

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Diagnóstico da gravidez ectópica usando o teorema de Bayes: estudo de coorte
retrospectivo**

Aluno: Carlos Alberto Link

Porto Alegre, 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Diagnóstico da gravidez ectópica usando o teorema de Bayes: estudo de coorte retrospectivo

Aluno: Carlos Alberto Link

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Francalacci Savaris

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2022

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Link, Carlos Alberto
Diagnóstico da gravidez ectópica usando o teorema
de Bayes: estudo de coorte retrospectivo / Carlos
Alberto Link. -- 2022.
96 f.
Orientador: Ricardo Francalacci Savaris.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. gravidez ectópica. 2. ultrassonografia. 3.
diagnóstico. 4. precisão dos dados. 5. beta-hCG. I.
Francalacci Savaris, Ricardo, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço,

À minha família, especialmente à minha esposa, Renata Amaro, pela paciência e estímulo dispensado para a conclusão desta tarefa.

A Jackson Maissiat, que iniciou os primórdios deste estudo levantando dados como aluno de iniciação científica - agora já médico - meu muito obrigado pelo grande empenho e dedicação na verificação do banco de dados.

Ao Prof. Dr. Ben Mol, cuja tese de Doutorado em 1998 foi inspiração para este projeto.

Ao Prof. Dr. Kurt Barnhart, cuja vida tem sido dedicada à pesquisa sobre gravidez ectópica, pelo auxílio na forma de expor os dados.

Ao Prof. Mário Wagner, pela revisão e esclarecimentos de epidemiologia.

Ao Prof. Dr. Ricardo Francalacci Savaris, por me proporcionar essa grande oportunidade de conviver com a vida acadêmica. Por me ajudar e orientar de forma tão extraordinária, não medindo esforços para o bom desempenho deste projeto de mestrado, que agora está sendo concluído. Um grande amigo, incentivador, facilitador na busca das soluções para os obstáculos e adversidades durante a jornada. O professor Savaris foi encorajador desde a primeira hora, com zelo e dedicação, foi decisivo para realização deste estudo. A ele, meu profundo reconhecimento e agradecimento.

Por fim, meu reconhecimento às pacientes, essenciais ao estudo, sem as quais nada poderia ser feito. Esperamos retribuir a todas através de uma medicina mais humana, mais segura, baseada em evidências.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	7
Lista de Tabelas	8
Lista de Figuras	9
Resumo e palavras-chave	10
Abstract e Keywords	12
1. Introdução	14
1. 1 Aspectos históricos	15
1.1.1 História da laparoscopia e seu uso na Gravidez ectópica	17
1. 2. Epidemiologia	17
1. 2.1. Localização das gestações ectópicas	18
1. 3. Etiologia	18
1.3.1 Transporte embrião-tubário	19
1.3.1.1 Contratilidade do músculo liso da tuba uterina e movimentos ciliares	19
1.3.1.2 Óxido nítrico e óxido nítrico sintetase	19
1.3.1.3 Células Intersticiais de Cajal	20
1.3.1.4 Procinéticos	20
1.3.1.5 Endocanabinóides	20
1.3.2 Ambiente tubário	21
1.3.2.1 Receptores hormonais	21
1.3.2.2 Interleucinas	21
1.3.2.3 Fator Inibidor de Leucemia	21
1.3.2.4 Proteína Homeobox A10	22
1.3.2.5 Integrinas	22
1.3.2.6 Mucina 1	22
1.3.2.7 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	23
1.3.2.8 Trofinina	24
1.3.2.9 Ativina	24
1.3.2.10 Elafina	24
1.4. Fatores de Risco	25
1.4.1 Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae	26
1.4.2 Tabagismo	27
1.4.3 Fertilização in vitro	27
1.4.4 Gravidez Ectópica Prévia	28
1.4.5 Infertilidade	28
1.4.6 Cirurgia Tubária Prévia	29
1.5. Sinais e Sintomas	31
1.6. Exames Auxiliares	32
1.6.1 Hormônio da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)	32

1.6.1.1 Dosagem do hCG sérico	34
1.6.2 Hormônio da Gonadotrofina Coriônica e Zona Discriminatória	35
1.6.3 Variação do Hormônio da Gonadotrofina Coriônica em Gestações Normais e Anormais	36
1.6.4 Ultrassonografia Transvaginal	37
1.6.4.1 Achados patognomônicos	38
1.6.4.2 Achados suspeitos de gravidez ectópica	39
1.6.4.1 Desempenho da ultrassonografia no diagnóstico da GE	40
1.7 Sequências de exames para o diagnóstico de gravidez ectópica	41
1.8. Teorema de Bayes	42
2. Justificativa	43
3. Hipóteses	43
Hipótese nula (H0)	43
Hipótese alternativa (H1)	43
4. Objetivo	43
4.1 Principal	43
4.2 Secundário	44
5. Referências	45
6. Artigo em Inglês	53

Lista de abreviaturas

FSH hormônio folículo-estimulante

GE Gravidez ectópica

hCG gonadotrofina coriônica humana

HOXA10 Homeobox Protein A10

IL-1 Interleucina-1

IUP Gravidez Intrauterina

LIF *Leukemia Inhibitory Factor*

MUC1 Mucina 1

NO óxido nítrico

PUL Gravidez em local indeterminado

UEG Unidade de Emergência Ginecológica

USTV Ultrassonografia transvaginal

VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Lista de Tabelas

Tabela 1 . Freqüência da gravidez ectópica de acordo com a localização.....	18
Tabela 2. Fatores de risco para gravidez ectópica.....	26
Tabela 3. Risco de gravidez ectópica de acordo com o tipo de cirurgia no anexo uterino.....	29
Tabela 4. Desempenho dos achados ultrassonográficos para o diagnóstico de Gravidez ectópica.....	41

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura dimérica do HCG regular. O desenho é de acordo com a estrutura da cristalografia de Raio-X em 3D e a publicação da sequência de aminoácidos e com as cadeias laterais de oligossacarídeos com a ligação O- e N-. A subunidade alfa está demonstrada em cinza e a beta em preto.....33

Figura 2. Exemplo de limitações de ensaios que detectam diferentes formas de hCG. O hCG total foi dosado no sangue semanalmente após aborto espontâneo.....35

Figura 3. Exemplos de imagens ultrassonográficas de gestações intrauterinas iniciais. A: saco gestacional inicial localizado em posição excêntrica na decídua. B: sinal do duplo halo. C: saco gestacional com vesícula vitelina D: polo fetal visto adjacente da vesícula vitelina.....38

Figura 4. Exemplos de imagens ultrassonográficas de massa anexial (seta).....40

Resumo e palavras-chave

Objetivo: Verificar a acurácia de um algoritmo online usando o teorema de Bayes para o diagnóstico de gravidez ectópica (GE) com hCG, ultrassonografia e dados clínicos em uma coorte real.

Desenho: Um estudo de coorte retrospectivo.

Local: Unidade de Emergência Ginecológica (UEG) em um hospital universitário terciário.

Pacientes: Gestantes de primeiro trimestre que compareceram a UEG por qualquer motivo. Aquelas que tiveram <13 semanas de gestação e seguiram os critérios: a) gravidez confirmada por teste positivo recente; b) imagem digital/relatório eletrônico de ultrassonografia transvaginal (USTV) do banco de dados do hospital; c) acompanhamentos com laudo anatomopatológico ou resolução clínica de uma gravidez confirmada, foram incluídos no estudo. Os sinais e sintomas clínicos, a presença de fatores de risco para gravidez ectópica, os achados da USTV em cada consulta e os níveis de hCG foram variáveis independentes obtidas de prontuários eletrônicos. A partir desses dados, a probabilidade pré-teste, baseada na apresentação clínica e fatores de risco, e a razão de verossimilhança (LR) de cada variável foram calculadas para uso no algoritmo, gerando uma probabilidade pós-teste (PTP).

Intervenção: nenhuma

Principal medida de resultado: a acurácia do algoritmo online para identificar casos de gravidez ectópica usando sinais e sintomas clínicos, a presença de fatores de risco para gravidez ectópica, os achados de USTV em cada consulta e os níveis de hCG. A

gravidez ectópica foi o desfecho principal, confirmado pelo laudo anatomopatológico, ou pela presença de batimentos cardíacos fetais ou saco gestacional fora da cavidade uterina.

Resultados: Entre 1º de janeiro de 2009 e 27 de dezembro de 2016, 2.495 pacientes foram analisadas e o algoritmo foi aplicado em 2.185 pacientes. A incidência de gravidez ectópica foi de 8,5% (212/2495; IC 95%=7,4% a 9,6%); 310 pacientes foram excluídas por terem sido submetidas à cirurgia com limiares de decisão <95%. O algoritmo foi aplicado em 2.185 pacientes. Apenas um caso permaneceu inconclusivo após 3 consultas, sendo considerado um erro de previsão. Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia (IC 95%) do algoritmo foram de 98,9% (96,1% a 99,8%), 98,9% (98,3% a 99,2%) e 98,9% (98,3% a 99,2%), respectivamente.

Conclusão: A acurácia do algoritmo é de 98,9% (IC95%=98,4% a 99,3%), utilizando um único centro – UEG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Financiamento do estudo/interesse(s) concorrente(s): Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), Bolsa 17-0224. Todos os autores declararam não ter conflito de interesses, exceto Ben W. Mol (BWM). BWM recebeu aporte financeiro para pesquisa, não relacionado a este estudo, da Ferring Pharmaceuticals e da Merck KGaA

Palavras-chave: gravidez ectópica, ultrassonografia, diagnóstico, precisão de dados, hCG-beta, Teorema de Bayes.

Abstract e Keywords

Objective: To verify the accuracy of an online algorithm using Bayes' theorem for diagnosing ectopic pregnancy (EP) having hCG, ultrasound, and clinical data in a real cohort.

Design: A retrospective cohort study.

Setting: Gynecologic Emergency Unit (GEU) in a tertiary teaching hospital

Patients: First-trimester pregnant women who attended the GEU for any reason. Those that had <13 weeks of pregnancy, a) confirmed by a recent positive pregnancy test, b) a digital image/electronic report of transvaginal ultrasound (TVUS) from hospital database, and c) a follow-up with a pathology report or a clinical resolution of a confirmed pregnancy were included in the study. Clinical signs and symptoms, the presence of risk factors for ectopic pregnancy, the TVUS findings in each consultation, and the hCG levels were independent variables obtained from electronic medical records. From these data, the pre-test probability, based on clinical presentation and risk factors, and the likelihood ratio (LR) for each variable were calculated for their use in the algorithm, yielding a post-test probability (PTP).

Intervention: none

Main Outcome measure: the accuracy of the online algorithm to identify cases of ectopic pregnancy using clinical signs and symptoms, the presence of risk factors for ectopic pregnancy, the TVUS findings in each consultation, and the hCG levels. Ectopic pregnancy was the main outcome, confirmed either by pathology report, or by the presence of fetal heartbeat or gestational sac outside the uterine cavity.

Results: Between January 1, 2009, and December 27, 2016, 2495 patients were analysed, and the algorithm was applied to 2185 patients. The incidence of ectopic pregnancy was 8.5% (212/2495;95%CI=7.4% to 9.6%); 310 patients were excluded because they were submitted to surgery with decision thresholds <95%. The algorithm was applied in 2185 patients. Just one case remained inconclusive after 3 consultations, and it was considered as an error in prediction. The sensitivity, specificity, and accuracy values (95%CI) of the algorithm were 98.9% (96.1% to 99.8%), 98.9% (98.3% to 99.2%), and 98.9% (98.3% to 99.2%), respectively.

Conclusion: The accuracy of the algorithm is 98.9% (95%CI=98.4% to 99.3%), using a single center.

Study funding/competing interest(s): This study was funded by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Grant 17-0224. All authors have no competing interests, except for Ben W. Mol(BWM). BWM received financial research funding, not related to this study, from Ferring and Merck KGaA.

Key words: ectopic pregnancy, ultrasonography, diagnosis, data accuracy, hCG-beta, Bayes Theorem

1. Introdução

A Gravidez Ectópica (GE), ou extrauterina, é definida quando o embrião se implanta fora da cavidade endometrial. A maior incidência se dá na trompa de falópio, podendo também ocorrer no ovário, intestino ou mesmo aderir a uma cicatriz uterina (1).

O método atual para o diagnóstico de GE é baseado nos níveis séricos de hCG e achados ecográficos, obtidos principalmente pela ultrassonografia transvaginal (USTV) - ferramenta diagnóstica de escolha para gravidez tubária (2).

É possível que as decisões clínicas possam ser aprovadas com uma abordagem objetiva. Um exemplo é o uso do teorema de Bayes (3). Este teorema descreve a probabilidade de um evento, com base no conhecimento prévio das condições que possam estar relacionadas a ele. Isso significa que o teorema nos dá a probabilidade de termos uma condição, uma vez sendo o teste positivo. Para calcular essa probabilidade, a prevalência da condição, juntamente com a sensibilidade e especificidade do teste, são consideradas na fórmula. A sensibilidade e especificidade do teste podem ser traduzidas na razão de verossimilhança. O resultado produzirá uma probabilidade pós-teste. Com essa probabilidade pós-teste, uma decisão clínica será tomada.

Nos casos com hipótese de gravidez ectópica, os principais exames são a ultrassonografia transvaginal (USTV) e a dosagem sérica de hCG. Enquanto a razão de verossimilhança para achados de USTV e limiares de hCG devam ser calculados em cada centro, devido às características locais, a variabilidade do hCG entre as consultas lida com proporções e pode ter validade externa. Por exemplo, uma redução de hCG após dois dias entre 1% e 35% tem uma razão de verossimilhança de 16,6 (4,5),

enquanto uma redução de mais de 50% diminui a razão de probabilidade para próximo de zero (4).

Raramente os números gerados na probabilidade pós-teste, derivados do teorema de Bayes, são utilizados na prática clínica, pois implicam em vários cálculos não usados em sequência. A maior parte da literatura apresenta desempenho isolado de testes diagnósticos. Por essas razões, uma calculadora online, seguindo o nomograma de Fagan, que integra o teorema de Bayes (6) pode facilitar esses cálculos.

O objetivo deste estudo é verificar o desempenho de um algoritmo online para o diagnóstico de gravidez ectópica. Esta calculadora irá considerar o risco de GE com base em dados clínicos, a razão da verossimilhança dos achados de USTV e os níveis de hCG (para a zona discriminatória) de uma população em uma Unidade de Emergência Ginecológica no sul do Brasil.

A presente dissertação irá revisar os aspectos históricos, epidemiológicos, etiológicos e os fatores de risco da gravidez ectópica. Além disso, será feita uma revisão da literatura sobre o desempenho da zona discriminatória do hCG, da ultrassonografia e das diferentes sequências para se fazer o diagnóstico da gravidez ectópica com a utilização do teorema de Bayes.

1.1 Aspectos históricos

A gravidez ectópica (GE) foi reconhecida pela primeira vez pelo médico árabe Abulcasis (936-1013); no relato, a paciente apresentou uma distensão abdominal que supurou, eliminando partes fetais através da parede abdominal (7,8).

As primeiras tentativas que se assemelharam a uma cirurgia de gravidez ectópica foram realizadas por Jacob Noierus em 1591 e 1596; os procedimentos consistiam simplesmente em fazer uma incisão abdominal e extrair os fetos (9).

