

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

RAKUŠA POLONCA

**KORELACIJA REZULTATOV DOLOČITVE HORIONSKEGA
GONADOTROPINA S KEMILUMINESCENČNO METODO V
PLAZMI IN POLNI KRVI**

**CORRELATION OF RESULTS OF CHORIONIC GONADOTROPIN
DETERMINATION WITH THE CHEMILUMINESCENCE METHOD
IN PLASMA AND WHOLE BLOOD**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana 2012

Diplomsko nalogo sem opravila v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Ljubljana, januar, 2012

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Članica komisije: doc.dr. Anamarija Zega mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	3
POVZETEK	5
SUMMARY	6
SEZNAM OKRAJŠAV	7
1. UVOD	8
1.1. Hormoni.....	8
1.2. Nosečnost in hormoni.....	10
1.3. Humani horijonski gonadotropin.....	11
1.3.1. Funkcija Hcg.....	13
1.3.2. Metabolizem hCG.....	14
1.3.3. Standardizacija hCG.....	15
1.3.4. Imunološka determinanta hCG.....	16
1.3.4.1. Analizna nomenklatura.....	16
1.3.4.2. Učinek Pt epitopov na analizno specifičnost.....	16
1.3.4.3. Načrtovanje analize za različne namene.....	17
1.3.5. hCG krvni testi.....	18
1.3.6. hCG urinski testi.....	19
1.3.7. Uporaba HCG z anabolnimi steroidi.....	19
1.3.8. Testi za hCG se uporabljajo.....	20
1.3.8.1. za ugotavljanje nosečnosti.....	20
1.3.8.2. za ugotavljanje ektopične nosečnosti.....	20
1.3.8.3. za ugotavljanje in pregled zdravljenja molarne nosečnosti.....	20
1.3.8.4. za ugotavljanje nepravilnosti pri nosečnosti, npr. Downov sindrom.....	21
1.3.8.5. za ugotavljanje in pregled zdravljenja raka, kot je rak jajčnikov in rak testisov.....	21
1.3.9. Kaj vpliva na test.....	22
1.3.10. Vrednosti hCG v krvi.....	22
1.3.11. Vrednosti hCG v urinu.....	23

1.3.12. Povišane vrednosti hCG.....	24
1.3.13. Znižane vrednosti hCG.....	24
1.3.14. Metode, s katerimi se lahko določa hCG.....	24
1.3.14.1. kemiluminescenčna metoda.....	24
1.3.14.2. RIA test.....	24
1.3.14.3. ELISA test.....	25
1.4. POCT - Analiza ob pacientovi postelji.....	25
2. NAMEN DELA.....	27
3. EKSPERIMENTALNO DELO.....	27
3.1. Postopek analize.....	29
3.2. Analizator PATHFAST™.....	29
3.3. Priprava vzorca.....	32
3.4. Obdelava podatkov.....	32
4. REZULTATI.....	34
4.1. Ponovljivost v dnevu.....	34
4.2. Ponovljivost med dnevi.....	35
4.3. Analitična občutljivost.....	36
4.4. Funkcionalna občutljivost.....	36
4.5. Korelacija med polno krvjo in plazmo.....	37
5. RAZPRAVA.....	39
5.1. Ponovljivost v dnevu.....	39
5.2. Ponovljivost med dnevi.....	40
5.3. Analitično občutljivost.....	41
5.4. Funkcionalna občutljivost.....	41
5.5. Korelacija.....	42
6. SKLEP.....	44
LITERATURA.....	45

POVZETEK

Humani Horionski Gonadotropin je glikoproteinski hormon. Določanje hCG je zelo pomemben diagnostičen parameter, s katerim ugotavljamo nosečnost. Z njim ugotavljamo različne nepravilnosti v nosečnosti, kot so npr. splav, ektopična nosečnost, ugotavljanje Downovega sindroma. S hCG lahko zaznamo tudi različna rakava obolenja.

Določamo ga v urinu in v krvi. V urinu se določa samo, če je hormon prisoten ali pa ga ni. V krvi pa določamo točno vrednost hormona. Določa se lahko v plazmi ali pa v polni krvi.

Če določamo v polni krvi, pomeni, da rezultat dobimo hitreje, ker vzorca ni treba nositi v laboratorij in čakati, da se naredi analiza in da dobimo rezultat, ampak lahko analizo naredimo takoj. To pride prav v urgentnih ambulantah, kjer ponavadi ni veliko časa, da bi čakali na analizo.

Vzorci smo merili na POCT aparatu. Ta aparat lahko nesemo iz laboratorija in naredimo analizo kar zraven pacienta v sobi.

Namen naše diplomske naloge je bil preveriti, če se lahko hormon hCG določa v polni krvi. Primerjali smo rezultate, izmerjene v plazmi, in rezultate, izmerjene v polni krvi.

Najprej smo preverili kako je naša metoda natančna. Zato smo najprej izmerili ponovljivost v dnevu nato pa še med dnevi. Izračunali smo tudi analitično občutljivost ter funkcionalno občutljivost. Na koncu pa smo izračunali kakšna je korelacija med vzorci iz polne krvi ter vzorci iz plazme.

Manjše kot so vrednosti plazme, večji je koeficient variacije, torej je ujemanje manjše.

Pri večjih vrednostih pa je manjši koeficient variacije, torej je ujemanje večje. Vendar so vse vrednosti v mejah normalnega.

Ugotovili smo, da so vsi trije vzorci imeli približno enak koeficient variacije.

Analitična občutljivost PATHFAST hCG je 0.15 IU/L.

Funkcionalna občutljivost PATHFAST hCG je 1.35 IU/L.

Korelacija r med vzorci polne krvi in plazme je 0.97.

SUMMARY

Human chorionic gonadotropin is a glycoprotein hormone. Setting the hCG is a very important diagnostic parameter for pregnancy detection. It serves as a detector of various irregularities in pregnancy like abortion, ectopic pregnancy, and the Down Syndrome. It also serves as a detector of various cancer syndromes.

It can be detected in blood and urine. It is determined in the urine only when the hormone is present or not. In the blood, the exact hormone level can be determined. It can be determined in the serum or whole blood.

If it is determined in whole blood, it means that the result can be obtained faster since we do not need to take the sample to the laboratory and wait for the analysis and result, but can perform the analysis immediately. This is very effective in emergency rooms where there is usually little time to wait for the analysis.

Samples were analyzed on a POCT device. This device can be taken out of the laboratory and analyses can be carried out in the immediate vicinity of the patient in the room.

The purpose of our undergraduate thesis was to check whether the hCG hormone can be determined in whole blood. We compared results measured in the plasma with the results measured in whole blood.

We have checked how accurate our method is. We have measured repetitions intra-assay and also inter-assay. We calculated limit of detection and functional sensitivity. At the end we also calculated correlation between the samples of full blood and the samples of plasma.

The results were higher intra-assay coefficients of variation with lower values and vice versa. However they were quite normal. The three inter-assay samples taken, had approximately the same variation coefficient.

Limit of detection PATHFAST hCG is 0.15 IU/L.

Functional sensitivity PATHFAST hCG is 1.35 IU/L.

The correlation between the full blood and the plasma is 0.97.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH	adenokortikotropni hormon (adrenocorticotropic hormone)
Ag	antigen
AK	aminokislina
Asn	asparagin
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	encimski imunski test (enzyme linked immunosorbent assay)
FSH	folikel stimulirajoči hormon
hCG	humani horijonski gonadotropin
hCGn	razcepljen humani horijonski gonadotropin (nicked humani chorionic gonadotropin)
hCGβcf	humani horijonski gonadotropin beta - jedrni fragment (humani chorionic gonadotropin beta - core fragment)
i.e.	to je (id est)
IS	mednarodni standard (international standard)
LH	luteinizirajoči hormon
MW	molekulska masa (Molecular Weight)
POCT	analiza ob pacientovi postelji (point of care testing)
Pt	protitelo
PTH	parathormon
RIA	radioimunska analiza (Radioimmunoassay)
Ser	serin
TRH	tireotropni sproščujoči hormon (thyrotrophin releasing hormone)
TSH	tireoidni stimulirajoči hormon
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

1. UVOD

1.1. HORMONI

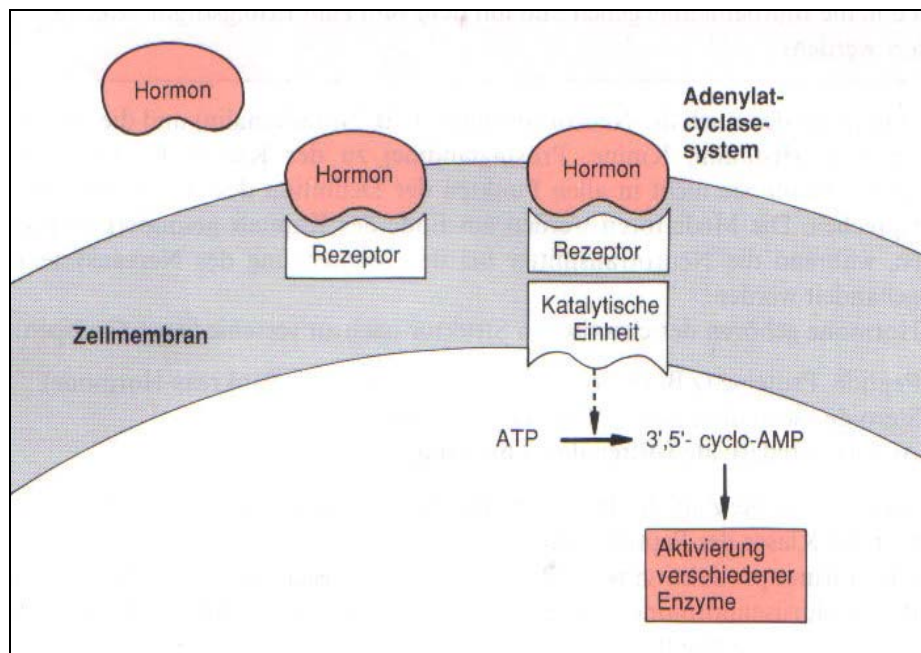
Hormoni so organske snovi, ki jih po zgradbi uvrščamo v tri skupine. Eni spadajo med lipide (vrsta maščob), drugi med peptide in tretji med derivate ene od aminokislin. Pri človeku so odkrili več kot petdeset vrst hormonov, ki sprožijo različne odgovore v tarčnih celicah. Obstajata dva mehanizma delovanja hormona na tarčne celice. Eden deluje tako, da se hormoni vežejo na receptorske molekule v membrani tarčne celice, drugi pa tako, da pridejo hormoni brez težav skozi plazemsko membrano in se vežejo na receptorske molekule v notranjosti tarčne celice. Vezava hormona spremeni obliko receptorske molekule in sproži odgovor na hormon. (9)

