9601,6	10072	M	75
31	0:49	2696	2755,9	2886,4	2821	M	39
32	1:53	313	321,3	319,2	320	Ž	50
33	0:45	165	136,8	121,3	129	Ž	63
34	0:52	40	39,6	40,4	40	Ž	23
35	1:00	2091	2904,8	3044,7	2975	Ž	72
36	0:37	7097	8874,6	9207,2	9041	M	81
37	1:29	1122	1342,7	1408,7	1376	M	69
38	0:58	16687	19151,0	17721,8	18436	Ž	80
39	0:49	2296	2303,1	2354,3	2329	M	69
40	1:28	13509	15559,7	15519,3	15540	Ž	88
41	1:39	156	118,6	120,6	120	Ž	72
42	0:53	>35000	27115,2	27703,4	27409	Ž	75
43	0:46	23708	25102,6	26534,7	25819	Ž	84
44	1:01	166	125,7	125,5	126	Ž	66
45	1:38	695	752,9	716,4	735	Ž	84
46	1:03	3321	4473,4	4174,9	4324	Ž	81
47	0:53	1198	1230,7	1273,7	1252	M	58
48	1:03	117	168,4	266,1	217	M	58
49	2:22	254	249,2	252,5	251	M	64
50	0:59	1395	1495,2	1537,6	1516	M	81
51	0:47	1405	1708,9	1629,0	1669	M	69
52	0:43	2625	2917,2	3059,7	2988	M	67
53	1:37	2799	3543,0	3698,2	3621	M	66
54	0:50	180	182,8	185,2	184	Ž	59
55	1:03	5292	7376,9	7436,5	7407	M	82
56	0:37	182	185,1	185,5	185	M	69
57	0:53	4138	4108,5	4225,5	4167	M	53
58	0:50	7920	9164,1	8704,6	8934	Ž	76

59	1:00	9046	8931,5	9185,7	9059	ž	91
60	1:10	3499	3785,7	3572,3	3679	ž	95
61	1:02	1492	1880,5	1779,6	1830	ž	73
62	2:42	14	13,1	12,7	13	ž	68
63	0:49	232	164,5	182,4	173	M	53
64	0:57	144	127,7	135,3	131	M	74
65	0:57	1173	1539,4	1532,7	1536	ž	83
66	0:41	7883	8046,2	8318,8	8183	M	80
67	1:28	327	305,5	304,8	305	ž	76
68	1:35	98	113,4	103,1	108	ž	41
69	0:56	173	178,4	165,3	172	ž	4
70	0:47	2152	1702,4	1713,4	1708	M	69
71	0:50	4752	4792,1	4895,1	4844	ž	72
72	0:58	373	440,6	439,0	440	M	67
73	1:13	987	1119,1	1093,2	1106	M	81

9. LITERATURA

- 1) Srčno-žilne bolezni povzročijo več smrti kot vse rakave bolezni skupaj (dostop: 4.2.2009) URL: http://www.dnevnik.si/tiskane_izdaje/dnevnik/1042209546
- 2) Inštitut za varovanje zdravja RS (dostop: 28.8.2009) URL: <http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=865>
- 3) Marjan Pocajt, Anton Širca; Anatomija in fiziologija; 3. Izdaja; DZS, Ljubljana, 2001;
- 4) Judith Mackay, George A. Mensah, Shanthi Mendis, Kurt Greenlund; **The atlas of heart disease and stroke**; World Health Organization - 2004
- 5) **How the heart works** (dostop: 10.8.2009) URL: www.heart.org.in
- 6) **Najpogostejše srčne bolezni** (dostopano – 24.8.2009) URL: www.viva.si/clanek.asp?ID=1574
- 7) **Heart failure** (dostop: 4.2.2009) URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Heart_failure
- 8) Ashley, Euan A.; Niebauer, Josef; **Cardiology Explained**; Remedica; London; Leto izdaje 2004
- 9) Nussey, S.S. in Whitehead, S.A.; **Endocrinology: An Integrated Approach**; Taylor & Francis; London; Leto izdaje: 2001
- 10) Ashley, Euan A.; Niebauer, Josef; **Cardiology Explained**; Remedica; London; Leto izdaje 2004
- 11) Stephen J. McPhee, Maxine A. Papadakis, Lawrence M. Tierney ; **Current Medical Diagnosis and Treatment**; McGraw-Hill company; leto izdaje: 2008
- 12) Christopher P. Price, Andrew St. John, Jocelyn M. Hicks; **Point-of-care testing**; AAC Press; Leto izdaje: 2004
- 13) James H. Nichols; **Point-of-care testing: performance improvement and evidence-based outcomes**; Marcel Dekker INC., New York; 2003; 520 strani
- 14) Marija Prezelj; Laboratorijski testi ob preiskovancu (POCT - Point of Care Testing); www.kclj.si/kikkb/izobrazevanje/poct/utrip_poct.pdf
- 15) P. Zaloga, R. Phillip Dellinger in Terry Shirey; **The Laboratory-Clinical Interface: Point-of-Care Testing**; Chest (www.chestjournal.org); Leto izdaje: 1999; Strani: 1140–1154
- 16) Yoshikazu Kambayashi, Kazuwa Nakao, Masashi Mukoyama, Yoshihiko Saito, Yoshihiro Ogawa, Shozo Shiono, Ken Inouye, Nobuo Yoshida in Hiroo Imura; **Isolation**