Em 1604, o parisiense Jean Riolan fez o primeiro relato de uma ruptura autêntica de gravidez tubária: a paciente estava no quarto mês da sua oitava gestação e veio a falecer no dia seguinte do início dos sintomas (10).

Em 1682, Saint Maurice de Perigod relatou um caso de gravidez ectópica ovariana na necropsia (10).

Em 1693, o parisiense Bussière relatou o primeiro caso de GE não rota. A gravidez ectópica foi diagnosticada em necropsia de uma mulher jovem que havia sido executada (9).

Em 1818, na Carolina do Sul, John King descreve em detalhes um caso de gravidez ectópica a termo, com extração feita através de uma incisão com bisturi no fundo da vagina, sendo o feto extraído a fórceps. Em quatro semanas a paciente estava recuperada do procedimento (11).

O primeiro relato de tratamento com sucesso de GE tubária com salpingectomia, de 5 casos, foi descrito por Robert Lawson Tait em 1884 (12). Quatro anos depois, Tait apresentou um estudo mais aprofundado com 42 casos (13).

Entre 1908 e 1920, a mortalidade por gravidez ectópica era de 12.3%. No final de 1947, chegou a 2,7% (14,15).

No final dos anos 50, o diagnóstico de ectópica era baseado na eterna vigilância de que dor em quadrantes inferiores, em mulheres entre 15 e 50 anos, significava GE. Os testes

de gravidez na época, utilizando sapos (*Rana pipiens*) e a culdocentese, eram tão erráticos que a história da paciente era considerada mais importante do que os achados pélvicos. A recomendação era: “se exame e história forem contraditórias, é melhor confiar na história”(16).

Até 1953, o tratamento padrão da GE era a salpingectomia (retirada da trompa). A partir desta data, Stromme descreveu a salpingostomia (abertura da trompa), permitindo que a tuba fosse poupada (17).

1.1.1 História da laparoscopia e seu uso na Gravidez ectópica

Em 1901, George Kelling cunhou o nome de celioscopia para a investigação dentro da cavidade abdominal, experimento que havia sido feito em cães (18). Em 1912, Hans Christian Jakobaes publicou uma série de 109 casos de laparoscopias realizadas em 69 pacientes (19).

Nos anos de 1960-70, a laparoscopia tornou-se vital na prática ginecológica (18), sendo que o primeiro relato da remoção de GE por esta via foi em 1973 (20).

1. 2. Epidemiologia

A gravidez ectópica compreende 1-2% de todas as gestações (21,22). A incidência, entretanto, é maior nas unidades de emergência, variando de 6 a 16% (23). Na Unidade de Emergência Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a incidência atinge em torno de 8% (24). É a principal causa de morbidade e mortalidade nas gestantes do primeiro trimestre representando 6% das mortes (25). Inicialmente, cerca de 25-50 % das mulheres com GE têm o diagnóstico de gravidez em local indeterminado (PUL) (26). É o termo utilizado para descrever um teste de gravidez

positivo, mas que na ecografia transvaginal não é identificada gravidez intra ou extrauterina. Entretanto, este é um termo de classificação, e não de diagnóstico.

PUL pode evoluir para IUP, GE, aborto espontâneo ou permanecer como PUL.

1. 2.1. Localização das gestações ectópicas

O local mais frequente de gravidez ectópica é a tuba uterina (27). Estes e os demais locais de GE estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 . Frequência da gravidez ectópica de acordo com a localização.

Local	Frequência
Tuba de Falópio	98%
Ampola	70%
Istmo	11%
Fibras	12%
Intersticial (cornual)	3%
Cicatriz de histerectomia	1:2000
Gravidez abdominal	1:5000
Ovário	1:7000
Colo do útero	raro
Após histerectomia	raro
Trompa rudimentar	raro

Fonte: Baseado em Marion e Meeks (28)

1. 3. Etiologia

A maioria dos dados que abordam as causas da GE são derivados de estudos descritivos.

Existem poucos modelos animais de gestação ectópica. As evidências atuais apoiam a hipótese de que a GE é causada por uma alteração no binômio embrião-transporte tubário e também por alterações no ambiente tubário, permitindo que a implantação ocorra fora do útero (29). A seguir veremos estes aspectos.

1.3.1 Transporte embrião-tubário

1.3.1.1 Contratilidade do músculo liso da tuba uterina e movimentos ciliares

Halbert et al. realizaram um estudo experimental em animais com isoproterenol, cuja finalidade era inibir a atividade da musculatura lisa nos ovidutos de coelhas e ratas. Apesar deste bloqueio da musculatura, os óvulos atingiram o local de fertilização dentro dos limites normais de tempo. Com isto, os autores concluíram que os cílios tinham um papel mais importante no transporte dos óvulos do que a musculatura lisa da tuba uterina nos modelos estudados (30,31).

Lyons et al., usando tubas uterinas de mulheres submetidas à histerectomias, verificou que a frequência dos batimentos ciliares era maior durante a fase secretora em comparação à fase proliferativa do ciclo menstrual (32). Da mesma forma, o líquido folicular do ovário e peritoneal, obtidos no período pré-ovulatório, aumentam a frequência dos batimentos ciliares da tuba uterina, em comparação aos meios de cultura ou líquido peritoneal obtidos fora do período peri-ovulatório (33).

1.3.1.2 Óxido nítrico e óxido nítrico sintetase

O óxido nítrico (NO) tem um papel importante na regulação do tônus da musculatura lisa da trompa uterina (34). Ekerhovd et al., utilizando tubas uterinas derivadas de histerectomias, realizaram um experimento *in vitro* demonstrando que a adição de inibidores do NO (N-nitro-L-arginine methyl ester) aumentava a contratilidade da tuba uterina. Por outro lado, a adição de substrato para a síntese de NO (L-arginina) inicialmente causava um aumento transitório do tônus da tuba, porém na sequência ocorria um relaxamento da musculatura (35). O efeito relaxante do NO ocorre pela

ativação da via cíclica da guanosina monofosfato, enquanto que a inibição desta via resulta na sua contratilidade (36).

1.3.1.3 Células Intersticiais de Cajal

As células intersticiais de Cajal (CIC) são expressas nas tubas uterinas (37). Em camundongos, a infecção por clamídia foi a causa encontrada para a perda de CIC ao longo do comprimento da tuba uterina, o que resultou na ausência de contrações espontâneas do oviduto (29).

1.3.1.4 Procinéticos

Os procinéticos PROK1 e PROK2 têm ações angiogênicas, mas são conhecidos principalmente por sua função como reguladores de contrações potentes do músculo liso. É possível que a expressão reduzida do receptor PROKR, na tuba uterina de mulheres com gravidez ectópica, contribua para a contratilidade prejudicada do músculo liso e transporte embrio-tubário desregulado através das ciclooxigenases COX-1/COX-2, com subsequente produção de prostaglandinas. Os níveis reduzidos de PROK1 podem ser simplesmente o resultado de menores níveis séricos maternos de gonadotrofina coriônica humana (hCG), observados na GE (38).

1.3.1.5 Endocanabinóides

Wang et al., através de um experimento com camundongos, demonstraram que o bloqueio do receptor de canabinóide 1 determinou uma redução da contratilidade da tuba uterina, favorecendo a retenção do embrião dentro da mesma (39).

Os receptores de canabinóide 1 têm papel importante na GE, pois são silenciados pela nicotina das mulheres fumantes, dificultando o transporte através da tuba, o que explicaria a maior incidência desta patologia nas usuárias de tabaco (29).

1.3.2 Ambiente tubário

1.3.2.1 Receptores hormonais

Em se tratando de receptores sexuais esteroides (estrógeno e progesterona), há alterações quantitativas dos mesmos nas trompas com gravidez ectópica. Os receptores BETA de progesterona se apresentam reduzidos e os receptores estrogênicos ALFA estão ausentes (29). O polimorfismo do receptor estrogênico ALFA está associado à infertilidade feminina, uma vez que os mecanismos moleculares são importantes reguladores para a síntese de proteínas que favorecem o desenvolvimento embrionário bem-sucedido (29).

1.3.2.2 Interleucinas

A Interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células epiteliais em resposta a uma infecção, como por exemplo, clamídia tracomatis, uma das mais prevalentes no dano tubário. A ligação da IL-1 ao seu receptor resulta na iniciação da regulação da enzima quinase, a qual estimula a expressão da Interleucina-8, uma quimiocina (família de citocinas) inflamatória associada à resposta imune através do recrutamento dos neutrófilos, causando o dano tubário (38).

1.3.2.3 Fator Inibidor de Leucemia

O Fator Inibidor de Leucemia, ou *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) é uma citocina que demonstrou ser essencial para a implantação do embrião. O hCG produzido pelo

blastocisto regula a expressão de LIF no desenvolvimento de um endométrio receptivo. Na trompa de mulheres com GE, este fator se encontra aumentado. Níveis elevados de LIF nas células epiteliais sugerem uma salpingite crônica e contribuem para a implantação do embrião em local indesejado (38,40).

1.3.2.4 Proteína Homeobox A10

Homeobox Protein A10 (HOXA10) é um fator de transcrição, ou seja, é uma proteína que ajuda a transformar genes específicos em ligados ou desligados. Atua como regulador da identidade celular necessária à implantação do embrião no endométrio.

A regulação da expressão do HOXA10 sugere que possa ser controlada pelo próprio embrião. Nas tubas de mulheres com gravidez ectópica o HOXA10 encontra-se aumentado ou desregulado no local da implantação (29).

1.3.2.5 Integrinas

As Integrinas são uma grande família de moléculas de adesão celular que agem como receptores envolvidos nas ligações celulares. As integrinas $\alpha1\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta3$ têm sido largamente aceitas como marcadores de receptividade no útero durante a implantação do embrião. Entretanto, estudos sobre as integrinas nas trompas de falópio ainda são limitados. Podem estar expressas de forma normal ao alterada em pacientes com gravidez ectópica (41).

1.3.2.6 Mucina 1

Mucina 1 (MUC1) é uma glicoproteína anti-adesiva de alto peso molecular encontrada na superfície da maioria das células epiteliais, incluindo aquelas do aparelho reprodutor feminino (42,43). A MUC1 é supra regulada em células epiteliais endometriais luminiais

e glandulares. Estudos in vitro sugerem que o blastocisto retira a MUC 1 do local para favorecer a implantação.

Savaris et al. relataram, pela primeira vez, que a expressão de MUC1 é reduzida e o padrão de glicosilação alterado na trompa de pacientes com gravidez ectópica (44). Estes resultados foram posteriormente confirmados por outros pesquisadores (45).

1.3.2.7 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular, VEGF, é um importante gerador da angiogênese e regulador da proliferação das células endoteliais. Durante a gestação o fator é relevante para a proliferação do trofoblasto, para o desenvolvimento dos vasos embrionários e para o crescimento das células sanguíneas (46).

Estudos in vitro de Shao et al. têm demonstrado aumento de secreção em células epiteliais das trompas uterinas. Nesses casos, os receptores para o VEGF aparecem significativamente elevados no local da implantação do embrião, se comparados aos locais de não implantação. O VEGF está associado à invasão do trofoblasto (46).

Resultados da pesquisa supracitada sugerem que a GE possa contribuir para a elevação dos níveis circulantes do fator VEGF. A hipótese enfatiza que a relação entre hipóxia e estrogênio esteja presente na regulação do Fator de Crescimento Endotelial Vascular durante gravidez ectópica. Quando as vias de sinalização específicas do VEGF, que contribuem para a implantação tubária, forem identificadas a terapia anti-VEGF poderá ser de grande benefício para as mulheres acometidas com gravidez ectópica (46).

1.3.2.8 Trofinina

A trofinina é uma proteína que demonstrou relevante papel na adesão do embrião ao endométrio, quando em conjunto com duas proteínas citoplasmáticas: a Tastin e Bestyn. A expressão na trompa é muito pequena quando temos uma gravidez intrauterina normal, ao passo que na GE está fortemente elevada (29).

1.3.2.9 Ativina

A ativina é um hormônio produzido pelo oócito. A ativina foi inicialmente identificada como ativadora do efeito estimulante de FSH na hipófise de ratos. Ela tem a função de regulação do hormônio folículo-estimulante (FSH) através de feedback positivo e integra a família de proteínas *Transforming Growth Factor β* . Em contraposição, ela pode estar elevada nas trompas de mulheres com gravidez ectópica e clamídia tracomatis positiva. A ativina aumenta a produção de óxido nítrico (NO), o que por sua vez, modifica a contratilidade do músculo liso e o movimento ciliar, favorecendo a gravidez ectópica (29).

1.3.2.10 Elafina

A elafina é uma molécula antimicrobiana natural, membro da família antileucoproteinase, além de ser um inibidor específico da elastase; está presente em secreções vaginais, na decídua e no trofoblasto placentário durante a gestação. Por ser uma molécula pró-inflamatória responsável pela regulação parácrina no controle das infecções uterinas, ela pode ser encontrada durante todo o período menstrual na forma de neutrófilos, os quais ajudam na regeneração tecidual. A elafina também está relacionada à proteção da mucosa tubária contra infecções (47).

Os dados na literatura são conflitantes sobre a expressão da elafina nas tubas de pacientes com GE. Grudzinski et al. verificaram que a expressão da elafina estava reduzida nas tubas uterinas com GE (48), enquanto Zakizadeh et al., verificaram que a expressão da elafina estava aumentada na GE (48). As possíveis explicações para esta discrepância podem estar relacionadas às diferenças metodológicas, como o anticorpo utilizado e a análise das imagens.

1.4. Fatores de Risco

Os fatores de risco para gravidez ectópica que alteram a anatomia e a fisiologia da tuba uterina, classicamente descritos em livros de referência e em estudos de caso, estão diretamente relacionados ao comprometimento de sua funcionalidade e contribuem para a gestação extrauterina. Danos resultantes de cirurgias, cigarro ou infecções estão entre os fatores etiológicos relevantes para o risco de gravidez ectópica. A retenção do embrião dentro da trompa deve-se a uma alteração no transporte e/ou alteração no ambiente tubário (39).

Tabela 2. Fatores de risco para gravidez ectópica.

Fator	Hoffman <i>et al.</i> 2012	Teixeira <i>et al.</i> 2015	Barnhart <i>et al.</i> 2012
	Odds Ratio (95% IC)	Odds Ratio (95% IC)	Odds Ratio (95% IC)
Gestação ectópica prévia	12,5 (7,5 a 20,9)	3,57(2,1 a 5,7)	11,7 (2,1 a 29,5)
Cirurgia tubária prévia	4 (2,6 a 6,1)	2,45 (1,28 a 4,36)	
Tabagismo (> 20 cigarros/dia)	3,5 (1,4 a 8,6)	1,5 (1 a 2,4)	
Doença Inflamatória Pélvica no passado ou DST	3,4 (2,4 a 5)	2,59(1,52 a 4,21)	1,32 (1,01 a 1,73)
Três ou mais abortos espontâneos	3 (1,3 a 6,9)	0,8 (0,3 a 2,39)	1,41 (0,79 a 2,21)
Idade ≥ 40 anos	2,9 (1,1 a 7,2)		0,8 (0,78 a 1,52)
Aborto medicamentoso ou cirúrgico prévio	2,8 (1,1 a 7,2)		
Infertilidade	2,6 (1,6 a 4,2)	2,34 (1,46 a 3,68)	
Mais de 5 parceiros sexuais na vida	1,6 (1,2 a 2,1)	1,3 (0,8 a 2,1)	
Uso prévio de Dispositivo Intrauterino	1,3 (1 a 1,8)	1,1 (0,5 a2,2)	1,37 (0,82 a 2,29)

A área sombreada representa divergências na literatura.