Peptidni hormoni, so pravzaprav kratke verige aminokislin. Ker so AK topne v vodi, ne pa v maščobah, ne morejo kar preprosto skozi celično membrano. Zato se vežejo na receptorske molekule v celični membrani, te pa delujejo na druge molekule, ki so na notranjem delu membrane. Receptorske molekule so torej posredniki med sporočilom, ki ga nosi hormon in sporočilom, ki mora preiti v celico. Molekula na notranjem delu membrane, na katero deluje receptorska molekula, posreduje to sporočilo naprej celi vrsti drugih molekul, ki so tik pod membrano. Nazadnje ga sprejme molekula, ki prenese sporočilo iz območja membrane na ustrezno mesto v notranjosti, kjer dokončno sproži ali pospeši delovanje celičnih encimov. (9) (slika 1)

Lipidni hormoni so topni v membranah. Zato lahko brez težav preidejo v notranjost celice. Ti hormoni nastanejo iz holesterola, ki ga dobimo s hrano ali pa ga izdelajo jetra. Lipidne hormone tvorijo spolne žleze, skorja nadledvične žleze in posteljica. Ko lipidni hormon preide v tarčno celico, se veže na receptor, s katerim tvori aktiviran kompleks, podobno kot nastane kompleks encim-substrat. Aktivirani kompleks preide skozi jedrni ovoj in se veže na DNA, na kateri aktivira specifične gene. Zato se začne proizvodnja točno določenih beljakovin. (9)

Zgradba hormonov:

- derivati aminokislin: (tiroksin, adrenalin, melatonin),
- peptidi ali proteini: (TRH, ACTH, PTH, rastni hormon, glikoproteini (FSH, TSH, LH, hCG),
- steroidni hormoni:
 - mineralokortikoidi (aldosteron)
 - glukokortikoidi (kortizol)
 - androgeni (moški spolni hormoni)
 - estrogeni (ženski spolni hormoni)
 - progestageni (v nosečnosti) (19)



Slika 1: Prikaz membranskega receptorja za peptidne hormone (20)

1.2. NOSEČNOST IN HORMONI

Nosečnost je čas, ko koncentracija hormonov naraste. Raven stalnih hormonov izredno naraste, pričnejo pa nastajati tudi za nosečnost specifični hormoni.

Najpomembnejši hormoni, ki so prisotni v nosečnosti:

- *Progesteron*: ta hormon je prisoten pri ženskah tudi zunaj nosečnosti, vendar v veliko nižji koncentraciji. Najprej ga proizvajajo jajčniki, potem pa ga začne proizvajati posteljica. Progesteron igra pomembno vlogo pri vzdrževanju nosečnosti, vključno s preprečevanjem premočnih krčev maternice, ki bi lahko ogrozili nosečnost. Progesteron vzdržuje funkcije posteljice, krepi medenične stene, pripravi dojke na nastajanje mleka.
- *Estrogen*: je hormon, ki je med nosečnostjo prisoten v visoki koncentraciji. V zgodnji nosečnosti estrogen pomaga pri pripravi maternične sluznice na nosečnost tako, da v maternici poveča število krvnih žil in žlez. Odgovoren je tudi za porast količine krvi. Najbolj viden učinek estrogena je povečano zardevanje ali rdečica kože.
- *Humani horionski gonadotropin*: ta hormon je najbolj znan pod imenom nosečniški hormon, saj pri nosečniških testih preverjamo zlasti njegovo prisotnost. Proizvaja ga zoreča posteljica, ki se postopno vrašča v sluznico maternice. hCG je zelo pomemben, ker sproži delovanje drugih hormonov, potrebnih za vzdrževanje nosečnosti in preprečevanje menstruacije.

Drugi pomembni hormoni:

- humani horionski somatomotropin (HCS)
- kalcitonin
- tiroksin
- relaksin
- inzulin
- oksitocin
- eritropoetin
- kortizol
- prolaktin (8)

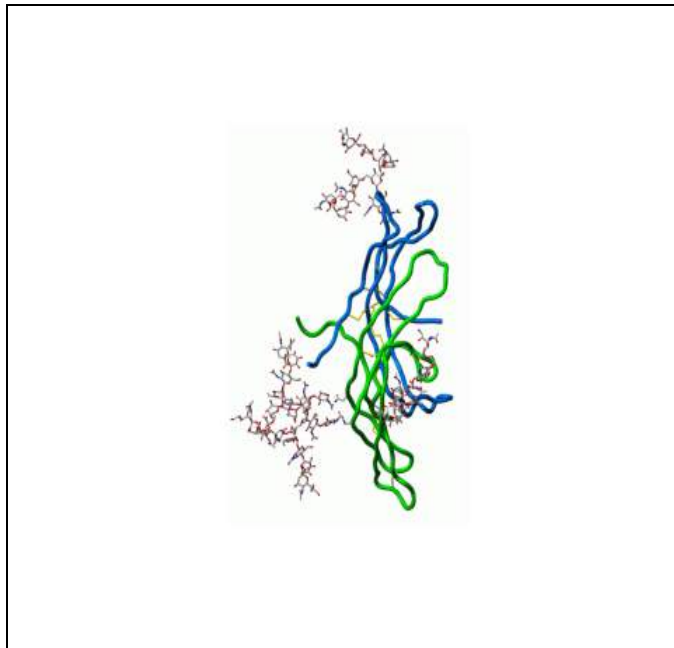
1.3. HUMANI HORMONSKI GONADOTROPIN (hCG)

hCG je hormon, ki se uporablja za ugotavljanje nosečnosti V začetku nosečnosti progesteron stimulira nastajanje hCG v rumenem telescu. hCG je glikoproteinski hormon (GPH). V to skupino spadajo tudi LH, FSH in TSH. Vsi glikoproteini so heterodimeri, razlikujejo se v α -podenoti (GPH α) in v β -podenoti (GPH β).

α -podenota vsebuje 92 aminokislin in je skupna vsem GPH.

β -podenota pa je pri vsakem hormonu različna. LH β vsebuje 121 aminokislin, medtem ko hCG β vsebuje 145 aminokislin. Razlika 24 aminokislin se pri hCG β imenujejo C-terminalni peptidi (CTP). (slika 2) (1)

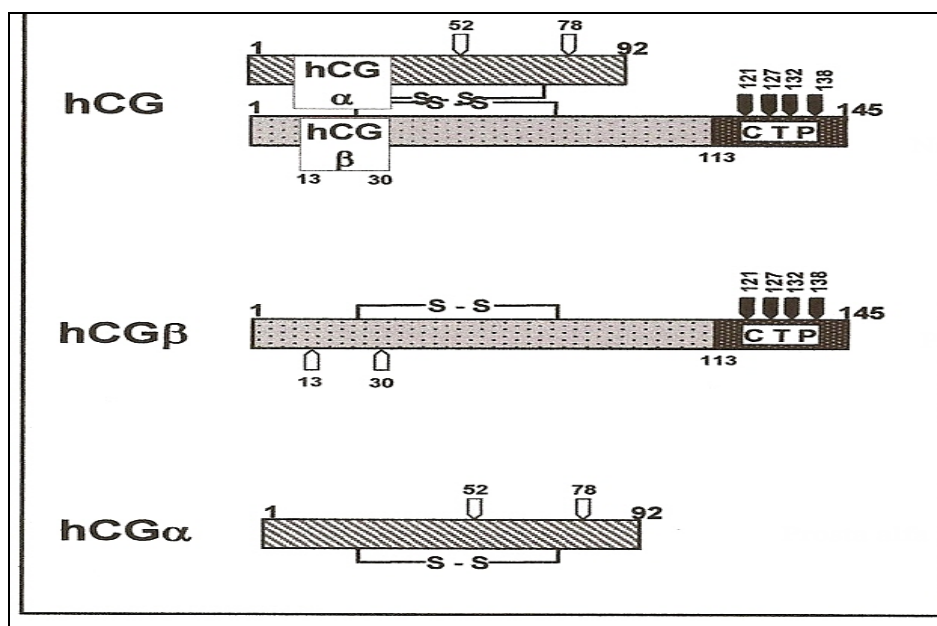
Zaradi β -podenote ima vsak od teh hormonov različno biološko aktivnost. Posamezne podenote (α in β) nimajo biološke aktivnosti. Aktivne postanejo, ko so povezane v celokupen kompleks hCG (α in β skupaj).



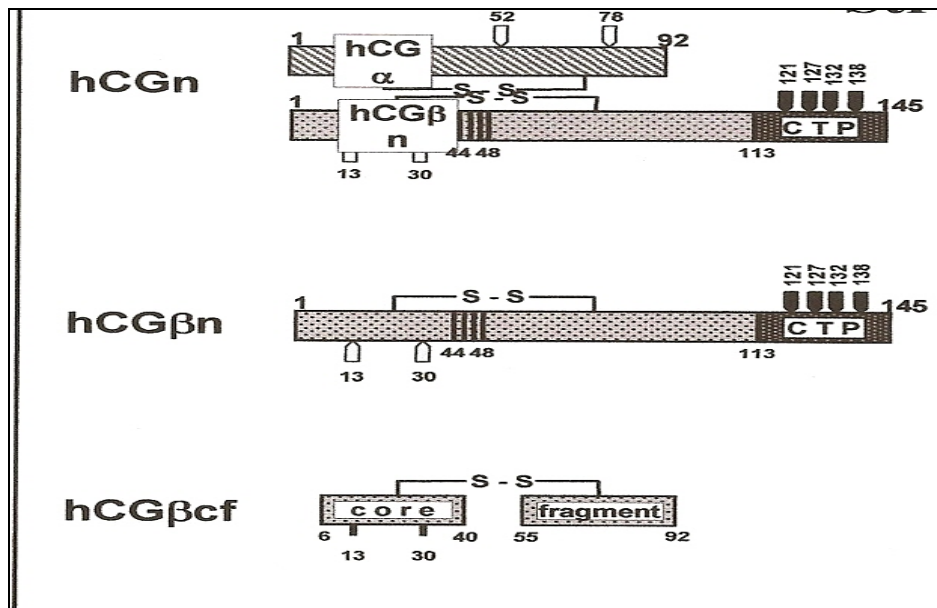
Slika 2: Struktura hCG (22)

Molekula hCG je sestavljena iz peptidnega dela (aminokislina) in ogljikovih hidratov. Zraven osnovnega celokupnega hCG (hCG α in hCG β) lahko v krvi najdemo več različnih oblik hCG. Nekatere izmed njih so:

- hCG α - nima biološke aktivnosti. Najdemo ga v krvi zlasti pri rakavih obolenjih
- hCG β - nima biološke aktivnosti. Najdemo pa ga v krvi in urinu pri nosečnosti in pri rakavih obolenjih. Uporablja se predvsem za določanje nosečnosti.
- hCGn – razcepljen hCG. Na hCG so vezane peptidne vezi med aminokislinami 44 in 48. Ta razcepljen hCG se lahko pojavi tudi v serumu pacientov z rakom. Del hCG β , izoliran iz urina, je tudi v hCG β n obliki.
- hCG β core- fragment (hCG β cf) – hCG β cf vsebuje dve polipeptidni verigi, ki sta povezani z disulfidnim mostom. Urin nosečih žensk vsebuje velike količine hCG β cf, medtem ko se v serumu ne more določiti. (slika 3 in 4) (23)



Slika 3: struktura hCG, hCG β , hCG α



Slika 4: struktura hCGn, hCGβn, hCGβcf (23)

Povprečna molekulska masa (MW) celokupnega hCG je 37500. Molekulska masa hCGα je 14000 od tega je molekulska masa peptidnega deleža 10206. Molekulska masa hCGβ je 23500 od tega je molekulska masa peptidnega deleža 15532.