-
- and sequence determination of human brain natriuretic peptide;** Febs Letters; Leto izdaje 1990; strani: 341-345
- 17) Dan L., Crimmins; **Human N-terminal proBNP is a monomer;** Chlincial chemistry; Leto izdaje 2005 (CC 51, No.6); strani: 1035 – 1038
- 18) HyTest News; **ProBNP and proBNP derived peptides BNP and NT pro-BNP;** Turku, (Finska); Leto izdaje: Junij 2007 (URL: <http://www.hystest.fi>)
- 19) Thomas J. Wang, Martin G. Larson, Daniel Levy, Emelia J. Benjamin, Diane Corey, Eric P. Leip in Ramachandran S. Vasan; **Heritability and Genetic Linkage of Plasma Natriuretic Peptide Levels;** Circulation (Journal od the American Heart Association); julij 2003; strani: 13 – 16
- 20) Tehnical Bulletin, Methodist hospital, Omaha; **ProBNP;** (dostopano:)
- 21) David Wild; **The immunoassay handbook,** 3. izdaja; Elsevier Ltd.; 2005; strani: 386 - 390
- 22) **N-terminal pro B-type natriuretic peptide;** Cobas[®]; reagenčni list
- 23) Hallermayer, K., Gallusser, A., Seidel, Ch., Schenk, J., Karl, J., Rippegatter, G. **Elecsys® proBNP a new routine immunoassay to support diagnosos of chronic heart failure;** Roche Diagnostics GmbH, Nemčija
- 24) National Horizon Scanning Unit Horizon scanning report; **Elecsys® ProBNP Immunoassay for the Diagnosis of Congestive Heart Failure;** AHTA (Adelaide Health Technology Assessment); Junij 2004
- 25) 510(k) Substantial equivalence determination decision summary assay and instrument combination template decision summary assay and instrument combination template; FDA; (dostop: 18.7.2009) URL: www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K072189.pdf
- 26) **Pathfast NT-proBNP;** Mitsubishi Kagaku Iatron; reagenčni list
- 27) Uradna spletna stran PATHFAST (dostop: 22.5.2009) URL:
<http://www.pathfast.de/pathfast.html?L=1>
- 28) Bay M., Kirk V., Parner J., in drugi; **NT-proBNP: a new diagnostic screening tool to differentiate between patients with normal and reduced left ventricular systolic function;** Heart, 2003, 89, strani: 150 - 154
- 29) Referenčne vrednosti za NT-proBNP (Elecsys[®]); dostop: 5.9.2009URL:
http://www.kclj.si/kikkb/preiskave/tabele_p/pro_bnp.htm

-
- 30) Stephen A. Hill, Cynthia M. Balion, Pasqualina Santaguida, Matthew J. McQueen, Afisi S. Ismaila, Sonja M. Reichert, Robert McKelvie, Andrew Worster, Parminder S. Raina; **Evidence for the use of B-type natriuretic peptides for screening**; Clinical Biochemistry; 2008; strani: 240–249
- 31) Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S..., **N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study**, Am J Cardiol. 2005;95:948-54.
- 32) Dickstein K... **ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008**, Eur Heart J 2008; 29: 2388-442.
- 33) Irena Keber, Borut Jug, Joško Osredkar; **Uporaba in vrednotenje nekaterih laboratorijskih preiskav – Kdaj in zakaj? Natriuretični peptid BNP**; UKC Ljubljana Tavčarjevi dnevi 2008
- 34) M.R. Cowie, P. Jourdain, A. Maisel, U. Dahlstrom, F. Follath, R. Isnard, A. Luchner, T. McDonagh, J. Mair, M. Nieminen, G. Francis; **Clinical applications of B-type natriuretic peptide (BNP) testing**; European Heart Journal; 2003 (24); strani: 1710 – 1718
- 35) A. Mark Richards, M. Gary Nicholls, Eric A. Espiner...; **B-Type Natriuretic Peptides and Ejection Fraction for Prognosis After Myocardial Infarction**; *Circulation* 2003;107; strani: 2786-2792