DST: doença sexualmente transmissível, ou presença de *Chlamydia trachomatis*.

Fonte: Baseado em Teixeira et al (24) , Hoffman(49) e Barnhart (25)

1.4.1 *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*

A *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* são causas importantes de doença inflamatória pélvica. A infecção causada pela neisseria normalmente é mais severa, porém os dados ainda não são claros sobre consequências em longo prazo. Por outro lado, a infecção determinada por clamídia frequentemente deixa sequelas, levando a uma maior incidência de gravidez ectópica e infertilidade. A taxa ajustada da razão

incidência (aIRR) para clamídia positiva foi 1,41(IC95%=1,19 a 1,66) e para Neisseria foi de 1,10 (IC95%= 0,82 a 1,49); a incidência de infertilidade em mulheres testadas negativas para clamídia foi de 0,29 (IC95%=0,25 a 0,33) (42).

1.4.2 Tabagismo

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que existe um risco maior para gravidez ectópica em fumantes (ajustado OR 1.7-3.9). A cotinina, metabólito da nicotina, aumenta a expressão do PROKR, regulador da contratilidade do músculo liso da trompa na tuba uterina (50).

Estudos epidemiológicos apresentam divergências sobre o tabagismo em diferentes populações. Bouyer et al, numa população na França, verificou que o risco de GE com o tabagismo (mais de 20 cigarros/dia) era aumentado (Odds ratio ajustado = 3,9;IC95%=2,6 a 5,9)(51); nos Estudos Unidos (25) e no Brasil (24), contudo, o tabagismo não foi identificado como fator de risco.

1.4.3 Fertilização *in vitro*

Os processos de reprodução assistida têm contribuído para o aumento da incidência de GE, variando entre 2,1% até 8,6% nas pacientes que gestaram por fertilização *in vitro* (FIV), podendo atingir até 11%, se a indicação do tratamento for por dano tubário.

Acredita-se que a fisiopatologia causadora da GE seja a mesma que dificulta a gravidez natural (50,52).

Não há evidências, até o momento, de relação entre o estágio de transferência do embrião - se em clivagem ou blastocisto – com a gravidez ectópica, mas sim com dano

tubário prévio. O risco de GE tubária, pós-fertilização in vitro, está associado a patologia tubária (Odds ratio=3,37, IC 95%=1,39 a 8,2)(53).

OuYang et al, numa revisão da literatura, reportaram que a gravidez ectópica e heterotópica foram encontradas após salpingectomia bilateral por GE prévia e hidrossalpinge; este risco está associado à transferência de mais de um embrião ou blastocisto (54).

1.4.4 Gravidez Ectópica Prévia

As pacientes com GE prévia têm risco aumentado para repetir o quadro. Barnhart et al. verificaram que esta incidência é de (Odds ratio=2,98; IC 95%=1,88 a 4,73) após a primeira GE. Para quem teve duas GE ou mais, a chance aumenta cerca de 8 vezes (Odds Ratio=16,04; IC 95%=5,39 a 47,72) (55).

Dados semelhantes foram obtidos por Li et al. em estudo multicêntrico de caso-controle com mais de 4000 mulheres. Os pesquisadores concluíram que um episódio de GE aumenta significativamente o risco de uma nova ectópica (Odds ratio=6,77;IC95%=5,004 a 9,11) (56).

1.4.5 Infertilidade

A incidência de gravidez ectópica é cerca de duas a três vezes maior em pacientes com infertilidade; isso pode estar relacionado com as alterações tubárias neste grupo de pacientes (56).

1.4.6 Cirurgia Tubária Prévia

O mesmo estudo multicêntrico de caso-controle citado acima, de Li et al., identificou que história de cirurgia prévia no anexo uterino aumenta o risco de GE significativamente (Odds ratio= 5,42; IC95%=4,29 a 6,84) (56).

A análise dos diferentes tipos de cirurgia pode ser verificada na tabela a seguir:

Tabela 3. Risco de gravidez ectópica de acordo com o tipo de cirurgia no anexo uterino

Tipo de cirurgia	Odds ratio (IC95%)
cirurgia no ovário	2,08 (1,38 a 3,14)
para gravidez ectópica	7,3 (5,15 a 10,33)
reconstrução tubária	7,52(4,27 a 13,25)
esterilização tubária	12,28 (2,88 a 52,45)
reversão de ligadura tubária	8,19 (1,86 a 36,07)

Fonte: Li et al. (56)

1.4.7 Doença inflamatória Pélvica (DIP)

A doença inflamatória pélvica (DIP) é uma infecção do trato genital superior e ocorre predominantemente em mulheres jovens sexualmente ativas. *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* são causas comuns. No entanto, outros patógenos como os cervicais, entéricos, associados à vaginose bacteriana e patógenos respiratórios - incluindo *mycobacterium tuberculosis* - podem estar envolvidos na infecção. A DIP pode ser aguda, crônica ou subclínica. Porém, muitas vezes é subdiagnosticada. Quando não tratada, a condição pode levar à dor pélvica crônica, infertilidade, gravidez ectópica e infecções intra-abdominais (57). A hidrossalpinge é uma sequela da DIP; a elafina (47,58) e a MUC1 (59) estão diminuídas na hidrossalpinge.

Barnhart et al. verificaram que história de DIP tem um risco moderado para gravidez ectópica (Odds ratio=1,5; IC95%=1,11 a 2,05) (55).

1.4.8 Cesárea prévia

A gravidez ectópica, na cicatriz de cesárea prévia, é rara e potencialmente fatal. A implantação do embrião acontece dentro do miométrio e do tecido fibroso da cicatriz.

A prevalência oscila entre 1:1800 e 1:2226 gestações. Baldini et al. evidenciaram que o risco de GE na istmocele, em pacientes submetidas à FIV, é reduzido quando a transferência é feita no dia 5 no estágio de blastocisto (60).

Os fatores de risco associados à GE na cicatriz de cesárea são: idade < 35 anos (Odds ratio=2,30; IC95%=1,77 a 2,99), histórico de aborto medicamentoso (Odds ratio=1,62; IC95%= 1,10 a 2,40), intervalo entre gravidez < 2 anos desde a última cesariana (Odds ratio=2,147; IC 95%= 1,23 a 3,72), intervalo gestacional \geq 8 anos desde a última cesariana (Odds ratio=1,47; IC 95%= 1,11 a 1,95), histórico de cirurgias na cavidade uterina antes da última cesariana (Odds ratio=2,55; IC 95%= 1,809 a 3,615), histórico de cirurgias na cavidade uterina após a última cesariana (Odds ratio=8,02; IC95%=5,96 a 10,78), 2 ou mais partos cesáreos prévios (Odds ratio=14,051; IC 95%: 9,69 a 20,35) e cesárea eletiva antes do trabalho de parto (OR=2,68; IC 95%: 1,93-3,73) (61).

1.4.7 Apendicectomia

Através de meta-análise, Elraiayah et al. verificaram que cirurgias de apendicectomia apresentavam risco aumentado para gravidez ectópica (Odds ratio=1,18; IC95%=1,46 a 2,16) (62). A meta-análise incluiu coortes históricas, estudos de caso-controle e coorte

prospectiva. Contudo, o trabalho não apresentou a força de evidência e qualidade dos 19 estudos, conforme o padrão do manual Cochrane (63).

Resultados semelhantes foram obtidos por Li et al. (56). Os autores verificaram que uma cirurgia de apendicite aumentava o risco de GE (Odds ratio=1,67;IC95%=1,21 a 2,31).

Männistö et al., utilizando uma base de dados nacional com 23997 mulheres submetidas a cirurgia por apendicectomia, não identificaram um risco aumentado de GE (64). A aparente contradição dos resultados pode ser explicada pela análise dos registros no banco de dados e não na análise dos prontuários das pacientes.

1.5. Sinais e Sintomas

Na gravidez ectópica inicial, os sinais e sintomas mais comuns são dor em baixo ventre, com ou sem sangramento via vaginal, variando nas suas intensidades, sendo que até 9% podem não ter dor abdominal (65).

Sangramento vaginal — o volume e o padrão do sangramento variam. Não há regra padronizada que seja patognomônica para gravidez ectópica. O sangramento pode variar de coloração avermelhada com hemorragia ou com coloração marrom e escasso. Pode ser intermitente, contínuo ou ocorrer em um único episódio (66).

Diagnóstico diferencial: com sangramento fisiológico da implantação, aborto espontâneo, sangramento do colo uterino, hematoma subcoriônico e patologia uterina.

Dor abdominal — o início, o caráter e a gravidade da dor abdominal variam e não há padrão patognomônico para gravidez ectópica. Normalmente, a dor surge entre 5-7 semanas de gravidez, quando a tuba fica distendida e pode romper. A dor geralmente

ocorre na pelve e pode ser difusa ou localizada em um dos lados. As pacientes podem descrever a dor como contínua ou intermitente, incômoda ou aguda, leve ou intensa. A ruptura tubária pode estar associada a um início abrupto de dor intensa. Nos casos com sangue intraperitoneal atingindo a parte superior do abdome, ou em casos raros de gravidez abdominal, a dor pode ser na altura média ou superior da parede. Se houver sangramento intra-abdominal suficiente para atingir o diafragma, a dor referida pode ser sentida no ombro. Acúmulo de sangue no fundo de saco de Douglas pode causar a sensação de defecar (66).

No exame físico, pode-se identificar um útero normal ou levemente aumentado, dor à mobilização do colo uterino e massa anexial palpável (65).

Uma vez descoberta a gravidez na paciente, a determinação da localização e a vitalidade do embrião/feto devem ser estabelecidas (28).

1.6. Exames Auxiliares

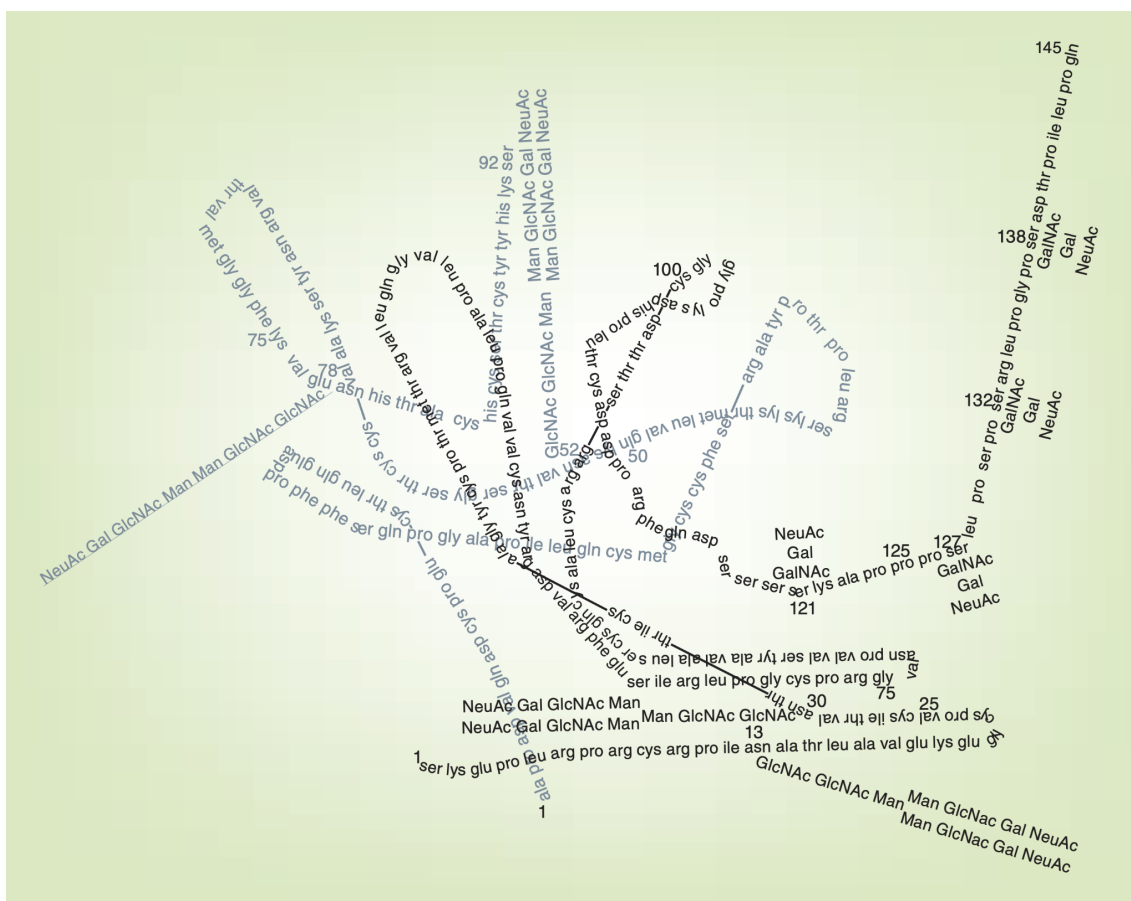
Os principais exames auxiliares no diagnóstico de GE são a ultrassonografia transvaginal (USTV) e a dosagem do hormônio da gonadotrofina coriônica humana (hCG).

1.6.1 Hormônio da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

O hCG é um hormônio glicoproteico de 237 aminoácidos composto por duas subunidades diferentes, α e β , ligadas de forma não covalente, ambas as subunidades, produzido pelo sinciciotrofoblasto (67,68). A subunidade alfa tem 92 aminoácidos, a subunidade beta, 145 (69).

Clinicamente, o hCG já pode ser detectada cerca de 7 a 8 dias antes da menstruação esperada. O hCG é essencial na gravidez, sendo que é detectado poucos dias após a fertilização. Neste estágio inicial da gestação, as células do trofoblasto embrionário - pré-implantação - produzem uma forma hiperglicosilada do hCG que vai facilitar a implantação do embrião na parede uterina (70).

Figura 1. Estrutura dimérica do HCG regular. O desenho é de acordo com a estrutura da cristalografia de Raio-X em 3D e a publicação da sequência de aminoácidos e com as cadeias laterais de oligossacarídeos com a ligação O- e N-. A subunidade alfa está demonstrada em cinza e a beta em preto.



Gal: galactose; GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: Manose; NeuAc: Ácido Siálico

Fonte: Cole LA (69)

O hCG pode ser secretado em diferentes formas: a regular, a hiperglicosilada e a subunidade β -livre hiperglicosilada. Estas formas apresentam numerosas dissociações e

produtos da degradação do da subunidade β do hCG, as quais são detectadas na urina e no sangue (69).