Molekulska masa hCG, ki ga proizvajajo kancerogeni trofoblasi je višji od nosečnostnega hCG, kar lahko razložimo tako, da ima hCG, ki ga proizvajajo kancerogeni trofoblasi vezanih več ogljikovih hidratov.

1.3.1. FUNKCIJA hCG

Delovanje hCG se posreduje skozi LH/hCG receptor (luteinizirajoči/ humani horionski receptor). Njegova najpomembnejša funkcija je proizvodnja progesterona v rumenem telescu. LH/hCG receptor izražajo tudi različna druga tkiva. Prisotnost hCG v vaskularni maternici lahko kaže na to, da hCG vpliva na fiziološko delovanje maternice.

Receptor je izražen tudi v številnih drugih tkivih, vendar drugače kot v jajčniku.

hCG α (GPH α) stimulira produkcijo prolaktina v decidualne celice (celice endometrija maternice v nosečnosti). Endometrijske celice spodbudijo razdelitev hCG v podenote in skupaj s progesteronom sproščeni hCG α lahko posreduje decidualizacijo (nastajanje) teh celic. (1)

1.3.2. METABOLIZEM hCG

Razpolovni čas hCG vbrizganega v ljudi je dvofazen: hitra faza ima razpolovni čas od 5 do 6 ur, medtem ko je razpolovni čas počasne faze od 24 do 33 ur.

Podobna stopnja odstranitve hCG (hCG, ki nastaja v telesu) je bila opažena po splavu in končanju nosečnosti (porodu) z razpolovnim časom 3.6, 18 in 53 ur.

Razpolovni čas prečiščenega hCG β , vbrizganega v ljudi, je med 0.7 in 10 ur, kar je krajše od hCG. Vendar po končanju nosečnosti ali po splavu hCG β izgine počasneje kot hCG razpolovni čas hCG β je 1, 23 in 194 ur.

Razpolovni čas hCG α je krajši od hCG β . Po končanju nosečnosti je razpolovni čas hCG α med 0.6, 6 in 22 ur. Ta razpolovni čas je daljši kot po vbrizganem prečiščenem hCG α , ta pa je med 0.1 in 0.22 ter 1.2 in 1.3 ur.

Odstopanja med razpolovnimi časi med vbrizganimi in naravnimi podenotami lahko pokažejo, da je bila vbrizgana očiščena oblika delno denaturirana med očiščevanjem in se zato hitreje metabolizira.

Večino hCG v cirkulaciji metabolizirajo jetra, medtem ko približno 20 % izločajo ledvice. Večji del hCG je pri izločanju razgrajen v podenote, zlasti v hCG β cf. V začetku nosečnosti je razmerje hCG β cf v urinu nizko in začne v približno petem tednu nosečnosti presegati hCG. V drugem trimestrju je okrog 80 % HCG imunoodzivnosti v urinu sestavljenega iz hCG β cf. Med nosečnostjo lahko zaznamo hCG β cf v plazmi, ampak koncentracija je samo 0,01 % vrednosti celotnega hCG. Po vbrizganju hCG β je hCG β cf detektiran v urinu. hCG β cf je lahko detektiran tudi v hipofizi, folikularni tekočini in v trofoblastni tekočini. Nekaj hCG β cf se pokaže tudi v placenti. Tako nekateri hCG β cf v urinu lahko izhajajo iz metabolizmov teh tkiv.(1)

1.3.3. STANDARDIZACIJA hCG

WHO je izdala več določenih standardov za hCG. Tretji in identičen četrti mednarodni standard (IS), ki sta v uporabi sedaj sta bila pripravljena leta 1972 in sta bila odobrena s strani WHO kot prvi informacijski raziskovalni pripravek (International Research Preparations 1st IRP). Vsebuje standarde za hCG (75/537), hCG β (75/551) in hCG α (75/569).

Ko se je tretji IS začel uporabljati v laboratorijih so ugotovili, da je kontaminiran z delno razgrajenimi različicami hCG, kar ni vredno, kadar se tretji IS uporablja za standardizacijo imunskih analiz. Zaradi tega je IFCC (international federation of clinical Chemistry and laboratory Medicine) hotel izboljšati standardizacijo imunoloških analiz za hCG in hCG-ju podobne molekule. Zato je nastal nov standard za hCG in hCG-ju podobne molekule, ki ga je pripravil in odobril WHO, kot referenčni reagent za imunološke analize. Vendar WHO še vedno priporoča, da bi se tretji IS še vedno uporabljal za kalibracijo imunoloških analiz.

Novi referenčni preparati so čistejši kot tretji IS. Bioaktivnost novih reagenčnih preparatov za hCG je okrog 11000-16000 IU/mg, to pa je 20-70 % višje od tretjega IS. Višja bioaktivnost je v novem hCG preparatu razložena z odsotnostjo biološko neaktivnih hCGn in hCG β cf.

Ko je novi reagenčni preparat uporabljen za kalibracijo imunoanalize za hCG, hCG β , hCG α in hCG β cf, je koncentracija izražena v pmol/L.

Referenčni reagenti so sestavljeni iz šest oblik hCG. Npr. hCGn je koristen za karakterizacijo specifičnih protiteles. Pt, ki ne prepoznajo hCGn ga bodo spregledala, kar se zgodi posebej v urinu in tudi v serumu nekaterih pacientov z rakom. hCG β n je prav tako pomemben za karakterizacijo epitopov specifičnih protiteles. hCG β cf je pomemben marker pri odkrivanju raka.

Vzrok za spremembe med različnimi imunoanalizami je lahko uporaba nečistih kalibratorjev. Izboljšano ujemanje lahko dosežemo z zamenjavo kalibratorja s čistim hCG preparatom. To je samo en vzrok neskladnosti med metodami. Natančna selekcija Pt in načrtovanje analiz so tudi enako pomembni. (1)

1.3.4. IMUNOLOŠKA DETERMINANTA hCG

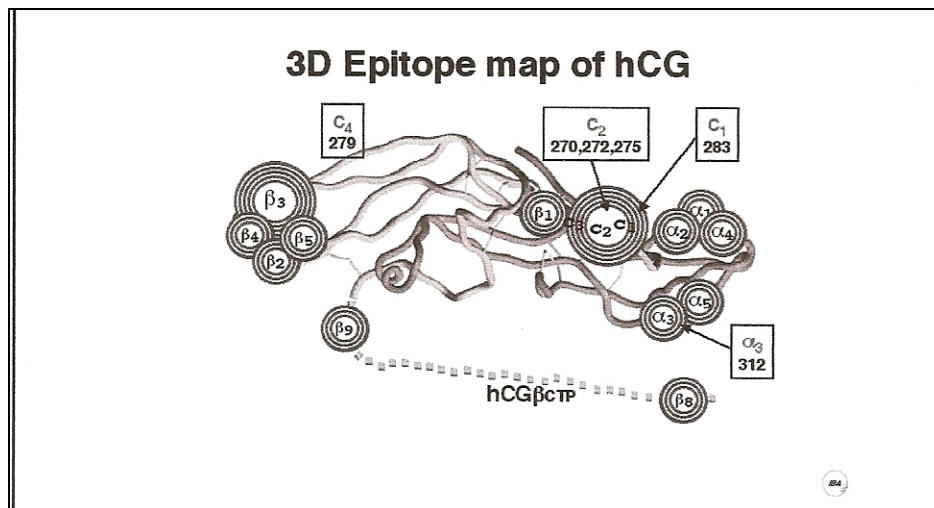
1.3.4.1. Analizna nomenklatura

Imunoanaliza (RIA) za določanje hCG, ki temelji na poliklonalnem antiserumu zaradi velike podobnosti med hCG in LH določa tudi LH. Precej specifičnih zajčjih antiserumov (SB6) za hCG je bilo izdelanih leta 1972 z imunizacijo, tako da zraven detektirajo še hCG β . Torej ti zajčji antiserumi detektirajo hCG in hCG β . RIA test z tem antiserumom detektira hCG že pri 5 IU/L. Ta analiza je bila pogosto uporabljana, kar verjetno pojasni, zakaj je izraz hCG β analiza postal v vsakodnevni rabi. Danes se ta izraz večinoma uporablja za analizo merjenje hCG in hCG β skupaj.

IFCC pa priporoča, da bi bila analiza točno definirana, skladno s tem, kaj merimo, npr. hCG in hCG β skupaj ali posebej. Tako naj bi hCG β analiza detektirala hCG β , ne pa tudi hCG. (1)

1.3.4.2. Učinek Pt epitopov na analizo specifičnost

Čeprav je specifična analiza za hCG in njegove različne oblike lahko dokazana s poliklonalnimi antiserumi, vse trenutno rabljene analize uporabljajo monoklonalna Pt ali pa kombinacijo monoklonalnih Pt in poliklonalnega antiseruma. Monoklonalna Pt z znanimi epitopi oblikujejo specifično analizo za vsako obliko hCG. Območje na hCG kjer se vežejo Pt je natančno definirana; 5 epitopov je lahko zaznanih na hCG α (α 1- α 5) in 7 na hCG β (β 1- β 5, β 8- β 9). Dva epitopa β 8 in β 9, ki ležita na CTP, sta specifična za hCG in hCG β . Pt, ki prepoznajo ta epitopa, so zato v uporabi v številne komercialne namene. (slika 5)



Slika 5: prikaz epitopov na hCG

Epitopi 28 protiteles so bili določeni v študiji v kateri so sodelovali različni proizvajalci in raziskovalne skupine. Na podlagi teh informacij lahko sklepamo o specifičnosti analize, v kateri so ta Pt v uporabi. Točna informacija o značilnosti analize je pridobljena z analizo referenčnih reagentov.