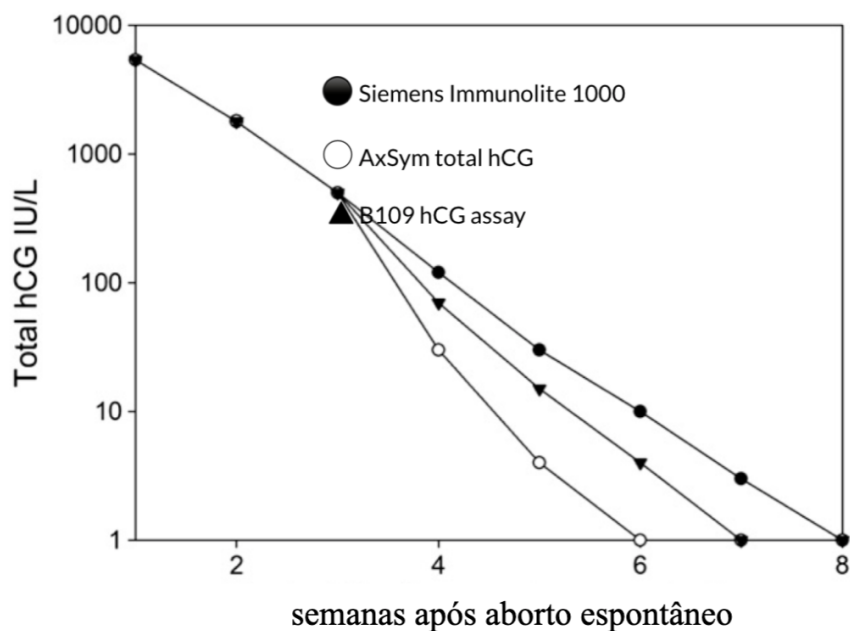
1.6.1.1 Dosagem do hCG sérico

Ao solicitar um teste de hCG, é importante compreender o que está sendo medido e se o teste solicitado detectará adequadamente essas três variantes de hCG, bem como seus produtos de degradação. A maioria dos testes de laboratório comerciais automatizados, testes de farmácia concentram-se apenas no hCG regular (69).

Os testes imunométricos dos laboratórios modernos têm um anticorpo principal para se ligar a um local do hCG, imobilizando-o (conhecido como anticorpo de captura). Um segundo anticorpo (conhecido como anticorpo rastreador), é marcado com iodo radioativo ou com uma enzima. O anticorpo rastreador se liga num sítio distante do local onde o hCG marcado está imobilizado. O complexo "anticorpo de captura-hCG-anticorpo rastreador" pode ser quantificado, a quantidade de rastreador é diretamente proporcional a quantidade do complexo, ou a concentração do hCG. Este tipo de teste é chamado de ensaio imunométrico. Todos os imunoensaios comerciais disponíveis são imunométricos com multianticorpos. Existem duas categorias de testes de hCG: os testes de hCG dimérico intacto e testes de β -hCG. Este último é projetado para detectar o hCG intacto, a subunidade β livre e, possivelmente, outras variantes do hCG. Cada ensaio automatizado ou semiautomatizado detecta o hCG regular e outras formas de hCG, de acordo com o modelo automatizado (69).

Devido a estas diferenças, diferentes ensaios terão desempenhos diferentes para determinar uma mesma amostra de sangue, conforme demonstrado na figura abaixo.

Figura 2. Exemplo de limitações de ensaios que detectam diferentes formas de hCG. O hCG total foi dosado no sangue semanalmente após aborto espontâneo.



Fonte: Obtido de Cole et al, 2011(71).

1.6.2 Hormônio da Gonadotrofina Coriônica e Zona Discriminatória

Kadar et al. apresentaram o conceito de Zona Discriminatória (ZD) do hCG em 1981, através de carta no periódico *The Lancet*, onde os autores demonstraram que um nível de hCG acima de 6000-6500mUI/ml implicava na visualização de uma gestação intrauterina, utilizando uma ecografia abdominal (72).

A zona discriminatória é o limiar aproximado de β -hCG onde uma gravidez intrauterina pode ser tipicamente identificada por ultrassom. A ultrassonografia transvaginal tem alta sensibilidade, quando os níveis de β -hCG estão acima de 1.500 mIU/mL, enquanto o limiar é muito maior usando a abordagem transabdominal (aproximadamente 6.000 mIU/mL) (73). Romero e Kadar, posteriormente usando uma amostra de 383 pacientes, verificaram que a ausência de saco gestacional intrauterino em uma concentração de hCG acima de 6500 mUI/ml apresentava uma sensibilidade de 100%, especificidade de

96%, uma acurácia de 98%, para o diagnóstico de GE, quando a sua incidência era de 19,4% (74).

Os valores da ZD podem variar de acordo com o kit utilizado para dosar o β -hCG, bem como a sensibilidade para encontrar uma gestação intrauterina. Connolly et al, em estudo com 651 pacientes com sangramento ou dor no primeiro trimestre, entre gestações intrauterinas com atividade cardíaca, um saco gestacional foi observado em 80% das gestações com β -hCG com 1500 mUI/ml, 91% com 2000 mUI/ml e 99% com 3510 mUI/ml (75).

O avanço na qualidade das ultrassonografias transvaginais trouxe uma redução nos limiares da ZD para 1000 a 2000 mUI/ml (75–77). Se uma paciente sintomática tiver um ultrassom indeterminado com um β -hCG acima da ZD, o diagnóstico de gravidez ectópica deve ser considerado (78). Os valores de hCG abaixo da ZD não são diagnósticos, todavia indicam que o profissional deve continuar a observar e monitorar a paciente a cada 48 horas com novos exames, ressaltando que durante esse período aumenta o risco de ocorrer ruptura tubária (79).

É importante enfatizar que uma paciente não deve ser diagnosticada ou tratada para uma gravidez ectópica com base em um único nível sérico de hCG (80).

1.6.3 Variação do Hormônio da Gonadotrofina Coriônica em Gestações Normais e Anormais

As variações dos ensaios imunoenzimáticos para a dosagem do β -hCG reduzem a validade externa dos dados obtidos de outras instituições (71); os exames sequenciais, e consequentemente as diferenças percentuais têm sido investigadas. Kadar e Romero foram os primeiros a descrever que o aumento mínimo do hCG, em 48h deve ser de

35-66% em gestação normal. Os autores chegaram a essa conclusão avaliando 20 pacientes com suspeita de gravidez ectópica, com intervalo de confiança de 85% (81).

Silva et al. num estudo com 200 mulheres com GE não conseguiram identificar uma alteração que predissesse um caso de GE; o perfil do hCG em mulheres com gravidez ectópica pode imitar o de uma gravidez intrauterina ou de um aborto espontâneo completo aborto em aproximadamente 29% dos casos (82).

Morse et al, em um estudo com mais de 1000 pacientes com gestação em local indeterminado, mostraram que o aumento mínimo esperado de 2 dias no nível de hCG era de 35%; esta variabilidade apresentou 83,2% de sensibilidade e 70,8% de especificidade para prever uma GE. No entanto, 16,8% das GE e 7,7% das gestações intrauterinas seriam classificados erroneamente apenas usando níveis seriados de hCG (83). Similarmente, outros autores, demonstraram que a variação de hCG em 48 h, foi relacionada com a normalidade da gestação. Por exemplo, uma redução de hCG após 2 dias entre 1% e 35% tem uma razão de verossimilhança de 16,6 (4,5), enquanto uma redução de mais de 50% reduz a razão de verossimilhança para quase zero (4).

1.6.4 Ultrassonografia Transvaginal

A ultrassonografia é fundamental para fazer o diagnóstico e compreensão dos sinais normais de uma gestação intrauterina e para a GE (84).

Existem achados ecográficos que são patognomônicos para identificar a gestação intra ou extrauterina; há, contudo, achados que são suspeitos para GE, mas podem estar presentes em outras condições. Estes achados ultrassonográficos serão apresentados a seguir:

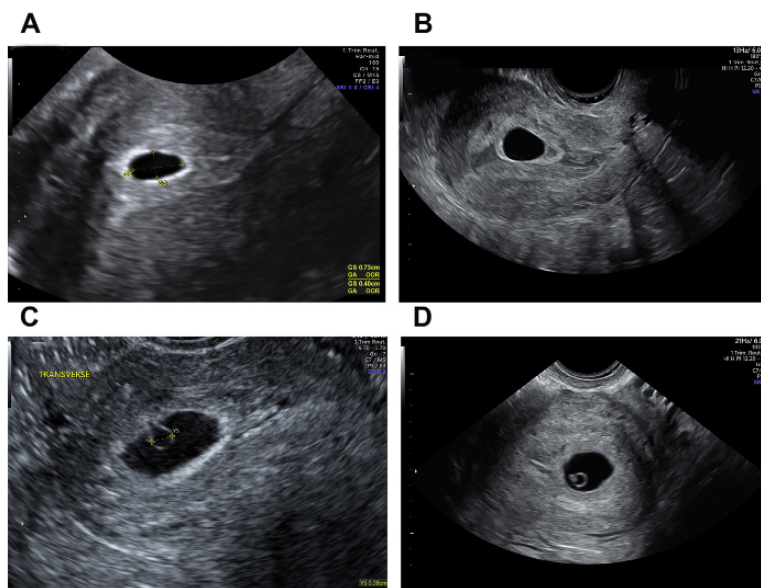
1.6.4.1 Achados patognomônicos

São achados diagnósticos de gravidez intrauterina com a ultrassonografia transvaginal (85):

1. A presença de saco gestacional
2. Sinal do duplo halo
3. Presença de vesícula vitelina dentro do saco gestacional
4. Presença embrião intrauterino com ou sem batimentos cardíacos

Estes achados estão representados na figura 3

Figura 3. Exemplos de imagens ultrassonográficas de gestações intrauterinas iniciais. A: saco gestacional inicial localizado em posição excêntrica na decídua. B: sinal do duplo halo. C: saco gestacional com vesícula vitelina D: polo fetal visto adjacente da vesícula vitelina



Fonte: Scibetta et al. 2019 (84)

Os achados patognomônicos de gravidez ectópica, através da ultrassonografia transvaginal são (86):

1. Presença de saco gestacional extrauterino contendo um vesícula vitelina

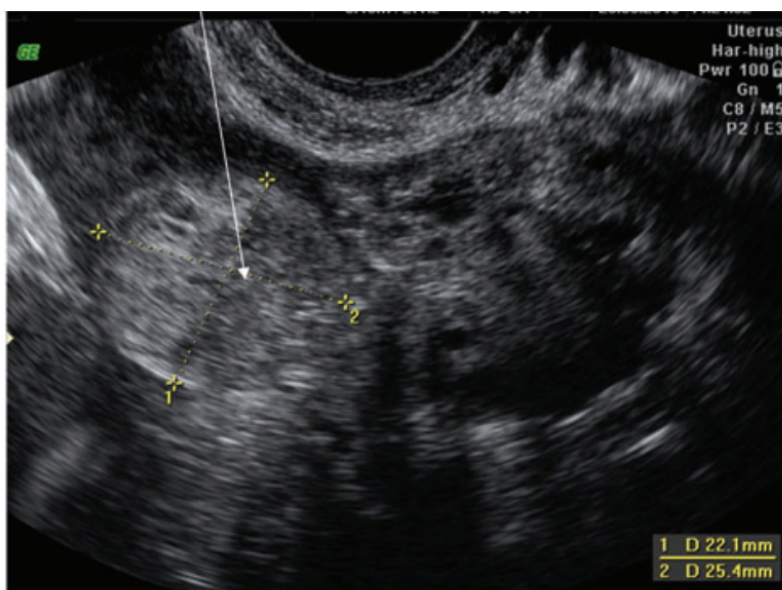
2. Pólo embrionário visualizado
3. Presença de batimentos cardíacos fetais

1.6.4.2 Achados suspeitos de gravidez ectópica

Existem achados ultrassonográficos que podem estar relacionados com a gravidez ectópica, mas não fazem o diagnóstico de certeza. São eles:

1. **Líquido livre em fundo de saco.** Uma pequena quantidade de fluido livre anecóico no fundo de saco é comumente encontrado em gestações intrauterinas e ectópicas (87). A presença de fluido ecogênico foi relatada em 28-56% das mulheres com GE (87,88).
2. **Massa anexial.** Uma massa anexial que se move separada do ovário é observada em 60% dos casos de GE. Esta massa anexial não homogênea ou não cística, às vezes conhecida como sinal de 'blob' (89)(Fig. 4). Browne e Doubilet, em uma meta-análise, relataram que este sinal tem um valor preditivo positivo 96,3%. A massa é geralmente esférica, mas uma aparência mais tubular pode ser vista se o sangramento criar uma hematossalpinge (90) .

Figura 4. Exemplos de imagens ultrassonográficas de massa anexial (seta).



Fonte: Kirk et al. 2014 (91)

1.6.4.1 Desempenho da ultrassonografia no diagnóstico da GE

Richardson et al. revisaram o desempenho da ultrassonografia para o diagnóstico de gravidez ectópica (92). Através do exame, em gravidezes normais, a ecografia transvaginal pode identificar a vesícula vitelina a partir de 35 dias de gestação, sendo a primeira estrutura que aparece dentro do saco gestacional indicando gravidez intrauterina, com valor preditivo positivo de 100%. O sinal patognomônico de GE é a identificação de embrião vivo fora da cavidade uterina, mas só relatado em 8-26% das GE. Massa anexial separada do ovário é visualizada em 89-100% das gestações ectópicas. Líquido livre está presente em até 63% das GE, e somente em 25-30% nas gestações intrauterinas.

A presença de uma cavidade uterina vazia na ultrassonografia tem uma sensibilidade de 81,1% (IC95%:42,1% a 96,2%) e especificidade de 79,5% (IC95%:68,9% a 87,1%). O

desempenho correspondente dos achados ultrassonográficos para o diagnóstico de GE pode ser verificado na Tabela 4.

Tabela 4. Desempenho dos achados ultrassonográficos para o diagnóstico de Gravidez ectópica

Achado ultrassonográfico	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)
Pseudo Saco	5,5% (3,3% a 9,0%)	94,2% (75,9% a 98,8%)
Massa anexial	63,5% (48,5% a 76,3%)	91,4% (83,6% a 95,7%)
Líquido livre	47,2% (33,2% a 61,7%)	92,3% (85,6% a 96,0%)

Fonte: Richardson et al. (92)

1.7 Sequências de exames para o diagnóstico de gravidez ectópica

Gracia e Barnhart analisaram 6 protocolos diferentes, utilizando a metodologia de análise de decisão, para encontrar o protocolo ideal para diagnosticar gravidez ectópica(93). Os seguintes protocolos foram analisados:

1. Exame clínico.
2. Ultrassom seguido de hCG quantitativo
3. HCG quantitativo seguido de ultrassom
4. Progesterona seguida de ultrassom e hCG quantitativo.
5. Progesterona seguida de medição quantitativa de hCG e ultrassom
6. Ultrassom seguido de ultrassom repetido

Os autores identificaram que os algoritmos que usam uma combinação de ultrassom e hCG resultaram nos melhores resultados. O ultrassom como primeiro passo foi o método mais eficiente e preciso de diagnosticar gravidezes ectópicas (93).

1.8. Teorema de Bayes

O Teorema de Bayes afirma que a probabilidade condicional de um evento, baseado na ocorrência de outro evento, é igual a probabilidade do segundo evento, dado o primeiro evento multiplicado pela probabilidade do primeiro evento

Para o cálculo da probabilidade de um evento A dado que um evento B ocorreu, “ $P(A|B)$ ”, temos:

$$P(A|B) = \frac{P(B|A) \cdot P(A)}{P(B)}$$

onde,

$P(A|B)$: é probabilidade de A irá acontecer dado que B já ocorreu, ou a probabilidade de ter uma gravidez ectópica, dado um teste positivo

$P(B|A)$: é probabilidade de B irá acontecer dado que A já aconteceu, ou a sensibilidade do teste para a gravidez ectópica

$P(A)$: probabilidade de A irá ocorrer, ou a incidência de gravidez ectópica

$P(B)$: probabilidade de B irá ocorrer, ou a probabilidade do teste positivo ocorrer (sensibilidade X incidência) + (1-incidência)

O teorema de Bayes é uma pequena equação matemática muito poderosa, que nos dá a ideia da probabilidade de uma doença estar presente a partir do resultado positivo.

1.8.1 Uso do Teorema de Bayes para a GE

Mol et al. em 1999 apresentaram uma coorte teórica com 800 mulheres com suspeita de GE. Neste algoritmo, os autores identificavam a probabilidade pré-teste baseada em sinais e sintomas e fatores de risco. Após a realização de um exame, uma probabilidade pós-teste era obtida, utilizando razões de verossimilhança baseadas em teste. A gravidez ectópica foi diagnosticada sempre que a probabilidade pós-teste de gravidez ectópica excedia 95%, enquanto esse diagnóstico era rejeitado se a probabilidade pós-teste fosse

inferior a 1%. Numa incidência de GE de 10%, o algoritmo apresentava uma sensibilidade e especificidade de 92% e 98%, respectivamente (94).

2. Justificativa

O presente estudo foi escolhido em virtude de a gravidez ectópica ter uma incidência de 8% nas emergências, sendo a principal causa de mortalidade nas gestantes do primeiro trimestre. O algoritmo apresentado por Mol et al., (94) nunca foi validado numa coorte real, na prática clínica. Se o algoritmo tiver uma acurácia alta, as condutas em casos de suspeita de GE poderão ser tomadas com maior certeza probabilística, reduzindo a morbidade desta doença.

3. Hipóteses

Hipótese nula (H0)

O algoritmo proposto apresenta uma acurácia superior a 95% para ser utilizada no diagnóstico de gravidez ectópica.

Hipótese alternativa (H1)

O algoritmo proposto apresenta uma acurácia inferior a 95% para ser utilizada no diagnóstico de gravidez ectópica.

4. Objetivo

4.1 Principal

Verificar a acurácia de um algoritmo online usando o teorema de Bayes para o diagnóstico de gravidez ectópica (GE), utilizando níveis de hCG, achados ultrassonográficos e dados clínicos em uma coorte real.

4.2 Secundário

Verificar a incidência geral de gravidez ectópica na emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS

Determinar a média de idade das pacientes com e sem gravidez ectópica

Verificar a média da idade gestacional da gravidez ectópica na amostra estudada.

5. Referências

1. Mummert T, Gnugnoli DM. Ectopic Pregnancy. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022.
2. RCOG Green-top Guideline. Diagnosis and Management of Ectopic Pregnancy: Green-top Guideline No. 21. *BJOG* 2016;123(13):e15–55.
3. Hall GH. The clinical application of Bayes' theorem. *Lancet* 1967;2(7515):555–7.
4. Mol BW, Hajenius PJ, Engelsbel S, Ankum WM, Van der Veen F, Hemrika DJ, et al. Serum human chorionic gonadotropin measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy when transvaginal sonography is inconclusive. *Fertil Steril* 1998;70(5):972–81.
5. Seeber BE, Sammel MD, Guo W, Zhou L, Hummel A, Barnhart KT. Application of redefined human chorionic gonadotropin curves for the diagnosis of women at risk for ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2006;86(2):454–9.
6. Caraguel CGB, Vanderstichel R. The two-step Fagan's nomogram: ad hoc interpretation of a diagnostic test result without calculation. *Evid Based Med* 2013;18(4):125–8.
7. Amr SS, Tbakhi A. Abu Al Qasim Al Zahrawi (Albucasis): pioneer of modern surgery. *Ann Saudi Med* 2007;27(3):220–1.
8. Lurie S. The history of the diagnosis and treatment of ectopic pregnancy: a medical adventure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;43(1):1–7.
9. Graham H. *Eternal Eve, the History of Gynaecology and Obstetrics*. Harvey Graham. Doubleday & Company; 1951.
10. Cianfrani T. *A short history of obstetrics and gynecology*. Thomas Books; 1960.
11. King J. *An analysis of the subject of extra-uterine foetation, and of the retroversion of the gravid uterus*. G. Wright; 1818.
12. Tait L. Five Cases of Extra-Uterine Pregnancy Operated upon at the Time of Rupture. *BMJ* 1884;1(1226):1250–1.
13. Tait L. *Lectures on ectopic pregnancy and pelvic haematocele*. Birmingham: The "Journal" Printing Works; 1888.
14. Graffagnino P. Ectopic pregnancy [Internet]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1922;4(2):148–58. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378\(22\)90694-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(22)90694-5)
15. Collins CG, Beacham WD, Beacham DW. Ectopic Pregnancy, Mortality and Morbidity Factors**Read, by invitation, at the Fifty-Ninth Annual Meeting of the American Association of Obstetricians, Gynecologists and Abdominal Surgeons,

- Hot Springs, Va., Sept. 9 to 11, 1948 [Internet]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1949;57(6):1144–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378\(16\)39289-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(16)39289-4)
16. Eastman NJ. Ectopic Pregnancy. In: Eastman NJ, editor. *Williams Obstetrics*. Appleton-Century-Crofts, Inc.,; 1956. p. 553–70.
 17. Stromme WB. Salpingotomy for tubal pregnancy; report of a successful case. *Obstet Gynecol* 1953;1(4):472–5.
 18. Spaner SJ, Warnock GL. A Brief History of Endoscopy, Laparoscopy, and Laparoscopic Surgery [Internet]. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques*. 1997;7(6):369–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/lap.1997.7.369>
 19. Jacobaeus HC. Über Laparo- und Thorakoskopie [Internet]. *Beiträge zur Klinik der Tuberkulose*. 1912;25(2):I – 354. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01875367>
 20. Shapiro HI, Adler DH. Excision of an ectopic pregnancy through the laparoscope [Internet]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1973;117(2):290–1. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(73\)90652-2](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(73)90652-2)
 21. Sivalingam VN, Duncan WC, Kirk E, Shephard LA, Horne AW. Diagnosis and management of ectopic pregnancy. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2011;37(4):231–40.
 22. Panelli DM, Phillips CH, Brady PC. Incidence, diagnosis and management of tubal and nontubal ectopic pregnancies: a review. *Fertil Res Pract* 2015;1:15.
 23. Murray H, Baakdah H, Bardell T, Tulandi T. Diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *CMAJ* 2005;173(8):905–12.
 24. Teixeira JLG, Rabaioli P, Savaris RF. Sensitivity and specificity of a urinary screening test used in an emergency setting to detect abnormal first trimester pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212(1):58.e1–5.
 25. Barnhart KT, Sammel MD, Gracia CR, Chittams J, Hummel AC, Shaunik A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril* 2006;86(1):36–43.
 26. Cameron KE, Senapati S, Sammel MD, Chung K, Takacs P, Molinaro T, et al. Following declining human chorionic gonadotropin values in pregnancies of unknown location: when is it safe to stop? *Fertil Steril* 2016;105(4):953–7.
 27. Varma R, Gupta J. Tubal ectopic pregnancy. *BMJ Clin Evid* [Internet] 2012;2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321966>
 28. Marion LL, Meeks GR. Ectopic pregnancy: History, incidence, epidemiology, and risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55(2):376–86.

29. Shaw JLV, Dey SK, Critchley HOD, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010;16(4):432–44.
30. Halbert SA, Tam PY, Blandau RJ. Egg Transport in the Rabbit Oviduct: The Roles of Cilia and Muscle [Internet]. *Science*. 1976;191(4231):1052–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1251215>
31. Halbert SA, Becker DR, Szal SE. Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biol Reprod* 1989;40(6):1131–6.
32. Lyons RA, Djahanbakhch O, Mahmood T, Saridogan E, Sattar S, Sheaff MT, et al. Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site [Internet]. *Human Reproduction*. 2002;17(3):584–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/17.3.584>
33. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The effect of ovarian follicular fluid and peritoneal fluid on Fallopian tube ciliary beat frequency [Internet]. *Human Reproduction*. 2006;21(1):52–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dei306>
34. Afanas'ev IB. Signaling Functions of Free Radicals Superoxide & Nitric Oxide under Physiological & Pathological Conditions [Internet]. *Molecular Biotechnology*. 2007;37(1):2–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-007-0056-7>
35. Ekerhovd E, Brännström M, Alexandersson M, Norström A. Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum Reprod* 1997;12(2):301–5.
36. Ekerhovd E, Norström A. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of fallopian tube contractility. *Gynecol Endocrinol* 2004;19(5):239–46.
37. Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N, et al. Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube [Internet]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005;9(2):479–523. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00376.x>
38. Shaw JLV, Horne AW. The paracrinology of tubal ectopic pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358(2):216–22.
39. Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, et al. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos [Internet]. *Nature Medicine*. 2004;10(10):1074–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1104>
40. Krishnan T, Winship A, Sonderegger S, Menkhorst E, Horne AW, Brown J, et al. The role of leukemia inhibitory factor in tubal ectopic pregnancy. *Placenta* 2013;34(11):1014–9.

41. Inan S, Giray G, Vatansever HS, Ozbilgin K, Kuscu NK, Sayhan S. Immunolocalization of integrins and fibronectin in tubal pregnancy. *Acta Histochem* 2004;106(3):235–43.
42. Reekie J, Donovan B, Guy R, Hocking JS, Kaldor JM, Mak D, et al. Risk of Ectopic Pregnancy and Tubal Infertility Following Gonorrhoea and Chlamydia Infections. *Clin Infect Dis* 2019;69(9):1621–3.
43. Brito LR, de P. Guedes Neto E, Furich DG, Savaris RF. MUC1 (VPM654 and EPR1023) Expression in Mucosa of Fallopian Tubes With Ectopic Pregnancy is Altered [Internet]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2016;24(8):569–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000233>
44. Savaris RF, da Silva LC, Moraes G da S, Edelweiss MIA. Expression of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril* 2008;89(4):1015–7.
45. Al-Azemi M, Refaat B, Aplin J, Ledger W. The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2009;24(10):2582–7.
46. Shao R, Hu J, Feng Y, Billig H. Aberrant alteration of vascular endothelial growth factor-family signaling in human tubal ectopic pregnancy: what is known and unknown? *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(4):810–5.
47. Neto EPG, Fuhrich DG, Carson DD, Engel BJ, Savaris RF. Elafin expression in mucosa of fallopian tubes is altered by hydrosalpinx. *Reprod Sci* 2014;21(3):401–7.
48. Zakizadeh F, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Asemi-Rad A, Ghasemi M, Moudi B, Sheibak N, et al. Upregulation of elafin expression in the fallopian tube of ectopic tubal pregnancies compared to the normal tubes [Internet]. *Journal of Reproductive Immunology*. 2020;141:103136. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2020.103136>
49. Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham F, et al. Ectopic pregnancy. In: Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham F, et al., editors. *Williams Gynecology*. New York: McGraw-Hill; 2012.
50. Horne AW, Brown JK, Nio-Kobayashi J, Abidin HBZ, Adin ZEHA, Boswell L, et al. The association between smoking and ectopic pregnancy: why nicotine is BAD for your fallopian tube. *PLoS One* 2014;9(2):e89400.
51. Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly J-L, Fernandez H, Gerbaud L, et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. *Am J Epidemiol* 2003;157(3):185–94.
52. Muller V, Makhmalieva M, Kogan I, Fedorova I, Lesik E, Komarova E, et al.

- Ectopic pregnancy following in vitro fertilization: meta-analysis and single-center experience during 6 years. *Gynecol Endocrinol* 2016;32(sup2):69–74.
53. Muller V, Makhmadalieva M, Kogan I, Fedorova I, Lesik E, Komarova E, et al. Ectopic pregnancy following in vitro fertilization: meta-analysis and single-center experience during 6 years. *Gynecol Endocrinol* 2016;32(sup2):69–74.
 54. OuYang Z, Yin Q, Wu J, Zhong B, Zhang M, Li F. Ectopic pregnancy following in vitro fertilization after bilateral salpingectomy: A review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2020;254:11–4.
 55. Barnhart KT, Sammel MD, Gracia CR, Chittams J, Hummel AC, Shaunik A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril* 2006;86(1):36–43.
 56. Li C, Zhao W-H, Zhu Q, Cao S-J, Ping H, Xi X, et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a multi-center case-control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2015;15:187.
 57. Chappell CA, Wiesenfeld HC. Pathogenesis, diagnosis, and management of severe pelvic inflammatory disease and tuboovarian abscess. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55(4):893–903.
 58. Guedes Neto E de P, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam R do A, Savaris RF. The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011;95(8):2673–5.
 59. Silva AL, Fuhrich DG, Carson DD, Engel BJ, Savaris RF. MUC1 expression in fallopian tubes of women with hydrosalpinx. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;180:106–10.
 60. Baldini GM, Malvasi A, Hatirnaz S, Kosmas I, Tinelli A, Baldini D. In patients with isthmocele undergoing IVF, the risk of ectopic pregnancy on the cesarean scar is reduced only if the ultrasound-guided transfer is performed on day 5 - A retrospective case-control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2022;26(15):5520–8.
 61. Wang C, Wei Y, Liang HM, Zhao YY, Guo HY, Li R, et al. [Clinical risk factors of cesarean scar pregnancies]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2022;102(32):2495–9.
 62. Elraiayah T, Hashim Y, Elamin M, Erwin PJ, Zarroug AE. The effect of appendectomy in future tubal infertility and ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *J Surg Res* 2014;192(2):368–74.e1.
 63. Chapter 14: Completing “Summary of findings” tables and grading the certainty of the evidence [Internet]. [cited 2022 Nov 16]; Available from: <https://training.cochrane.org/handbook/current/chapter-14>
 64. Männistö J, Sammalkorpi H, Niinimäki M, Mentula M, Mentula P. Association of complicated appendicitis on the risk of later in vitro fertilization treatment requirement and ectopic pregnancy: a nationwide cohort study. *Acta Obstet*

- Gynecol Scand 2021;100(8):1490–6.
65. Tay JI, Moore J, Walker JJ. Ectopic pregnancy. *BMJ* 2000;320(7239):916–9.
 66. A. I, Al O, Tulandi T. Term Extra-Uterine Pregnancy [Internet]. *Ectopic Pregnancy - Modern Diagnosis and Management*. 2011; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/19838>
 67. Montagnana M, Trenti T, Aloe R, Cervellin G, Lippi G. Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. *Clin Chim Acta* 2011;412(17-18):1515–20.
 68. Betz D, Fane K. Human Chorionic Gonadotropin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
 69. Cole LA. Human chorionic gonadotropin tests. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(7):721–47.
 70. Gregor CR, Cerasoli E, Schouten J, Ravi J, Slootstra J, Horgan A, et al. Antibody Recognition of a Human Chorionic Gonadotropin Epitope (hCG β 66–80) Depends on Local Structure Retained in the Free Peptide [Internet]. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(28):25016–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.246637>
 71. Cole LA, DuToit S, Higgins TN. Total hCG tests. *Clin Chim Acta* 2011;412(23-24):2216–22.
 72. Kadar N, Romero R. Hcg assays and ectopic pregnancy. *Lancet* 1981;317(8231):1205–6.
 73. Barnhart KT, Simhan H, Kamelle SA. Diagnostic accuracy of ultrasound above and below the beta-hCG discriminatory zone. *Obstet Gynecol* 1999;94(4):583–7.
 74. Romero R, Kadar N, Jeanty P, Copel JA, Chervenak FA, DeCherney A, et al. Diagnosis of ectopic pregnancy: value of the discriminatory human chorionic gonadotropin zone. *Obstet Gynecol* 1985;66(3):357–60.
 75. Connolly A, Ryan DH, Stuebe AM, Wolfe HM. Reevaluation of discriminatory and threshold levels for serum β -hCG in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;121(1):65–70.
 76. Bree RL, Edwards M, Böhm-Vélez M, Beyler S, Roberts J, Mendelson EB. Transvaginal sonography in the evaluation of normal early pregnancy: correlation with HCG level. *AJR Am J Roentgenol* 1989;153(1):75–9.
 77. Bateman BG, Nunley WC Jr, Kolp LA, Kitchin JD 3rd, Felder R. Vaginal sonography findings and hCG dynamics of early intrauterine and tubal pregnancies. *Obstet Gynecol* 1990;75(3 Pt 1):421–7.
 78. Anderson J, Ghaffarian KR. Early Pregnancy Diagnosis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