Večina epitopov ni odvisna od spremembe v karbohidratni kompoziciji, ampak dva monoklonalna Pt lahko prepoznata nekatere karbohidratne različice na hCG. Številne študije predlagajo, da je analiza hCGβ klinično uporabna v določenih kliničnih pogojih. (1)

1.3.4.3. Načrtovanje analize za različne klinične namene

Vzorci seruma in plazme se raje uporabljajo za kvantitativno določitev hCG, medtem ko se vzorci urina uporabljajo predvsem za nosečnostne teste. Ker se oba hCG in hCGβ lahko pojavita v serumu in plazmi, se večina serumskih analiz oblikuje tako, da merijo obe skupaj. Sedaj navidezno vse komercialne analize temeljijo na sendvič principu. Nekatere analize uporabljajo Pt, ki se vežejo na CTP v kombinaciji z drugimi Pt, ki se vežejo na hCGβ. Takšne analize ne pokažejo križne reakcije z LH zaradi Pt na CTP, ker LH nima vezanega CTP. Kljub temu HCG s pomanjkanjem CTP, ki se lahko pojavi pri rakavih obolenjih, ni detektiran. Nekatere analize detektirajo hCG in hCGβ precej enakopravno. Specifične analize za hCG so načrtovane z uporabo enega Pt za hCGβ, skupaj s Pt za hCGα kot sledilcem. Nekatere od najbolj občutljivih analiz za hCG so osnovane na teh principih in se jih lahko standardizira.

Analiza, ki detektira hCG, hCG β in hCG β cf skupaj, ima prednost pri merjenju hCG imunoreaktivnosti v urinu. Imunoanaliza, ki temelji na principu inhibicijske vezave, t. j. klasična RIA, večinoma prepozna vse te oblike, ampak malo komercialnih hCG analiz, ki temeljijo na sendvič principu, dela tako.

Specifična in občutljiva analiza za hCG β je lahko izdelana z uporabo monoklonalnih Pt. Največ komercialno dostopnih hCG β analiz je namenjenih za pregled mater na Downov sindrom in so ustrezne za visoko koncentracijo hCG β v plazmi, ki se zgodi v nosečnosti, niso pa ustrezne za določitev nizkih vrednosti hCG β , ki se tipično pojavijo v serumu pacientov z rakom.

Vzorci urina se večinoma uporabljajo za identifikacijo lažno-pozitivnih rezultatov v vzorcu plazme. Na primer v Veliki Britaniji se uporabljajo za detekcijo reaktivacije tumorja po zdravljenju trofoblastnih tumorjev.

Veliko netrofoblastnih tumorjev proizvaja hCG β . Večina teh se razgradi v hCG β cf pri izločanju v urin. Več analiz za hCG β cf v urinu se je pokazalo kot uspešnih za detekcijo ginekoloških tumorjev. Nekatere analize merijo določene razgrajene oblike hCG, ki se skupno imenujejo urinski gonadotropni fragmenti in urinski gonadotropni peptidi. Uporaba te analize za opazovanje rakavih obolenj je ovirana z dnevno spremembo v urinski koncentraciji hCG β cf. Zaradi tega problema komercialna analiza za hCG β cf dandanes ni splošno dosegljiva(1)

1.3.5. hCG KRVNI TESTI

hCG krvni testi se lahko uporabljajo tako, da vidimo, če je hCG prisoten, merimo pa lahko tudi točno vrednost hCG v krvi. Krvni test se uporablja za ugotavljanje nosečnosti, preverjanje nenormalnosti v nosečnosti, lahko pa testiramo hCG v zvezi z nekaterimi rakavimi obolenji.

Nivoji hCG v krvi se uporabljajo kot presejalni testi za nepravilnosti pri nosečnosti (v materinem serumu trikratni in štirikratni presejalni testi). Ponavadi se naredijo med 15. in

20. tednom. Ta test preveri nivo treh ali štirih substanc v krvi noseče ženske. Trojni presejalni test vključuje: α -fetoprotein (AFP), hCG in tip estrogena (nekonjugiran estriol ali uE3). Štirikratni presejalni test vključuje: AFP, hCG, tip estrogena (nekonjugiran estriol ali uE3) in nivo hormona inhibin A.

Nivo teh substanc skupaj s starostjo in drugimi faktorji pomaga, da zdravnik lažje oceni možnost, ali bi otrok lahko imel kakšne težave ali pa prirojene napake.

V nekaterih primerih je kombinacija presejalnih testov narejena v prvem trimestru za določanje Downovega sindroma. Ta presejalni test uporablja ultrazvočne meritve debeline kože fetusovega vratu (nuhalna svetlina) in krvne teste za določanje vrednosti nosečnostnega hormona hCG in proteina, imenovanega PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A). (3)

1.3.6. hCG URINSKI TESTI

hCG urinski testi se ponavadi uporabljajo za rutinski test nosečnosti. Test ne meri točne vrednosti. Meri samo če je hormon prisoten ali ne.

1.3.7. UPORABA hCG Z ANABOLNIMI STEROIDI

V svetu hkrati s povečano uporabo drog narašča uporaba hCG v kombinaciji z različnimi anabolnimi androgenimi steroidi (AAS). Ko je AAS vnesen v moško telo, telesna naravna negativno povratna zveza povzroči, da telo izključi svojo proizvodnjo testosterona preko izključitve hipotalamične-hipofizne-gonadalne osi (HPGA). Visok nivo AAS, ki posnema naravni telesni testosteron, sproži hipotalamus, da izključi proizvodnjo gonadotropnega-sproščujočega hormona (GnRH) iz hipotalamusa. Brez GnRH hipofizna žleza ustavi izločanje luteinizirajočega hormona (LH). LH normalno potuje iz hipofize skozi krvne žile do testisov (mod), kjer sproži produkcijo in izločanje testosterona. Brez LH testisi izključijo produkcijo testosterona, kar povzroči atrofijo testisov.

V moškem telesu hCG oponaša LH in pomaga obnoviti in ohranjati produkcijo testosterona v testisih. Kot takšen je hCG splošno uporaben med in po steroidnih ciklih, da ohranja in obnovi velikost testisov tako dobro kot endogena proizvodnja testosterona.

Kakorkoli, če se hCG uporablja predolgo in v prevelikih količinah, začne naravni testosteron zadrževati svojo lastno produkcijo, kar se negativno odraža na hipotalamusu in hipofizi. (6)

1.3.8. TESTI ZA hCG SE UPORABLJAJO:

1.3.8.1. za ugotavljanje nosečnosti

Največkrat in najbolj pogosto se hCG določa za ugotavljanje nosečnosti. Poznamo hitre teste, ki jih lahko naredimo doma. Ti testi se uporabljajo za kvalitativno odkrivanje prisotnosti hCG v vzorcu urina. Poznamo več različnih testov vendar imajo vsi približno enak princip delovanja. Testna paličica je prevlečena z anti hCG protitelesi na katere se veže hCG iz urina. Če je hCG prisoten se prikažeta dve rožnati črti ali plus odvisno od vrste testa.

1.3.8.2. za ugotavljanje ektopične nosečnosti

Drugo ime za ektopično nosečnost je izvenmaternična nosečnost. Ektopična nosečnost je komplikacija nosečnosti, pri kateri se oplojeno jajčece razvija v drugem tkivu in ne v maternični steni. Večina ektopičnih nosečnosti se zgodi v jajcevodu, ker po oploditvi celice ne potujejo naprej v maternično votlino ampak se usidrajo kar tam. Zunajmaternična nosečnost se lahko zgodi tudi v materničnem vratu, jajčnikih, redko pa tudi v trebušni votlini.

Ektopično nosečnost določamo tudi s hCG β . Vrednost titra hCG β se pri normalni nosečnosti v 48 urah podvoji, zato zvečanje, ki je manjše od 66 %, kaže na patološko nosečnost, predvsem na ektopično nosečnost. (13)

1.3.8.3. za ugotovitev in pregled zdravljenja molarne nosečnosti

Molarno nosečnost imenujemo še hidatidna mola ali pa tudi nosečnost brezobličnega telesa. Po oploditvi pri molarni nosečnosti namesto normalno razvijajočega se embrija, nastane patološka masa, podobna nenormalni posteljici. Večina primerov molarne

nosečnosti se odkrije v prvih treh mesecih nosečnosti. Pri ženskah, ki so prebolele molarno nosečnost obstaja povečano tveganje za nastanek določenega tipa malignega tumorja maternice.

Zgodnja opozorilna znaka sta krvavitve in, glede na normalno nosečnost, znatno povišana koncentracija hCG, ki napeljeta zdravnika, da odkrije nepravilnosti. Ginekolog z ultrazvočnim pregledom odkrije ali je plod v maternici normalen ali gre za hidatidno molo. (12)

1.3.8.4. za ugotavljanje nepravilnosti pri nosečnosti npr. Downov sindroh

Downov sindrom ali trisomija 21 je kromosomska motnja, ki jo povzroči dodaten kromosom.

Ženska, ki je noseča z otrokom, ki ima trisomijo kromosoma 21 (Downov sindrom), ima povišano serumsko koncentracijo hCG in hCG β .

Celokupni hCG ali hCG β skupaj z α -fetoproteinom (AFP), inhibinom A in estrioli v materinem serumu se normalno uporabljajo za presejalni test v drugem trimestru, medtem ko se hormon hCG β in nosečnostno povezan plazemski protein-A (PAPP-A) v kombinaciji z meritvijo nuhalne svetline, uporablja v prvem trimestru. (14)

1.3.8.5. za ugotavljanje in pregled zdravljenja raka, kot sta rak jajčnika in rak testisov.

Če pri moškem določimo v krvi hCG, ponavadi najprej pomislimo na rak testisov, ker pri moškem normalno v krvi ne bi smelo biti hormona hCG.

Poznamo dva osnovna tipa tumorjev testisov, maligni tumorji testisov in nemaligni tumorji testisov. Povišana koncentracija hCG je opažena pri približno 50% pacientov z nemaligim tumorjem testisov in 10-15% pri pacientih z malignim tumorjem testisov.

Pri ženski se rak jajčnika ponavadi pojavi v starosti nad 50 let in takrat ponavadi ženska ni več v rodni dobi. Zato redko pomislimo na nosečnost, prej na kako bolezen, kot je rak, ali pa kakšno drugo nepravilnost. Če pa je ženska še vedno v rodni dobi pa se najprej

izključi možnost nosečnosti, potem pa se iščejo drugi vzroki zakaj ima ženska povišan hormon hCG.

Povišane vrednost hCG β in hCG β cf v urinu se pojavijo pri pacientkah z rakom na jajčnikih, materničnem vratu, endometriju. (1)

1.3.9. KAJ VPLIVA NA TEST:

- Če delamo urinski test za hCG prezgodaj (prvi teden po vgnezditev jajčeca) ali pa če imamo urinski vzorec, vzet sredi dneva, lahko dobimo lažne negativne vrednosti.
- Vrednosti hCG lahko ostanejo visoke tudi do 4 tedne po splavu.
- Če dobimo hCG vbrizgan z injekcijo za zdravljenje neplodnosti, so rezultati hCG lahko višji več tednov.
- Če imamo kri v urinu to lahko spremeni vrednost hCG.
- Če uporabljamo diuretike in prometazin, ti lahko povzročajo znižane vrednosti hCG v urinu.
- Vpliva tudi uporaba heparina (antikoagulant).
- Vpliv imajo tudi razna zdravila: hipnotiki, antipsihotiki ... (3)

1.3.10. VREDNOSTI hCG V KRVI

LMP- čas od zadnje menstruacije (last menstrual period)

3 tedne LMP: 5-50 IU/L

4 tedne LMP: 5-426 IU/L

5 tednov LMP: 18-7340 IU/L

6 tednov LMP: 1080-56500 IU/L

7-8 tednov LMP: 7650-229000 IU/L

9-12 tednov LMP: 25700-288000 IU/L

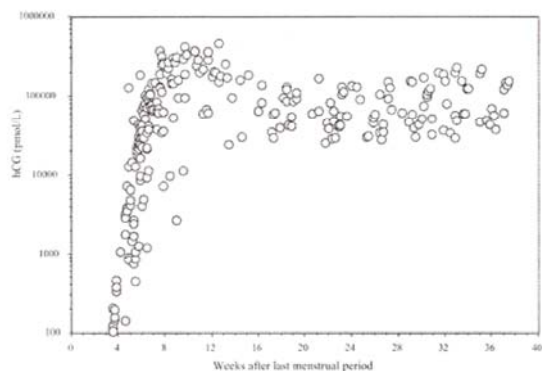
13-16 tednov LMP: 13300-254000 IU/L

17-24 tednov LMP: 4060-165400 IU/L

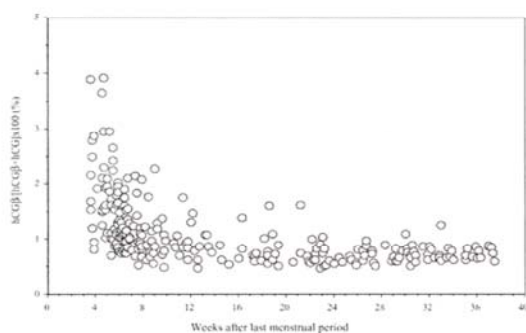
25-40 tednov LMP: 3640-117000 IU/L

Nenoseča ženska < 5,0 IU/L

Te številke so samo merilo, pri vsaki ženski nivo hCG raste drugače. Ni pomembna vrednost, temveč spremembe v vrednostih. (6) (graf 1 in 2)



Graf 1: Prikaz koncentracije hCG v serumu v normalni nosečnosti (1)



Graf 2: Prikaz sorazmerja hCG β (hCG β /hCG β +hCG) med normalno nosečnostjo. Rezultati so osnovani na podlagi 275 vzorcev od 97 žensk. (1)

1.3.11. VREDNOSTI hCG V URINU

Moški: negativen

Nenoseča ženska: negativen

Noseča ženska: pozitiven (6)

Ponavadi se hCG v urinu določa samo kvantitativno. Najmanjša vrednost, ki jo lahko določimo v urinu je od 10 IU/L do 100IU/L odvisno kako je metoda s katero določamo hCG občutljiva.

1.3.12. POVIŠANE VREDNOSTI

- V nosečnosti lahko povišane vrednosti hCG pomenijo: nosečnost z dvojčki ali trojčki, molaro nosečnost, Downov sindrom ali pa nosečnost traja dalj časa kot mislimo.
- Pri moškem ali nenoseči ženski visoka vrednost hCG pomeni tumor (benigen ali malignen), ki se razvije iz jajčnika oz. sperme (tumor jajčnika in tumor mod). Pomeni lahko tudi druge tipe rakov: rak želodca, trebušne slinavke, jeter, pljuč, debelega črevesa ... (3)

1.3.13. ZNIŽANE VREDNOSTI

- Med nosečnostjo znižane vrednosti hCG lahko pomenijo ektopično nosečnost, smrt dojenčka ali pa da nosečnost ni tako daleč, kot mislimo.
- Če se v nosečnosti nivo hCG nenormalno zniža, lahko to pomeni splav. (3)

1.3.14. METODE, S KATERIMI SE LAHKO DOLOČA hCG

1.3.14.1. Kemiluminescenčna metoda

- Kemiluminescenca je šibka svetloba, ki jo lahko opazujemo med oksidacijo organskih materialov.
- Kemiluminescenca je proizvodnja elektromagnetnega valovanja v obliki svetlobe s pomočjo kemijske reakcije.
- Emisija svetlobe je lahko ultravijolična, vidna ali pa infrardeča. (15)

1.3.14.2. RIA test

RIA (radioimunoanaliza) je zelo občutljiva tehnika, ki se uporablja za merjenje koncentracije Ag. Ta metoda zahteva posebno previdnost, ker se uporabljajo radioaktivne snovi.

- Pri RIA testu gre za tekmovanje radioaktivno zaznamovanega Ag in nezaznamovanega Ag za določeno majhno količino močno afinitetnih Pt.

- V vzorec s Pt dodamo toliko označenega Ag, da nasiti vsa vezavna mesta na Pt.
- Nato dodajamo naraščajoče koncentracije Ag.
- Z naraščajočimi koncentracijami neoznačenega Ag bo prišlo do izpodrivanja označenega Ag, ker Pt ne razloči med njima.
- Iz koncentracije nevezanega označenega Ag lahko določimo količino neoznačenega Ag oz. Ag v vzorcu. (16)

1.3.14.3.ELISA test

ELISA (encimsko imunski test) je biokemijska metoda, ki se uporablja v imunologiji za detekcijo protiteles in antigenov v vzorcu. Za določanje protiteles se uporablja indirektna ELISA. Direktna oz. sendvič ELISA pa se uporablja za določanje antigenov.

- Pri direktnem ELISA testu vežemo Pt na trdni nosilec
- Dodamo vzorec z Ag
- Ag, ki reagirajo z vezanim Pt se bodo vezali, ostala se bodo odstranila s splakovanjem
- Nato dodamo z encimom vezano Pt, ki specifično veže primarni Ag iz vzorca
- Speremo ploščo, da odstranimo nevezana Pt
- Dodamo substrat za encim, ki ob reakciji s tem daje obarvan produkt.

Podobno poteka indirektna ELISA. Na nosilec vežemo znan Ag. Dodamo vzorec s preiskovalnimi Pt. Speremo nevezane Pt in dodamo Pt označena z encimom, ki se vežejo na že vezana Pt. Speremo nevezana Pt in dodamo substrat, ki z encimom reagira in da obarvan produkt.(17)

1.4. POCT - ANALIZA OB PACIENTOVI POSTELJI

POCT se nanaša na medicinski test, ki se lahko nese iz centralnega laboratorija. Vključuje enostavne teste, ki jih medicinsko osebje nosi na mesto zdravljenja in teste, ki si jih pacient lahko naredi sam. Ta ideja je bila vpeljana konec 80-ih v ZDA.

POCT, ki vključuje testiranje ob bolnikovi postelji in zraven pacienta, raste med 13 do 17 % na leto.

Vsaka ocena kvalitete testiranja zdravstvenega varstva se vedno osredotoči na tri faktorje:

- osebje,
- uspešnost vodilnih postopkov,
- sposobnost analitičnih inštrumentov. (5)

Sem spadajo, npr. hitri testi, kot so testi za določanje inzulina pri sladkornih bolnikih, ki si jih pacienti delajo sami doma, pH lističi ...

Namen te analize je približati rezultat in metodo pacientu in možnost, da mu v čim krajšem času prinesemo rezultate.

Naše meritve so bile narejene na POCT aparatu, kar pomeni, da lahko aparat nesemo kar do pacienta in pred njim naredimo analizo, če bi bilo nujno potrebno.

Primerjava med navadno analizo in POCT analizo:

- navadna analiza:
 1. pacientu vzamemo kri
 2. kri nesemo v laboratorij
 3. v laboratoriju naredijo analizo
 4. iz laboratorija pošljejo rezultat

- POCT analiza
 1. pacientu vzamemo kri
 2. naredimo analizo
 3. dobimo rezultat

POCT analiza je boljša ker, prihranimo veliko časa kar je včasih zelo pomembno kadar rabimo rezultat nujno.

2. NAMEN DELA

Naš namen je primerjati rezultate določitve horionskega gonadotropina (hCG) iz polne krvi oziroma iz plazme na analizatorju Pathfast. hCG je najpomembnejši parameter za odkrivanje nosečnosti v primerih, ko je potrebno čim hitreje dobiti rezultat. V urgentni ginekološki ambulanti je čas, ki je potreben za analizo, krajši, če analizo opravimo iz polne krvi. Na ta način odpade faza centrifugiranja. Dobljene rezultate iz polne krvi želimo primerjati z rezultati iz plazme.

Najprej pa bomo preverili, kako natančna je ta metoda.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

Vzorci, ki smo jih uporabili za našo analizo, smo dobili v ginekološki ambulanti od pacientk, katerim je ginekolog odredil preiskavo hCG. Od vseh vzorcev smo 100 vzorcev analizirali iz polne krvi in iz plazme ter jih uporabili za izračun korelacije. Ostale vzorce, ki so nam ostali, pa smo uporabili za analizo ponovljivosti v dnevu in med dnevi.

Vse analize smo opravili na POCT analizatorju Pathfast proizvajalca Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc v skladu s Pathfast navodili za uporabo. V času analize so se izvajala potrebna vzdrževalna dela (kalibracije in kontrole kvalitete) in potrebno čiščenje. Za delo na analizatorju smo prav tako uporabili Pathfast reagentni komplet istega proizvajalca, ki je sestavljen iz reagentnih kartuš, kalibratorjev in raztopine za raztapljanje. (Slika 3) (2)



Slika 3: Analizator Pathfast™

Reagentne kartuše imajo 16 vdolbin: 9 je praznih, 7 pa je napoljenih z ustreznimi reagenti. Vse vdolbinice, razen prve in desete, so prekrte z aluminijasto folijo, ki je označena s serijsko številko in imenom analizirane snovi. Med samo analizo se aluminijasta folija preluknja s t. i. enoto za luknjanje, kar omogoča varen prehod konic nastavkov za pipete v reagentne vdolbinice.(slika 4) (2)



Slika 4: Reagentna kartuša

3.1. POSTOPEK ANALIZE

Najprej smo iz analizatorja vzeli stojalo za reagentne kartuše in vanj vstavili ustrezne reagentne kartuše. Pri delu smo se osredotočili samo na en hormon in zato smo uporabili samo reagentne kartuše za analizo hormona hCG.