79. Rausch ME, Barnhart KT. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55(2):418–23.
80. Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 191: Tubal Ectopic Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2018;131(2):e65–77.
81. Kadar N, Caldwell BV, Romero R. A method of screening for ectopic pregnancy and its indications. *Obstet Gynecol* 1981;58(2):162–6.
82. Silva C, Sammel MD, Zhou L, Gracia C, Hummel AC, Barnhart K. Human chorionic gonadotropin profile for women with ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006;107(3):605–10.
83. Morse CB, Sammel MD, Shaunik A, Allen-Taylor L, Oberfoell NL, Takacs P, et al. Performance of human chorionic gonadotropin curves in women at risk for ectopic pregnancy: exceptions to the rules. *Fertil Steril* 2012;97(1):101–6.e2.
84. Scibetta EW, Han CS. Ultrasound in Early Pregnancy: Viability, Unknown Locations, and Ectopic Pregnancies. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2019;46(4):783–95.
85. Murugan VA, Murphy BO, Dupuis C, Goldstein A, Kim YH. Role of ultrasound in the evaluation of first-trimester pregnancies in the acute setting. *Ultrasonography* 2020;39(2):178–89.
86. Barnhart K, van Mello NM, Bourne T, Kirk E, Van Calster B, Bottomley C, et al. Pregnancy of unknown location: a consensus statement of nomenclature, definitions, and outcome. *Fertil Steril* 2011;95(3):857–66.
87. Nyberg DA, Hughes MP, Mack LA, Wang KY. Extrauterine findings of ectopic pregnancy of transvaginal US: importance of echogenic fluid [Internet]. *Radiology*. 1991;178(3):823–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1148/radiology.178.3.1994425>
88. Fleischer AC, Pennell RG, McKee MS, Worrell JA, Keefe B, Herbert CM, et al. Ectopic pregnancy: features at transvaginal sonography. *Radiology* 1990;174(2):375–8.
89. Condous G, Okaro E, Khalid A, Lu C, Van Huffel S, Timmerman D, et al. The accuracy of transvaginal ultrasonography for the diagnosis of ectopic pregnancy prior to surgery. *Hum Reprod* 2005;20(5):1404–9.
90. Brown DL, Doubilet PM. Transvaginal sonography for diagnosing ectopic pregnancy: positivity criteria and performance characteristics. *J Ultrasound Med* 1994;13(4):259–66.
91. Kirk E, Bottomley C, Bourne T. Diagnosing ectopic pregnancy and current concepts in the management of pregnancy of unknown location. *Hum Reprod Update* 2014;20(2):250–61.

92. Richardson A, Gallos I, Dobson S, Campbell BK, Coomarasamy A, Raine-Fenning N. Accuracy of first-trimester ultrasound in diagnosis of tubal ectopic pregnancy in the absence of an obvious extrauterine embryo: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47(1):28–37.
93. Gracia CR, Barnhart KT. Diagnosing ectopic pregnancy: decision analysis comparing six strategies. *Obstet Gynecol* 2001;97(3):464–70.
94. Mol BW, van Der Veen F, Bossuyt PM. Implementation of probabilistic decision rules improves the predictive values of algorithms in the diagnostic management of ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 1999;14(11):2855–62.

6. Artigo em Inglês

Title page

Running title: Bayes theorem in ectopic pregnancy

Title: Diagnosing ectopic pregnancy using the Bayes theorem, a classic that is good as new: a retrospective cohort study.

Author names and affiliations:

Carlos A. Link ^a, Jackson Maissiat ^b, Ben. W. Mol ^c, Kurt T. Barnhart ^d, Ricardo F. Savaris ^e

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Postgraduate Program in Medicine:

Surgical Sciences, School of Medicine, Porto Alegre, Brazil - 90035-003. e-mail:

dr.link@clinicaproser.com.br

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Gynecology and

Obstetrics, School of Medicine, Porto Alegre, Brazil - 90035-003

e-mail:jackson.maissiat@gmail.com

^c Department: Obstetrics and Gynecology, Monash University, Australia – VIC 3168

e-mail: ben.mol@monash.edu

^d Department: Obstetrics and Gynecology, University of Pennsylvania Medical Center,

Division of Reproductive Endocrinology and Infertility 3701 Market Street, Suite

800, Philadelphia, PA, USA - 19104 e-mail: KBarnhart@pennmedicine.upenn.edu

Corresponding author:

Ricardo F Savaris, MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serv. Ginecologia e Obstetrícia

Rua Ramiro Barcelos, 2350/1124

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-903

ORCID 0000-0002-2779-5443

Email: rsavaris@hcpa.edu.br

Capsule: In a setting with an 8.5% incidence of ectopic pregnancy (212/2495;95%CI=7.4% to 9.6%), the accuracy of the online algorithm is 98.9% (95%CI=98.4% to 99.3%).

Structured Abstract

Objective: To verify the accuracy of an online algorithm using Bayes' theorem for diagnosing ectopic pregnancy (EP) having hCG, ultrasound, and clinical data in a real cohort.

Design: A retrospective cohort study.

Setting: Gynecologic Emergency Unit (GEU) in a tertiary teaching hospital

Patients: First-trimester pregnant women who attended the GEU for any reason. Those that had <13 weeks of pregnancy, a) confirmed by a recent positive pregnancy test, b) a digital image/electronic report of transvaginal ultrasound (TVUS) from hospital database, and c) a follow-up with a pathology report or a clinical resolution of a confirmed pregnancy were included in the study. Clinical signs and symptoms, the presence of risk factors for ectopic pregnancy, the TVUS findings in each consultation, and the hCG levels were independent variables obtained from electronic medical records. From these data, the pre-test probability, based on clinical presentation and risk factors, and the likelihood ratio (LR) for each variable were calculated for their use in the algorithm, yielding a post-test probability (PTP).

Intervention: none

Main Outcome measure: the accuracy of the online algorithm to identify cases of ectopic pregnancy using clinical signs and symptoms, the presence of risk factors for ectopic pregnancy, the TVUS findings in each consultation, and the hCG levels. Ectopic pregnancy was the main outcome, confirmed either by pathology report, or by the presence of fetal heartbeat or gestational sac outside the uterine cavity.

Results: Between January 1, 2009, and December 27, 2016, 2495 patients were analysed, and the algorithm was applied to 2185 patients. The incidence of ectopic pregnancy was 8.5% (212/2495;95%CI=7.4% to 9.6%); 310 patients were excluded because they were submitted to surgery with decision thresholds <95%. The algorithm was applied in 2185 patients. Just one case remained inconclusive after 3 consultations, and it was considered as an error in prediction. The sensitivity, specificity, and accuracy values (95%CI) of the algorithm were 98.9% (96.1% to 99.8%), 98.9% (98.3% to 99.2%), and 98.9% (98.3% to 99.2%), respectively.

Conclusion: The accuracy of the algorithm is 98.9% (95%CI=98.4% to 99.3%), using a single center.

Online Nomogram

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1jStXIMBjbPyDf6_W0deKGGKQLZHU5EFAe8rLhNVPuJuY/edit?usp=sharing

Study funding/competing interest(s): This study was funded by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Grant 17-0224. All authors have no competing interests, except for BWM. BWM received financial research funding, not related to this study, from Ferring and Merck Merck KGaA.

Key words: ectopic pregnancy, ultrasonography, diagnosis, data accuracy, hCG-beta, Bayes Theorem

Introduction

Ectopic pregnancy (EP), defined as the presence of a gestational sac with or without embryo outside the uterine cavity, comprises 2% of all pregnancies (1); its incidence, however, is higher at emergency units, ranging from 6 to 16% (2). The current method for diagnosing EP is based on serum levels of hCG and transvaginal ultrasound (TVUS), which is the diagnostic tool of choice (3).

It is possible that clinical decisions can be approved with an objective approach. One example is the use of Bayes' theorem (4). Bayes' theorem describes the probability of an event, based on prior knowledge of conditions that might be related to the event. This means that the theorem gives us the probability of having a condition, given the test is positive. To calculate this probability, the prevalence of the condition, along with the sensitivity and specificity of the test, are considered in the formula. The sensitivity and specificity of the test may be translated into the likelihood ratio. The result of this test will yield a post-test probability. With this post-test probability, a clinical decision will be made.

In cases with a hypothesis of ectopic pregnancy, transvaginal ultrasound and hCG are the main complementary tests used to make the diagnosis. The diagnostic performance of TVUS and the discriminatory zone of hCG should be evaluated in each center, due to local variations, either by the sonographer's expertise, or by the machine used for measuring serum hCG (5); hCG variation between consultations, nevertheless, deals with proportions and may have external validity. For instance, a reduction of hCG after 2 days between 1% and 35% has a likelihood ratio of 16.6 (6,7), while a reduction of more than 50% reduces the likelihood ratio to near zero (8). In 1999, our group published an algorithm with probabilistic decision rules using a theoretical cohort (9). Unfortunately, the numbers generated in the algorithm, derived from the Bayes theorem,

and the sequence of exams proposed in our original publication, are seldom used in clinical practice, because it implies several calculations. For these reasons, an online calculator, following Fagan's nomogram, that integrates Bayes' theorem, (10) may facilitate these calculations. The objective of this study was to verify the performance of an online algorithm for diagnosing ectopic pregnancy using a real cohort of first trimester patients attending a Gynaecological Emergency Unit in southern Brazil. This calculator will consider the risk of EP based on clinical data, the likelihood ratio of TVUS findings, and hCG levels (for the discriminatory zone and variations) of this population.

Methods

Rationale of the study

This study has several steps before the application of the algorithm. The diagnostic performance of TVUS and the discriminatory zone of hCG were calculated in our institution, since there is a variation in each center, as explained above. The determination of the discriminatory zone (DZ), LR of TVUS for diagnosing an EP, the LR of the DZ according to TVUS findings, the risk of having an EP according to the clinical symptoms, either with or without risk factors, were calculated and presented in the supplement. All these data were combined and used in the online algorithm.

Ethical approval

Ethical approval was obtained by the Internal Review Board at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) under the number CAAE 70915317000005327.

Study design

This retrospective cohort was derived from electronic data records of all pregnant women that attended the Gynecological Emergency Unit and digital images of TVUS before the outcome of the pregnancy.

Participants

All first-trimester pregnant women who presented at the Gynaecologic Emergency Unit at HCPA, Porto Alegre, Brazil, between January 1, 2009, and December 30, 2016, and underwent a TVUS for any reason were potentially eligible for this study. Possible reasons included asymptomatic patients desiring confirmation of their pregnancy, vaginal bleeding, pain or dysuria. Patients were included if they had a) a confirmed diagnosis of pregnancy with a recent positive pregnancy test (either urinary or serum hCG, within 1 week), b) an electronic report of TVUS from our hospital database, and c) a follow-up with a pathology report or a clinical resolution of confirmed pregnancy, i.e., spontaneous miscarriage. Eventually, the studied population included pregnant women with a diagnosis of intrauterine pregnancy (IUP), spontaneous miscarriage (SM), ectopic pregnancy (EP), and pregnancy of unknown location (PUL) that evolved either to EP (PUL-EP), intrauterine pregnancy (PUL-IUP), or to miscarriage (PUL-SM).

The exclusion criteria were as follows: those without follow-up in the hospital to complete the algorithm; women with ≥ 13 weeks of pregnancy, according to the last menstrual period and/or by TVUS; with hypovolemic shock; massive abdominal free fluid (fluid above the line of the uterus); acute abdomen; elimination of products of conception per cervical os on arrival at the GEU; with TVUS and hCG reports from another institution, that made the attending physician to advise surgery. All women were

observed according to standard care if no diagnosis was made in the first consultation. Standard care consisted in reevaluation every 2 days, with TVUS and serum hCG levels, until a definitive diagnosis was obtained, reaching a maximum of 7 consultations. Eventually, the population consisted of consecutive women attending the GEU with normal IUP, with SM, EP, and PUL that evolved to IUP (PUL-IUP), to miscarriage (PUL-SM), or to EP (PUL-EP). For the purpose of the study, the outcome was divided into 2 groups, EP (cases of EP and PUL-EP) and No EP (cases of IUP, SM, PUL-IUP, PUL-SM).

Risk factors and clinical symptoms

Clinical symptoms were obtained from the patient's electronic records and included vaginal bleeding and/or pelvic pain. To increase sensitivity and generalizability of its application, no scale was adopted to quantify pain or vaginal bleeding. These data were considered as a binary outcome. Risk factors were based on our previous publication, namely, previous tubal surgery, previous EP, history of pelvic inflammatory disease, and infertility. A threefold increase in risk was observed with the presence of a risk factor (10).

Transvaginal Ultrasound and hCG values

The TVUS examination findings and hCG values were obtained from the participant's electronic records. In cases of PUL, hCG levels were measured according to the GEU protocol. Briefly, women were asked to return every 48 hours for new TVUS examination and serum hCG levels were evaluated in cases of PUL, until a final diagnosis was reached, varying between 2 and 7 consultations.

Test methods

Index test

The index test was the online algorithm. Details of the mathematical formulas used in the freely available online algorithm are described in Table 1. The index test employs the use of clinical information (11).

Reference standard

The final diagnosis of the EP and miscarriage was made by histopathological report. Pathologists were not aware of the results of the algorithm. For IUP, and complete SM, without histopathological report, the reference standard was TVUS.

Rationale for choosing the reference standard and Definition of and rationale for result categories of the reference standard

The histopathological report was elicited as a reference standard for the diagnosis of EP and SM, because it has been considered the gold standard (3). The diagnosis of complete miscarriage was made in women with mild or no pain, with light or no bleeding, having an endometrial thickness <15 mm, after a gestational sac was visualized in a previous and recent TVUS (12, 13). The presence of intrauterine fetal heartbeat or a gestational sac (with the double decidual sign with or without the yolk sac) in TVUS was diagnostic of IUP.

Definition of and rationale for pre-specified positivity cut-offs result categories in the index test

A pre-specified post-test cut-off of $\geq 95\%$ and $< 1\%$ were considered for diagnosing and excluding ectopic pregnancy, respectively. These cut-offs were arbitrarily chosen. Post-test values between 1% and 95% were considered for follow-up

consultation, until a definition was reached. If no definition was reached after the 7th consultation, it was considered as "not defined".

Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test

Clinical information and reference standard results were available to the readers of the algorithm.