Nato smo nanesti približno 100 μ L vzorca v vdolbino za vzorec na reagentni kartuši. Polno kri smo nakapljali, plazmo pa odpipetirali v vdolbino na reagentni kartuši. Po potrebi smo vzorec predhodno ročno ali z uporabo vortex mešalnika dobro premešali in s tem zagotovili njegovo homogenost. Stojalo smo vstavili nazaj v analizator, dodali Pathfast nastavke za pipete, zaprli pokrov analizatorja in pritisnili na start gumb. Med samo analizo smo lahko ročno ali s pomočjo ročnega Pathfast čitalnika vnesli bolnikove podatke in vrednosti hematokrita v primeru, da se je analizirala polna kri. (2)

3.2. ANALIZATOR PATHFAST™

Pathfast™ analizni sistem je popolnoma avtomatiziran imunološki analizator. Spada v skupino namiznih POCT analizatorjev. Je majhen, prilagodljiv in enostaven za uporabo z reagentnimi kartušami za enkratno uporabo. Hkrati lahko analizira 6 enakih ali različnih

parametrov in za to porabi 17 minut. Omogoča hitro kvantitativno določitev hormonov v polni krvi, plazmi ali serumu.

S pomočjo senzorjev za prepoznavo vzorca fotometrično razlikuje polno kri od plazme ali seruma. Če zazna polno kri, avtomatsko upošteva vrednost hematokrita v rezultatu. Nastavljena vrednost hematokrita je 40 %.

Ima vgrajeni računalnik in tiskalnik, delo z njim preko ekrana na dotik je enostavno. Vnos podatkov bolnika je poenostavljen s čitalcem kod. Z vmesno ploščo pa lahko podatke prenesemo v LIS (Laboratorijski informacijski sistem) ali po lokalnem omrežju do centralnega laboratorija.

Analizni postopek Pathfast analizatorja temelji na napredni kemiluminescentni tehnologiji (CLEIA chemi-luminescence-enzyme immuno-assay) in patentirani Magtration® tehnologiji.

Celotni postopek je sestavljen iz treh delov: imunoreakcije, ločevanja in detekcije. Najprej Pathfast analizator s pomočjo senzorjev zazna število in vrsto vstavljenih vzorcev ter prebere informacije na vstavljenih reagentnih kartušah.

Imunoreakcija:

Vzorec (polna kri, plazma ali serum) se potegne v nastavek za pipete in se pomeša z alkalno fosfatazo (ALP) konjugirano z anti hCG Mo Pt. Nato se primešajo še magnetni delčki, obdani z drugimi anti hCG Mo Pt. Sledi 5 minutna inkubacija pri 35 oz. 37 °C. hCG, ki ga vsebuje vzorec, se pri tej reakciji veže z Mo Pt in tako nastane imunokompleks po sendvič principu magnetni delček – anti hCG Mo Pt – hCG iz vzorca – anti hCG Mo Pt – ALP.

Ločevanje s pomočjo Magtration tehnologije:

Magtration je registrirano ime proizvajalca Precision System Science in pomeni magnetno filtracijo. Omogoča ločevanje snovi v raztopini brez dodatnega filtriranja in centrifugiranja, tako da ločuje med snovmi, vezanimi na magnetni delček, in prostimi snovmi v raztopini. Magnetni delčki so impregnirani z železom in obdani z anti hCG Mo Pt. Ob aspiraciji celotne raztopine v konico pipete se magnetni delčki, kot zgoraj opisani kompleksi, vežejo na steno nastavka za pipete, če je ob strani nastavljen magnet. Ostale

komponente raztopine, ki niso vezane na magnetne delčke, počasi eluirajo nazaj v vdolbinico za vzorec. Sledi spiranje magnetnih delčkov oz. kompleksov z novimi reagenti. Nato pride do ločevanja magnetnih delčkov iz kompleksa z raztopino z nizko ionsko močjo in segrevanjem na 65 °C. Nazadnje poteka ločevanje prostih, prečiščenih kompleksov Pt-Ag-Pt in prostih magnetnih delčkov.

Encimska reakcija in detekcija:

Zadnja stopnja poteka v detekcijski vdolbinici reagentne kartuše. Na tej stopnji se očiščenim kompleksom Pt-Ag doda kemiluminescenčni substrat CDP-Star®, ki je registrirano ime proizvajalca Applied Biosystems. Substrat (adamantil-1,2-dioksetan fosfat) reagira z ALP, vezano na Pt, kar vodi v odcep fosfata in nastanek metastabilnega intermedata. Intermediat razpade v adamantilni keton in arilni ester. Slednji pri prehodu v osnovno stanje oddaja odvečno energijo v obliki fotona, kar se meri pri 461 nm. Signal se primerja s standardno kalibracijsko krivuljo, s pomočjo katere Pathfast analizator izračuna koncentracijo hCG v vzorcu.

Princip detekcije svetlobe je štetje fotonov s fotopomnoževalko. Sestavni deli fotopomnoževalke so katoda, anoda in dinode.

Postopek je naslednji: 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 ojačanja elektronov, vsak fotoelektron producira nekaj dodatnih elektronov in tako na koncu en foton ustvari 10 elektronov, ki ustvarijo tok. Signali iz fotopomnoževalke se pretvorijo v napetost in ojačajo. Impulzi se ločujejo na ustreznem binarnem nivoju. Samo impulzi z večjo napetostjo od referenčne mejne napetosti se ustrezno oblikujejo in preštejejo. Štetje impulzov oz. fotonov je uporabno pri zelo nizki intenziteti svetlobe. Analizator Pathfast lahko zazna majhne količine vzorca, ker uporablja zelo natančno in ponovljivo metodo štetja fotonov. Ima široko merilno območje zaradi avtomatske poravnave zaslonke na primerno intenziteto svetlobe za fotopomnoževalko. (2)

Karakteristike PATHFAST za hCG so naslednje:

- volumen vzorca: 100 μ L,
- merilno območje: do 500IU/L
- meja detekcije: 0.15 IU/L,
- meja kvantifikacije: 1.35 IU/L,
- referenčni interval: 15 enot, (predstavlja interval (normalnih) vrednosti, ki so bile izmerjene pri zdravih ljudeh)
- območje linearnosti: pod 500 IU/L, (vrednost, višja od mejne vrednosti (cut-off vrednosti) vzorec treba redčiti).

3.3. PRIPRAVA VZORCA

Vzorci venske krvi je odvzela medicinska sestra po postopku odvzema venske krvi.

Polna kri in plazma sta se odvzeli v epruveto z zelenim zamaškom v katerem je antikoagulant heparin.

3.4. OBDELAVA PODATKOV

Vse rezultate, ki smo jih dobili z našimi meritvami smo obdelali v računalniškem programu Excel.

Izračunali smo srednjo vrednost, standardno deviacijo, koeficient variacije in korelacijski koeficient.

Najprej smo izračunali vsoto vseh vrednosti spremenljivk ki smo jih dobili pri naših meritvah.

$$\sum X_i = X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + \dots + X_n$$

Srednja vrednost je najpomembnejši statistični parameter. Srednja vrednost je definirana kot kvocient med vsoto vseh vrednosti spremenljivk (X_i) in številom meritev (n).

$$\bar{X} = \sum X_i / n$$

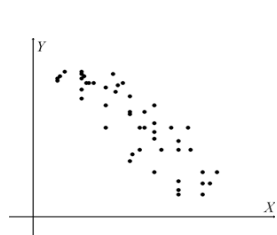
Standardni odklon je statistični kazalec, največkrat uporabljen za merjenje razpršenosti enot. Z njim je moč izmeriti kako razpršene so vrednosti. Definiran je kot kvadratni koren variance. Velik SD kaže na veliko razpršenost v populaciji. Majhen SD pa, nasprotno, predstavlja majhno razpršenost okrog srednje vrednosti.

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

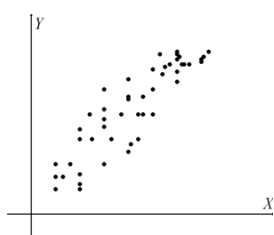
Koeficient variacije je statistični kazalec, ki prikazuje razpršitev statističnih enot okoli srednje vrednosti. Definiran je kot razmerje med standardnim odklonom (S) in srednjo vrednostjo (\bar{x}). Podamo ga v procentih.

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

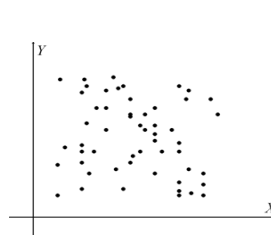
Korelacijski koeficient je mera linearne povezanosti med dvema spremenljivkama. Linearne zato, ker meri zgoščenost razsevnega grafikona okoli premice. Njegova vrednost je vedno med -1 in 1. Čim bližje je korelacijski koeficient -1 in 1, tem bolj zanesljivo lahko iz vrednosti ene spremenljivke napovemo vrednost druge spremenljivke. Če je povezava med spremenljivkama linearna in je korelacijski koeficient blizu 0, nam poznavanje vrednosti ene spremenljivke ne pomaga napovedati vrednosti druge. (grafi 3, 4, 5)



Graf 3: Prikazuje $r=-1$



Graf 4: prikazuje $r=1$



Graf 5: prikazuje $r=0$

Korelacijski koeficient se izračuna po formuli

$$r = \frac{\sum(X_i - \bar{x}) * \sum(Y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(X_i - \bar{x})^2 * \sum(Y_i - \bar{y})^2)}} \quad (5, 11)$$

X_i –posamezna izmerjena vrednost iz polne krvi

\bar{X} - srednja vrednost iz izmerjenih vrednosti polne krvi

Y_i - posamezna izmerjena vrednost iz plazme

\bar{Y} - srednja vrednost iz izmerjenih vrednosti plazme

4. REZULTATI

Najprej smo preverjali, kako natančna je naša metoda. Najprej smo izmerili ponovljivost v dnev, nato pa še ponovljivost med dnevi. Po tem smo izračunali, kakšna je korelacija med rezultati v vzorcih iz polne krvi in vzorcih iz plazme.

Pri vseh meritvah smo iz rezultatov najprej izračunali osnovne statistične parametre: srednjo vrednost, standardni odklon, koeficient variacije, minimum, maksimum.

Minimum je najmanjša vrednost, ki jo izmerimo. *Maksimum* je največja vrednost, ki jo izmerimo. Ostali statistični parametri so opisani v poglavju obdelava podatkov.

4.1. Ponovljivost v dnev

Ponovljivost v dnev pomeni, da preverjamo, kako se razlikujejo rezultati enega vzorca pri več ponovitvah, ki jih naredimo v enem dnev, in kakšna so odstopanja. Če so prevelika, to pomeni, da nekaj ni v redu. (tabela 1)

Tabela 1: Vrednosti, ki smo jih izmerili iz vzorcev plazme in vzorcev polne krvi za preverjanje ponovljivosti v dnev

Plazma-1 hCG (IU/L)	Plazma-2 hCG (IU/L)	Plazma-3 hCG (IU/L)	Polna kri-1 hCG (IU/L)	Polna kri-2 hCG (IU/L)	Polna kri-3 hCG (IU/L)
0.238	293	28.8	21.8	416	33.4
0.249	308	27.7	21.9	389	31.3
0.356	315	29.4	21	407	30.4
0.180	308	29.7	20.2	366	30.3
0.203	316	27.8	22.6	433	30.9

0.289	333	28.2	21.8	427	32.3
0.241	317	28.1	22.2	407	29.9
0.289	317	27.7	21.3	436	30.9
0.254	321	29	20.7	404	33.5
0.274	305	28	20.8	399	33.1
0.238	298	29.6	21.3	427	31
0.486	319	28.2	21.3	391	30.8
0.326	307	27.8	22.3	389	30.3
0.538	303	27.3	22.2	419	34.4
0.37	288	27.1	20.9	406	33.9

4.2. Ponovljivost med dnevi

Ponovljivost med dnevi pomeni, da preverjamo, kako se rezultati vzorca razlikujejo med sabo v različnih dneh. Primerjali smo tri različne vzorce v obdobju desetih dni. Vsak dan smo naredili štiri ponovitve. Za vzorce smo uporabili kontrolni material, ki ima enake karakteristike kot plazma. Tako smo preverili nizke, srednje in visoke vrednosti (tabela 2)

Tabela 2: Vrednosti, ki smo jih izmerili iz kontrolnih vzorcev za preverjanje ponovljivosti med dnevi

Dad	Datum	QC1 (IU/L)		QC2 (IU/L)		QC3 (IU/L)	
1	23.01.2010	17.5	17.3	63.4	63.0	261	282
	23.01.2010	19.1	18.7	64.3	66.5	277	272
2	24.01.2010	18.0	19.6	64.4	66.1	278	288
	24.01.2010	17.6	17.5	63.5	64.7	275	283
3	25.01.2010	18.3	19.3	69.2	63.8	303	283
	25.01.2010	18.0	18.8	63.9	66.2	263	271
4	28.01.2010	15.6	16.8	65.2	63.1	269	265
	28.01.2010	17.3	19.1	69.7	63.6	303	276
5	29.01.2010	18.2	17.8	69.3	66.4	280	265
	29.01.2010	19.0	17.9	76.2	59.8	294	272
6	30.01.2010	18.2	17.7	65.6	64.9	298	293
	30.01.2010	17.9	17.8	66.2	63.9	267	272
7	31.01.2010	17.2	17.9	65.2	65.4	275	282
	31.01.2010	16.8	18.9	66.5	64.9	293	282
8	01.02.2010	16.6	17.1	66.4	62.4	293	284
	01.02.2010	19.6	19.4	66.2	64.8	281	281
9	06.02.2010	17.4	18.9	64.8	62.4	280	283
	06.02.2010	18.5	17.3	64.7	67.3	274	257
10	07.02.2010	16.0	17.1	59.3	60.8	264	249
	07.02.2010	18.4	17.3	70.1	70.9	294	287

QC – quality control (kontrola kvalitete)

4.3. Analitična občutljivost

Analitična občutljivost oz. meja detekcije je najmanjša izmerjena vsebnost, iz katere je možno zaključiti prisotnost analita z zadostno statistično gotovostjo.

Analitična občutljivost se lahko izračuna z uporabo različnih pristopov. En način je, da se izvede določitev slepih vzorcev na najmanj 20 reprezentativnih slepih vzorcih. Analitična občutljivost je izračunana kot navidezna vsebnost, ki ustreza vsebnosti srednje vrednosti plus trikratna deviacija za slepa določanja. (tabela 3)

Tabela 3: Vrednosti slepih vzorcev, ki smo jih izmerili za določitev analitične občutljivosti.

Slepe (CAL-1) vrednosti (IU/L)				
0.081	0.014	0.097	0.001	0.044
0.025	0.047	0.073	0.053	0.023
0.047	0	0.254	0.066	0.167
0.143	0.04	0.057	0	0.005

4.4 . Funkcionalna občutljivost

Tukaj merimo, kakšno je sipanje materialov oz. s kakšno napako delamo.

Funkcionalno občutljivost smo preverili tako, da smo štiri Pool vzorce preverjali štiri dni. Vsak dan smo naredili pet meritev. Pool vzorec je vzorec sestavljen iz več različnih vzorcev plazme združenih skupaj. Tako lahko pripravimo vzorec z nizkimi, srednjimi in visokimi vrednostmi (tabela 4)

Tabela 4: Vrednosti, ki smo jih izmerili iz pool vzorcev plazme za določanje funkcionalne občutljivosti.

Dan	Datum	Pool 1 hCG IU/L	Pool 2 hCG IU/L	Pool 3 hCG IU/L	Pool 4 hCG IU/L
1	15.02.2010	0.308	1.17	2.79	4.16
		0.266	1.12	3.28	4.33
		0.319	1.01	3.20	3.71
		0.371	1.31	2.80	3.77
		0.557	1.20	2.53	3.99
2	18.02.2010	0.479	1.79	2.62	4.09
		0.275	1.87	3.00	4.08
		0.312	1.76	2.50	3.87
		0.498	1.58	2.28	3.58
		0.311	1.33	2.67	3.53
3	19.02.2010	0.743	1.22	1.74	2.81
		0.915	1.04	2.28	2.90
		0.637	1.04	1.96	2.77
		0.426	1.01	1.96	3.04
		0.375	1.05	2.31	2.96
4	20.02.2010	0.312	0.96	2.35	3.67
		0.354	1.04	2.54	3.41
		0.363	1.02	2.44	3.70
		0.270	1.09	2.14	3.28
		0.325	1.08	2.06	2.97

4.5. Korelacija med polno krvjo in plazmo

Korelacijski koeficient je mera linearne povezanosti med dvema spremenljivkama. V prvi vrsti korelacijski koeficient računamo zato, da vidimo, ali je med znakoma sploh kakšna korelacija, ki ni samo slučajne narave. Drugič pa zato, da ugotovimo stopnjo povezanosti, ko domnevamo, da zveza obstoji.

Koeficient korelacije je zmeraj relativen glede na situacijo, v kateri je dobljen, in njegova velikost ne predstavlja nekega absolutnega dejstva. Zmeraj moramo vedeti, kaj merimo, v kakšnih okoliščinah, v kakšni populaciji in s kakšnimi inštrumenti. Ker je koeficient korelacije odvisen od teh okoliščin, ga moramo tudi interpretirati z vidika teh okoliščin.

(5) (tabela 5)

Izmerili smo 100 vzorcev plazme in 100 vzorcev polne krvi ter primerjali, kako se rezultati ujemajo.

Tabela 5: Vrednosti, ki smo jih izmerili iz plazme in polne krvi za izračun korelacijskega koeficienta

PATHFAST HCG (IU/L)					
Vzorec	Heparin Polna kri (IU/L)	Heparin Plazma (IU/L)	Vzorec	Heparin Polna kri (IU/L)	Heparin Plazma (IU/L)
1	281	289	51	17.5	17.6
2	301	291	52	45.1	34.2
3	224	228	53	57.1	58
4	140	148	54	70	71.7
5	171	159	55	94.4	91
6	363	376	56	78.2	78.3
7	146	151	57	87.5	99.6
8	310	287	58	122	120
9	>500	>500	59	154	171
10	>500	>500	60	150	153
11	>500	>500	61	182	175
12	>500	>500	62	206	191
13	204	207	63	127	131
14	115	314	64	189	183
15	299	295	65	190	206
16	291	275	66	387	378
17	347	353	67	347	392
18	400	387	68	363	354
19	281	279	69	67.4	64.5
20	453	>500	70	131	125
21	94.4	97.5	71	78.3	66.5
22	127	126	72	123	101
23	175	158	73	173	146
24	178	175	74	171	156
25	225	216	75	27.5	27
26	370	336	76	36.1	39.6
27	354	334	77	52.5	55.5
28	219	252	78	84.7	90.9
29	210	222	79	113	122
30	162	157	80	154	150
31	73,8	80	81	223	241
32	69.5	74.6	82	302	330
33	124	131	83	366	414
34	210	210	84	486	>500
35	307	266	85	>500	>500

36	416	427	86	404	446
37	>500	478	87	60.8	50.3
38	>500	>500	88	76.7	77.1
39	30.3	29.2	89	124	98.4
40	59.1	57.1	90	128	107
41	121	128	91	138	132
42	220	207	92	219	212
43	299	302	93	267	281
44	332	327	94	252	237
45	71	72,9	95	396	408
46	134	143	96	480	459
47	388	342	97	397	386
48	374	357	98	412	>500
49	48.6	46.3	99	>500	>500
50	185	187	100	434	>500

5. RAZPRAVA

5.1. Ponovljivost v dnevu

Tukaj smo primerjali, kako se različni vzorci ujemajo v dnevu, kako se torej trije različni vzorci, ki smo jih naredili v enem dnevu večkrat na dan, ujemajo med sabo.

Ugotovili smo, da je pri manjših vrednostih koeficient variacije večji kot pri večjih vrednostih. To pomeni, da so pri manjših vrednostih večja odstopanja med vzorci, vendar še vedno v mejah dovoljenega . Pri večjih vrednostih pa je koeficient variacije manjši, kar pomeni, da ni takšnih odstopanj med vrednostmi.

Pri polni krvi pa so bili vsi koeficienti približno enaki.(tabela 6)

Tabela 6: Rezultati, ki smo jih izračunali iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri ponovljivosti v dnevnu

	Plazma-1	Plazma-2	Plazma-3	Polna kri-1	Polna kri-2	Polna kri-3
MIN (IU/L)	0.180	288	27.1	20.2	366	29.9
MAX (IU/L)	0.486	333	29.7	22.6	436	34.4
SR. VR. (IU/L)	0.302	309.9	28.3	21.5	407.7	31.8
SD (IU/L)	0.097	11.25	0.8	0.7	18.6	1.5
KV%	32.1%	3.6%	2.8%	3.2%	4.5%	4.7%
N	15	15	15	15	15	15

5.2. Ponovljivost med dnevi

Tukaj smo primerjali tri vzorce v obdobju desetih dni. Vsak dan smo naredili štiri meritve, da bi bili rezultati natančnejši.

S tem smo se želeli prepričati, kakšna so odstopanja vzorcev med različnimi dnevi. Ker vsak dan v laboratoriju niso isti pogoji, lahko pride do interferenc. S to primerjavo smo se želeli izogniti takšnim napakam.