Analysis

Testing the mathematical algorithm was performed in all cases with simultaneous use of Google sheets (Google LLC, Menlo Park, CA) filters, the steps are depicted in Table 1. Pretest and posttest probabilities (PTP) and posttest odds of the algorithm were calculated simultaneously. The PTPs were filtered according to prespecified cut-offs, and an outcome was assigned. Cases with posttest values between 1% and 95% were considered for follow-up consultation, until a definition was reached. After the 3rd step of the consultation (day 2), the model followed the adjusted signs and symptoms, in the presence or not of risk factors, TVUS findings and hCG levels according to TVUS findings. If no definition was reached after the 7th consultation, it was considered as "not defined" and computed as a diagnostic error. To reduce bias, the column with the reference standard was hidden; calculations for sensitivity, specificity, and accuracy of the algorithm were performed using the pivot table function.

Statistical analysis was performed using 95% confidence intervals (CIs) for accuracy, sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values. GraphPad Prism version 8.3.1 for Mac (GraphPad Software, San Diego, California USA) was used for calculations.

Sample Size Calculations

The sample size was calculated for accuracy of a test based on the literature (14). The following parameters, reported by Richardson et al. (15), were used: sensitivity and specificity as 95%, with a precision 4%, i.e., 91%–99%, using 95% CI and an expected incidence of EP of 8%. The expected incidence of 8% was based on our previous publication (10). These figures yielded a minimum sample size of at least 1438 cases.

Results

Participants

Between January 1, 2009 and December 30, 2016, a total of 2,495 were potential candidates for the study. Of these, 310 were excluded for not having the inclusion criteria, yielding 2,185 women for analysis (Supplemental Fig 3, available online). Details of the study population, signs, and symptoms by the outcome are depicted in Table 2. The incidence of EP was 8.5% (212/2495; 95% CI = 7.4%–9.6%). A total of 362 women were asymptomatic at first consultation. Of these, the incidence of EP was 1.7% (6/362 asymptomatic; 95% CI = 0.7%–3.5%). The incidence of EP in those with pain, bleeding, and pain and bleeding was 13.3% (49/369; 95% CI = 10%–17.1%), 2.6% (23/896; 95% CI = 1.7%–3.8%), and 15.4% (134/868; 95% CI = 13.2%–18%), respectively (Table 2).

The number of visits, with TVUS and hCG test, of the 2185 patients are depicted Figure 1. Details of individual patients and the following consultations, with their respective outcomes, are in the [Harvard Dataverse repository](#), in the tab "tree viewer" (16).

Results of the algorithm

A total of 2495 patients were eligible to test the algorithm; 310 cases were excluded from the analysis (Supplemental Fig. 3); 27 cases of EP (PUL-EP) were excluded due acute abdomen (n=10), hypovolemic shock (n=4), TVUS and hCG from another clinic that, in combination to local TVUS and hCG, the attending physician sent the patient directly to surgery (n=3), and the presence of massive free fluid in the abdomen (n=10). All cases had the diagnosis of EP; details are in Supplemental Table 4 (available online); 278 cases of pregnancy of unknown location that evolved to spontaneous miscarriage (PUL-SM) and 5 cases of PUL-IUP were excluded for not having the inclusion criteria (Supplemental Fig. 3). After removing 310 cases, 2185 cases were analyzed. One case of PUL-SM had a post-test probability of 3% of EP after the 7th consultation, and the algorithm was not able to predict the outcome above or below the decision threshold. This case was considered as a prediction error of the algorithm (Supplemental Fig. 3). The accuracy of the model was 98.9% (95%CI=98.3% to 99.2%), as shown in Table 3. Supplemental Figure 4 depicts receiving operating characteristics curve of the algorithm.

A sensitive analysis was performed by adding the excluded 27 cases of EP as misdiagnosis. The accuracy of the algorithm was reduced to 97.7% (95% CI = 96.9%–98.2%) (Supplemental Table 6). Of note, from the 22 cases that had a probability of EP, and they were not, surgery was performed in 7 women. The adnexal mass was a paratubal cyst (n = 2), a tubo-ovarian abscess/salpingitis/tubal nodule (n = 3), a likely case of fimbrial EP that dislodged out of the fimbria, leading to a miscarriage (n = 1), a normal pelvis (n = 1). Further details are in Supplemental Table 5.

Examples of the algorithm are given.

Case 1

A woman arrives with complaints of pelvic pain and vaginal bleeding; she has no risk factors. Her PTP is 15% and TVUS reveals an adnexal mass, without free fluid (LR = 38); with these findings, the PTP is 87%, next, hCG levels were ordered and the result was 590 mUI/mL, i.e., below the DZ and the LR = 13, the PTP of EP was 98.8%. She was sent for a laparoscopy and an EP was identified (case 1).

Case 2

A woman was asked to return multiple times, despite the thresholds for excluding EP was already reached. In the first consultation, she had complaints of pain and vaginal bleeding, a history of infertility as a risk factor; these findings yielded a PTP of 46%. Her TVUS was normal (LR = 0.07), making her PTP as 5.63%; serum hCG from the day was 342.6 mUI/mL (LR = 1) and she was oriented to return in 48 h. In the second consultation, she was still having complaints of pain and vaginal bleeding, making her adjusted PTP as 49%. The second TVUS was normal (LR=0.07), thus her posttest probability was 6.3%. The second hCG level was 167 mUI/mL, a reduction of 51.25% (LR = 0), making her diagnosis as SM. However, this woman had 3 more consultations, and, eventually, the diagnosis of SM was made (case 2).

Discussion

The incidence of EP was 8.5% (95%CI= 7.4% to 9.6%) and it is in accordance with other populations analyzed (17,18). The accuracy, sensitivity and specificity of the proposed algorithm was revealed 98.9%, 98.9% and 98.9%, respectively. These values are within the range of our original theoretical cohort (8).

These results may be explained by the similar LR of TVUS findings, hCG thresholds, and similar incidence of EP based on signs, symptoms, and risk factors

described in the literature. Of note, 10.7% (22/205; 95% CI = 7.1%–15.7%) of the false positive results, according to the algorithm, were similar to the theoretical cohort, i.e., 17% (19/111; 95% CI= 1.2%–25.2%). The analysis of the actual outcome of the incorrect diagnoses, using our algorithm - (Supplemental Table 5), reveals that, despite the high PTP, 8 unnecessary surgeries were performed of which 6 were justified based on our opinion. The laparoscopic findings revealed the presence of a tubal abscess or inflammation node (n = 3), a paratubal cyst (n = 3), and normal in 2 cases. In these 2 cases, hCG levels were above 2000 mUI/mL; one evolved to a normal IUP and the other was a PUL-SM, confirmed with a pathology report. The remaining 14 cases were not sent to laparoscopy. One of these women is the one without the diagnosis (Figure 1). Eventually, it was a PUL-SM, and she had a 3% chance of EP. Two other cases were probably fimbrial EP that dislodged out of the fimbria, leading to miscarriage with spontaneous resolution (Supplemental Table5; #12 and #14). Further details of the 22 false positive cases can be seen in Supplemental Table 5.

A sensitivity analysis was performed, and the 27 cases of EP, initially excluded, were added as false negative cases. The accuracy, considering the worst-case scenario, dropped from 98.9% to 97.7% (Supplemental Table 6).

The construction of the mathematical model used several steps to calculate the LRs used in the algorithm. Most of our LR results for TVUS findings, hCG thresholds were in accordance with those found in the literature (15, 19). The positive LR for the presence of free fluid was lower but within the CI, when only high-quality studies were considered (15). Possible explanations for this difference can be elucidated by the fact that we considered any presence of free fluid as a positive finding. It is known that a small amount of free fluid is considered physiological in nonpregnant women; however, in the clinical context of a woman with a positive pregnancy test, the incidence of free

fluid is low (20). The low threshold for defining the presence or not of free fluid was chosen to be applied broadly in clinical practice. The same low threshold was applied to pain level. Women with mild pain during the physical exam were considered as positive for pain. The application of a dichotomous variable increases the sensitivity and allows others to use it broadly. This binary outcome has been used by others for assessing abdominal pain and free fluid (21, 22).

Women with severe pain, hypovolemic shock, or with the presence of massive free fluid in the pelvis, above the level of the uterus, had a straightforward diagnosis. In our sample, women with these characteristics were sent directly to surgery; all had a confirmed EP by pathology report.

In the remaining cases, the algorithm herein has been very useful during the first consultation at the GEU. The example given in the result section (case 1) shows how the algorithm may help first consultation, compared with current literature (23). The algorithm proposed by Tulandi et al. would ask the woman to return in 2 days, whereas in our algorithm, the diagnosis was made in the first consultation.

In addition, good clinical practice suggests starting the consultation with history and physical exam. In our case, we sought the identification of risk factors, symptoms (pain), and the presence or not of vaginal bleeding. The next step is the transvaginal ultrasound. If an IUP is found, ordering serum hCG will add little information. In contrast, if no IUP is found, and no abnormal finding is observed outside the uterus, the level of hCG is important for the follow-up consultation. This approach is in accordance with the guidelines from the American College of Obstetricians and Gynecologists (24) and the Royal College of Obstetricians and Gynaecologist (3) on the use of the DZ. The American College states that the serum hCG level aids in the diagnosis of women at risk of EP. However, serum hCG values alone should not be used to diagnose an EP and

should be correlated with the women's history, symptoms, and ultrasound findings (24). In our model, we applied these considerations. For instance, an asymptomatic woman, without risk factors, with free fluid on TVUS, and an hCG above 2000 mUI/mL has a probability of 8% for having an EP, whereas the same case, but with an adnexal mass on TVUS, would have a 96% chance of EP. The former will be asked to return in 2 days, whereas the latter would be sent to laparoscopy for surgery (or treatment with methotrexate). The new aspect in our model is the use of the PTP of the first consultation to adjust the PTP in the follow-up consultation. The woman described above left the consultation with an 8% probability of having an EP. On her return, she has pain and bleeding. Using the adjusted PTP, instead of having a 15% chance of having an EP, based on pain+bleeding and no risk factors, now she has 21.8% (Table 1).

This study has some limitations. The use of a single center and the use of a single hCG kit reduce the external validity; additional validation is needed before clinical use in other centers. The PTP based on signs and symptoms, the performance of the ultrasound findings, and the DZ may not have external validation, because these data are derived from a single center. Therefore, care must be taken to apply our results to other hCG kits and settings. Of note, we used the Cobas HCG + β Elecsys 2010 Modular Analytics E170, from Roche Diagnostics, calibrated with the 4th International Standard for Chorionic Gonadotropin (code 75/589). It has been shown that different hCG kits may have a difference of up to 80% in the results, using the same sample (25). Therefore, care must be taken to apply our results to other hCG kits. It is advisable for other centers to have their own risk factors, hCG DZ, and the performance of TVUS for diagnosing EP, to change accordingly the LR values presented in Table 1. Another limitation is the use of a retrospective cohort; however, because we have a digital image of the TVUS on the initial consultation, and the outcome was associated to a robust,

prospectively obtained, gold standard, we expected to mitigate the bias inherent to this type of study design. The use of vaginal bleeding, abdominal pain, and the presence of free fluid as a dichotomous variable is another limitation of the study. However, other studies have been using pain and free fluid as a binary outcome (21, 22). Quantification of these variables would be difficult and would limit the application of the algorithm. Therefore, clinical impressions must be considered carefully by those who work at the GEU. Finally, extreme values, e.g., 0, are because of the mathematical calculations obtained in the algorithm, and they should be used with caution, thus the recommendation is consistent with “low probability.”

The strengths of this study are the proper sample size, the use of pathology reports and telephone calls for confirmation of the outcome, and the application of real emergency unit scenarios in women with or without symptoms. The GEU in Brazil is open and free; women arrive either spontaneously by themselves, or by an ambulance. Anonymized raw data is also available for further analysis. To our knowledge, we suggest a new adjusted PTP for a follow-up consultation and an online algorithm to calculate the probability of EP using the combination of clinical data, TVUS findings, and hCG values as well as variation. The online algorithm, after adjusting for local characteristics, may be used as a template for mobile apps. This app may assist emergency physicians when they are dealing with first-trimester bleeding.

Future studies, adding more consultations for analysis, the variations of hCG values after 4 and 7 days, compared with the first visit, advanced methods, such as machine learning and the confirmation of our model in a prospective cohort are open for future research.

Acknowledgments

The authors thank Victoria Frois Oss, Carolina Prediger, and Guilherme Coelho, medical students of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, School of Medicine, for helping in reviewing electronic images, Dr. Jair Ferreira, professor of Epidemiology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, School of Medicine, for his critical review and for suggesting the use of adjusted pretest probability.

References

1. V.N. Sivalingam, W.C. Duncan, E. Kirk, L.A. Shephard and A.W. Horne, Diagnosis and management of ectopic pregnancy, *J Fam Plann Reprod Health Care*, 37, 2011, 231–240.
2. H. Murray, H. Baakdah, T. Bardell and T. Tulandi, Diagnosis and treatment of ectopic pregnancy, *CMAJ*, 173, 2005, 905–912.
3. R.C.O.G. Green-top Guideline, Diagnosis and management of ectopic pregnancy: Green-top Guideline; No. 21, *BJOG*, 123, 2016, e15–e55.
4. G.H. Hall, The clinical application of Bayes' theorem, *Lancet*, 2, 1967, 555–557.
5. L.A. Cole, S. DuToit and T.N. Higgins, Total hCG tests, *Clin Chim Acta*, 412, 2011, 2216–2222.
6. B.W. Mol, P.J. Hajenius, S. Engelsbel, W.M. Ankum, F. Van der Veen, D.J. Hemrika, et al., Serum human chorionic gonadotropin measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy when transvaginal sonography is inconclusive, *Fertil Steril*, 70, 1998, 972–981.
7. B.E. Seeber, M.D. Sammel, W. Guo, L. Zhou, A. Hummel and K.T. Barnhart, Application of redefined human chorionic gonadotropin curves for the diagnosis of women at risk for ectopic pregnancy, *Fertil Steril*, 86, 2006, 454–459.
8. B.W. Mol, F. van Der Veen and P.M. Bossuyt, Implementation of probabilistic decision rules improves the predictive values of algorithms in the diagnostic management of ectopic pregnancy, *Hum Reprod*, 14, 1999, 2855–2862.
9. C.G.B. Caraguel and R. Vanderstichel, The two-step Fagan's nomogram: ad hoc interpretation of a diagnostic test result without calculation, *Evid Based Med*, 18, 2013, 125–128.
10. J.L.G. Teixeira, P. Rabaioli and R.F. Savaris, Sensitivity and specificity of a urinary screening test used in an emergency setting to detect abnormal first trimester pregnancies, *Am J Obstet Gynecol*, 212, 2015, :58.e1–5.
11. Nomogram for EP. Google Docs, Available at: 2022 https://docs.google.com/spreadsheets/d/1jStXIMBjbPyDf6_W0deKKGKQLZHU5EFAe8rLhNVPuJuY/edit?usp=sharing (Accessed 22 June 2022).
12. M. Wieringa-de Waard, J. Vos, G.J. Bonsel, P.J.E. Bindels and W.M. Ankum, Management