Ugotovili smo, da so vsi trije vzorci imeli približno enak koeficient variacije. Pri vseh treh je bil majhen, kar pomeni, da se vrednosti med različnimi dnevi bistveno ne razlikujejo in ni nobenih motenj, ki bi lahko spremenile rezultat . (tabela 7)

Tabela 7: Rezultati, ki smo jih izračunali iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri ponovljivosti med dnevi

	QC1	QC2	QC3
MIN (IU/L)	15.6	59.3	249
MAX (IU/L)	19.6	76.2	303
SR. VR. (IU/L)	17.9	65.4	278.7
SD (IU/L)	0.94	3.04	12.2
KV (%)	5.2 %	4.6 %	4.4 %
N	40	40	40

5.3. Analitična občutljivost

Standardni odklon, ki smo ga izračunali je 0.062 IU/L

Analitična občutljivost na našem analizatorju je 0.15 IU/L, kar pomeni, da je 0.15 IU/L najmanjša vrednost hCG, ki jo lahko izmerimo na tem analizatorju. Če ima kakšen vzorec vrednost, manjšo kot je 0.15 IU/L, je na tem analizatorju ne zaznamo.

5.4. Funkcionalna občutljivost

Funkcionalna občutljivost Pathfast hCG je 1.35 IU/L, kar pomeni, da je pri tej vrednosti 20% sipanje oziroma pri vrednosti 1.35 IU/L imamo 20% napako, kar je mejna vrednost. Rezultati, ki imajo napako, večjo od 20 % oz. je koeficient variacije več kot 20% se ne upoštevajo, ker je napaka večja kot je mejna vrednost .

Pri določanju hCG se upošteva večja napaka, ker so velike razlike med vrednostmi. Če dobimo rezultat, npr. 1 ali pa 5, ni razlike, ker vrednosti pri nosečnosti pridejo tudi do 100000.

Primerjali smo štiri vzorce v obdobju štirih dni in vsak dan smo naredili pet ponovitev. Prvi vzorec je vseboval zelo majhne vrednosti (pod ena) in tukaj je bila napaka oz koeficient variacije 40%. Pri drugem vzorcu je bila 23% napaka, pri tretjem 16%, pri četrtem pa 13%. Torej: višje so vrednosti, ki jih merimo, manjša je napaka, ki jo naredimo. (tabela 8)

Tabela 8: Izračunani rezultati iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri funkcionalni občutljivosti

	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
MIN (IU/L)	0.266	0.96	1.74	2.77
MAX (IU/L)	0.915	1.87	3.28	4.33
SR.VR. (IU/L)	0.421	1.235	2.464	3.531
SD (IU/L)	0.173	0.286	0.395	0.490
KV %	41.20	23.17	16.04	13.89
N	20	20	20	20

5.5. Korelacija

Naša naloga je bila primerjati vrednosti hCG v polni krvi in plazmi. Vzeli smo 100 vzorcev polne krvi in 100 vzorcev plazme. Ko smo naredili meritve, smo morali od teh 100 vzorcev izvzeti 12 vzorcev, ker so bile vrednosti prevelike in bi jih bilo treba redčiti, da bi dobili prave vrednosti. Tako smo za izračun korelacije vzeli samo 88 vzorcev.

Najprej smo izračunali osnovne statistične parametre, kot so srednja vrednost, mediana, minimum, maksimum, območje. S temi parametri smo dobili vpogled v rezultate, ki smo jih dobili, in kakšen bo korelacijski koeficient. (tabela 9)

Tabela 9: Vrednosti, ki smo jih izračunali iz vrednosti, ki smo jih izmerili pri korelaciji

	Metoda X: PATHFAST hCG Polna kri	Metoda Y: PATHFAST hCG Plazma
MIN (IU/L)	17.5	17.7
MAX (IU/L)	480	459
SR.VR (IU/L)	197,3	198
MEDIANA (IU/L)	219	212
OBMOČJE (IU/L)	17-480	17-460
N	88	88

Korelacijski koeficient naših vzorcev je 0.97, kar pomeni, da je naša korelacija zelo visoka. To pomeni, da lahko meritve, ki jih naredimo iz polne krvi, upoštevamo, kot da bi bile narejene iz plazme. To nam prihrani veliko časa, saj nam ni treba čakati, da dobimo plazmo.

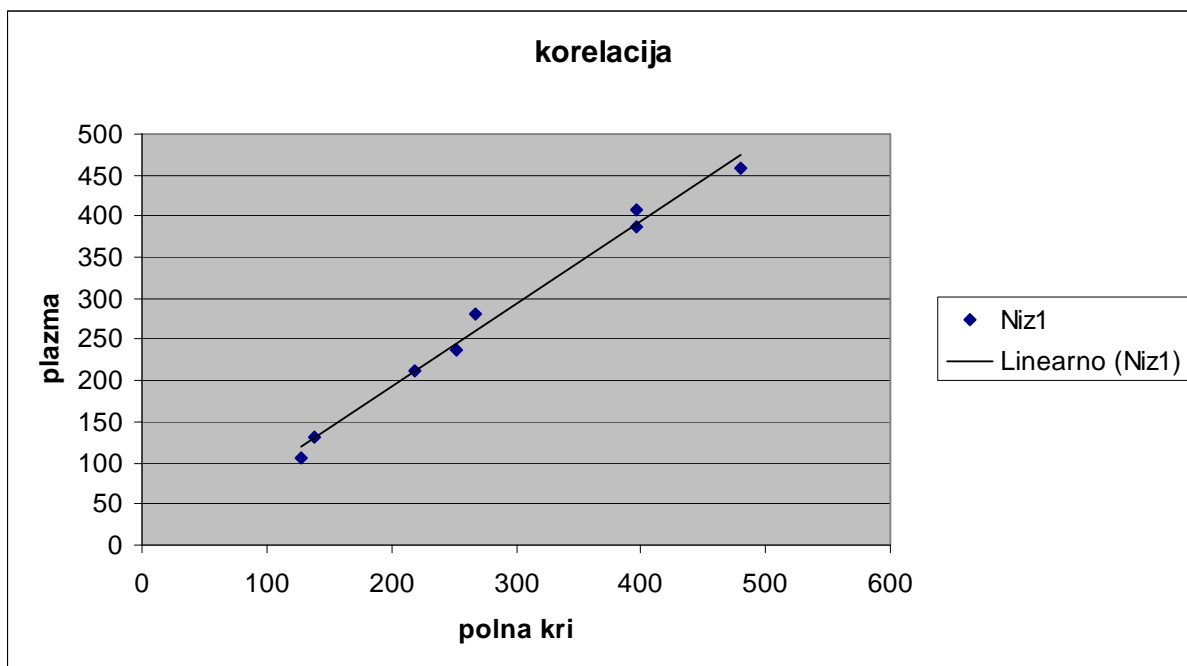
Na koncu smo še izračunali premico linearne regresije.

Premica linearne regresije, ki smo jo izračunali po formuli $Y=a+bX$, je:

$$Y \text{ (IU/L)}=6.62+0,98*X \text{ (IU/L)}$$

Y predstavlja plazmo.

X predstavlja polno kri.



Graf 4: Grafičen prikaz naših rezultatov

Graf prikazuje, kako se ujemajo vrednosti polne krvi ter vrednosti plazme, ki smo jih izmerili na aparatu PathFast. (graf 4)

Premica linearne regresije pa lepo pokaže, da so majhna odstopanja med vrednostmi v vzorcih, ter da je korelacija odlična.

6. SKLEP

Primerjali smo vrednosti hCG iz plazme z vrednostmi iz polne krvi, ki smo jih izmerili na POC analizatorju PATHFAST®. Sklepi naše naloge so:

- Vrednosti, ki smo jih dobili, nam pokažejo, da lahko plazmo zamenjamo s polno krvjo pri določanju hCG, saj so vrednosti v mejah dovoljenega. To pomeni, da nam ni treba čakati na rezultate, ker vzorca ni treba nesti v laboratorij. Ni ga treba predhodno obdelati (centrifugirati), ampak ga lahko pregledamo kar na kraju odvzema. To je v primerih, ko rezultat potrebujemo takoj, zelo pomembno.
- Ponovljivost v dnevju in med dnevi, ki smo jo računali je zelo dobra, ker so koeficienti variacije nizki. Koeficient variacije v dnevju je bil pri plazmi okrog 3%, pri polni krvi pa je bil okrog 4%. Koeficient variacije med dnevi pa je bil okrog 4.5%.
- Korelacija, ki smo jo izračunali, je 0.97, kar je zelo dobro.

LITERATURA

1. Ulf-Hakan Stenman, Aila Tiitinen, Henrik Alfthan, Leena Valmu: *The classification, functions and clinical use of different isoforms of hCG*, članek
2. Vukan, Valerija: *Določanje troponina v urgentni ambulanti pri bolnikih s sumom na akutni koronarni sindrom*. Diplomaska naloga.
3. www.webmd.com/baby/human-chorionic-gonadotropin-hcg
4. www.americanpregnancy.org/duringpregnancy/hcglevel.html
5. Brvar, Bogomil: *Statistika*. Ljubljana, 2007, 257-275.
6. www.zdravstvena.info/vsznj7ogljikovi-hidrati-hormoni-hem-zlatenica-ultrazvok/
7. www.springerlink.com/content/xdgw09d85rmhnd2y/
8. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12451672
9. www.en.wikipedija.org/wiki/Humani_chorionic_gonadotropin
10. www.grega-hocevar.com/zdravje/hormoni.htm
11. Šeligo, Rudi: *Opisna statistika*. Skripta. Kranj, 1989, 90-112.
12. www.bambino.si/molarna_nosecnost_mehurcasta_snet
13. www.zbirka.si/zunajmaternicna-nosecnost/
14. www.babycenter.com.au/pregnancy/atenatalhealth/testsandcare/screeningfordo-wns/
15. www.lumigen.com/detection_tehnologies/chemiluminescence/
16. <http://en.wikipedija.org/wiki/Radioimunoassay>
17. <http://sl.wikipedija.org/wiki/ELISA>
18. <http://sysdoc.doors.ch/MITSUBISHI/PATHFAST-brochure.pdf>.
19. <http://www.zbirka.si/hormon/>
20. http://www.farma-drustvo.si/gradivo_p/Farmaceutska%20kemija%20II/PREDAVANJA/16-Hormoni%20hipotalamusa%20in%20hipofize.pdf
21. http://www.chronolab.info/index.php?option=com_analiza&Itemid=64&task=analiza_1
22. <http://lysozyme.co.uk/lysozyme-anti-hiv.php>
23. http://users.unimi.it/cirme/public/UploadAttach/7_Sturgeon.pdf