- of miscarriage: a randomized controlled trial of expectant management versus surgical evacuation, *Hum Reprod*, 17, 2002, 2445–2450.
13. S. Nielsen, M. Hahlin and J. Platz-Christensen, Randomised trial comparing expectant with medical management for first trimester miscarriages, *Br J Obstet Gynaecol*, 106, 1999, 804–807.
 14. K. Hajian-Tilaki, Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics, *J Biomed Inform*, 48, 2014, 193–204.
 15. A. Richardson, I. Gallos, S. Dobson, B.K. Campbell, A. Coomarasamy and N. Raine-Fenning, Accuracy of first-trimester ultrasound in diagnosis of tubal ectopic pregnancy in the absence of an obvious extrauterine embryo: systematic review and meta-analysis, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 47, 2016, 28–37.
 16. R. Savaris, Diagnosing ectopic pregnancy using the Bayes theorem: a retrospective cohort study, Available at: 2022
<https://dataverse.harvard.edu/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.7910/DVN/HSCP> KZ (Accessed 22 June 2022), 2021.
 17. T.G. Stovall, A.L. Kellerman, F.W. Ling and J.E. Buster, Emergency department diagnosis of ectopic pregnancy, *Ann Emerg Med*, 19, 1990, 1098–1103.
 18. D. Indig, A. Warner and A. Saxton, Emergency department presentations for problems in early pregnancy, *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 5, 2011, 257–261.
 19. K.T. Barnhart, C.A. Fay, M. Suescum, M.D. Sammel, D. Appleby, A. Shaunik, et al., Clinical factors affecting the accuracy of ultrasonography in symptomatic first-trimester pregnancy, *Obstet Gynecol*, 117, 2011, 299–306.
 20. Z.J. Hussain, R. Figueroa and N.E. Budorick, How much free fluid can a pregnant patient have? Assessment of pelvic free fluid in pregnant patients without antecedent trauma, *J Trauma*, 70, 2011, 1420–1423.
 21. C. Moore, W.M. Todd, E. O'Brien and H. Lin, Free fluid in Morison's pouch on bedside ultrasound predicts need for operative intervention in suspected ectopic pregnancy, *Acad Emerg Med*, 14, 2007, 755–758.
 22. A. Alvarado, A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis, *Ann Emerg Med*, 15, 1986, 557–564.
 23. T. Tulandi, D. Levine, C.A. Schreiber and A. Chakrabarti, Ectopic pregnancy: clinical manifestations and diagnosis, 2022, UpToDate, Available at: 2022.
<https://www.uptodate.com/contents/ectopic-pregnancy-clinical-manifestations-and-diagnosis> (Accessed 2 March 2022).
 24. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Gynecology, ACOG Practice Bulletin No. 193: Tubal ectopic pregnancy, *Obstet Gynecol*, 131, 2018, e91–e103.
 25. L.A. Cole, Specificity of Different hCG Assays, In: *Human Chorionic Gonadotropin*, 2010, Elsevier, 237–245.

Article Footnotes

C.A.L. analyzed and interpreted the data. J.M. reports acquisition of data. B.W.M. received financial research funding, not related to this study, from Ferring and Merck Merck KGaA. K.T.B. analyzed and interpreted the data. R.F.S. has contributed substantially in the study conception and design, analyzed and interpreted the data, as well as drafted the article after revising it critically for important intellectual content.

Supported by a grant (17-0224 [R.F.S.]) from Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) and by a grant (302448/2018-7 [R.F.S.]) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Figure legends

Figure 1. Outcome for 2495 patients after using the algorithm for diagnosing ectopic pregnancy. One case (*) had a post-test probability of 3% of ectopic pregnancy after the 3rd TVUS and the algorithm was not able to predict the outcome above or below the decision threshold. This case was considered as an error prediction of the algorithm. Eventually, the outcome was a spontaneous *miscarriage*. EP=ectopic pregnancy, No EP= no ectopic pregnancy.
PUL-EP=pregnancy of unknown location that evolved to ectopic pregnancy;
PUL-SM=pregnancy of unknown location that evolved to spontaneous *miscarriage*;
PUL-IUP=pregnancy of unknown location that evolved to an intrauterine pregnancy.

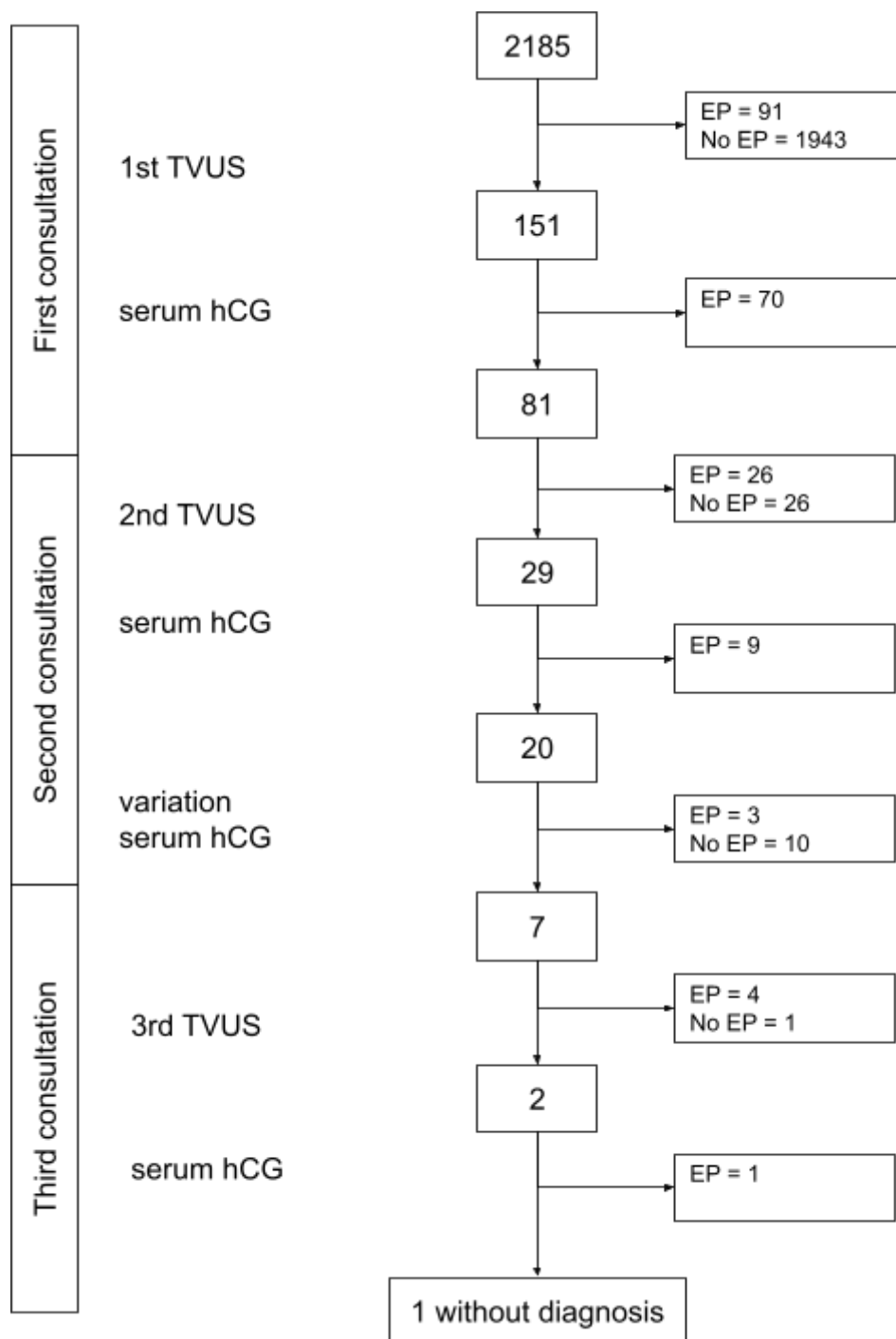


Table 1. Protocol and algorithm used for diagnosing ectopic pregnancy using the Bayes theorem. Post-test probability $< 1\%$ exclude the diagnosis, and $\geq 95\%$, confirm the diagnosis.

Visit	Protocol management		
Day 1	1. Identify signs, symptoms and risk factors and establish pre-test probability (v1).		
	Clinical signs and symptoms (pre-test probability)	Without risk factor	With risk factor

	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>asymptomatic</td> <td>0.017</td> <td>0.05</td> </tr> <tr> <td>Bleeding (any presence)</td> <td>0.03</td> <td>0.08</td> </tr> <tr> <td>Pain (any degree)</td> <td>0.13</td> <td>0.40</td> </tr> <tr> <td>pain+bleeding</td> <td>0.15</td> <td>0.46</td> </tr> </tbody> </table> <p>Calculate pre-test odds $\text{Pre-test odds} = \text{pre-test probability} \div (1 - \text{pre-test probability})$</p> <p>2. Perform transvaginal ultrasound, identify ultrasound findings, and calculate post-test odds and post-test probability (v1a). $\text{Post-test odds} = \text{pre-test odds} \times \text{LR}^{\text{TVUS}}$ $\text{Post-test probability} = \text{post-test odds} \div (1 + \text{post-test odds})$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>TVUS finding</th> <th>Likelihood Ratio</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>normal</td> <td>0.07</td> </tr> <tr> <td>Free fluid - any amount</td> <td>2.4</td> </tr> <tr> <td>Adnexal mass</td> <td>38</td> </tr> <tr> <td>Adnexal mass + free fluid</td> <td>47</td> </tr> </tbody> </table>	asymptomatic	0.017	0.05	Bleeding (any presence)	0.03	0.08	Pain (any degree)	0.13	0.40	pain+bleeding	0.15	0.46	TVUS finding	Likelihood Ratio	normal	0.07	Free fluid - any amount	2.4	Adnexal mass	38	Adnexal mass + free fluid	47
asymptomatic	0.017	0.05																					
Bleeding (any presence)	0.03	0.08																					
Pain (any degree)	0.13	0.40																					
pain+bleeding	0.15	0.46																					
TVUS finding	Likelihood Ratio																						
normal	0.07																						
Free fluid - any amount	2.4																						
Adnexal mass	38																						
Adnexal mass + free fluid	47																						
	<p>3. If threshold >1% and <95%, measure quantitative hCG. Verify if hCG values are below or above the discriminatory zone and calculate post-test probability (v1b). $\text{Post-test odds} = \text{pre-test odds} \times \text{LR}^{\text{TVUS}} \times \text{LR}^{\text{hCG}}$ $\text{Post-test probability} = \text{post-test odds} \div (1 + \text{post-test odds})$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>TVUS finding</th> <th>LR hCG <2000</th> <th>LR hCG ≥2000</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Normal</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Free fluid - any amount</td> <td>1.8</td> <td>2.1</td> </tr> <tr> <td>Adnexal mass</td> <td>13</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>Adnexal mass + free fluid</td> <td>17</td> <td>55</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. If threshold >1% and <95%, ask the patient to return in 2 days.</p>	TVUS finding	LR hCG <2000	LR hCG ≥2000	Normal	1	1	Free fluid - any amount	1.8	2.1	Adnexal mass	13	45	Adnexal mass + free fluid	17	55							
TVUS finding	LR hCG <2000	LR hCG ≥2000																					
Normal	1	1																					
Free fluid - any amount	1.8	2.1																					
Adnexal mass	13	45																					
Adnexal mass + free fluid	17	55																					
Day 2	<p>1. Identify signs and symptoms and risk factors (v2a). Take post-test probability of visit 1 (v1b) and apply the formula for pre-test in visit 2: $\text{Adjusted pre-test probability} = [(1 - v1b) \times (v2a)] + v1b$ Calculate pre-test odds: $\text{Pre-test odds} = \text{pre-test probability} \div (1 - \text{pre-test probability})$</p> <p>2. Perform transvaginal ultrasound, identify ultrasound findings, and calculate post-test probability (v2b). As in visit 1.</p> <p>3. If threshold >1% and <95%, measure quantitative hCG. Verify if hCG values are below or above the discriminatory zone and calculate post-test probability (v1b), as in visit 1.</p> <p>4. if threshold >1% and <95%, verify the variation of hCG between visit 1 and visit 2, and calculate the post-test probability, according to the variation (v2c). $\text{Post-test odds} = \text{pre-test odds} \times \text{LR}^{\text{TVUS}} \times \text{LR}^{\text{hCG}} \times \text{LR}^{\text{hCG variation}}$ $\text{Post-test probability} = \text{post-test odds} \div (1 + \text{post-test odds})$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variation of hCG between consultations (2 or more days)</th> <th>LR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Reduction ≥1% and <35%</td> <td>16.6</td> </tr> <tr> <td>Reduction ≥35% and <50%</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>Reduction ≥50%</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Any rise</td> <td>3.3</td> </tr> <tr> <td>Not available</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>5. if threshold >1% and <95%, ask the patient to return in 2 days.</p>	Variation of hCG between consultations (2 or more days)	LR	Reduction ≥1% and <35%	16.6	Reduction ≥35% and <50%	0.8	Reduction ≥50%	0	Any rise	3.3	Not available	1										
Variation of hCG between consultations (2 or more days)	LR																						
Reduction ≥1% and <35%	16.6																						
Reduction ≥35% and <50%	0.8																						
Reduction ≥50%	0																						
Any rise	3.3																						
Not available	1																						
Day 3	<p>Identify signs and symptoms and risk factor (v3a) Take post-test probability (v2c) and apply the formula for pre-test in visit 3: $\text{Adjusted pre-test probability} = [(1 - v2c) \times (v3a)] + v3a$</p>																						

	2. Perform transvaginal ultrasound, identify ultrasound findings, and calculate post-test probability (v3b), as in visit 1.2.
	3. If threshold $>1\%$ and $<95\%$, verify the variation of hCG between visit 1 and visit 3, and calculate the post-test probability, according to the variation (v2c), as in visit 2.4

Table 2. Characteristics of the studied population according to the outcomes (n=2495).

Numbers are n (%), except where otherwise stated.

Patient characteristics	Ectopic n=212	No Ectopic n=2283	p-value	Total n=2495
Age years median (range)	30.1 (16.3 to 44.8)	27.8 (13.4 to 48)	0.0002 ^a	
Gestational age median (range)	6.8 (5 to 9.3)	7.5 (5 to 12.6)	0.1 ^a	1759 ^f
Ethnicity				
White	167 (78.8)	1734 (76)	0.4 ^b	
Not white	45 (21.2)	549 (24)		
Risk factor ^{d,e}				
No	118 (5.2)	2143 (94.8)	<0.001 ^b	2261 ^e
Yes	94 (40.2)	140 (59.8)		234 ^e
Signs and symptoms at 1 st consultation ^e				
asymptomatic	6 (1.7)	356 (98.3)	<0.001 ^c	362 ^e
pain	49 (13.3)	320 (86.7)		369 ^e
bleeding	23 (2.6)	873 (97.4)		896 ^e
Pain+ bleeding	134 (15.4)	734 (84.6)		868 ^e

^a Mann-Whitney test

^b Fisher's exact test

^c Chi-squared for tendency

^d previous tubal surgery, previous EP, history of pelvic inflammatory disease, and infertility.

^e percentages are related to the line. For instance, 1.7% (6 out of 363) of the asymptomatic patients had ectopic pregnancy.

^f only 40 cases of ectopic pregnancy and 1719 cases of no ectopic pregnancy had confirmed gestational age by ultrasound. The remaining cases did not have an embryo/fetus visible by ultrasound and they were considered as not available.

Table 3. Performance of the algorithm for diagnosing ectopic pregnancy.

Predicted(n)	Actual (n)		Sens.	Spec.	PPV	NPV	Accuracy
	ectopic	No ectopic					
ectopic	183	22					
No ectopic	2	1978	98.9	98.9	89.2	99.9	98.9
95%CI lower			96.1	98.3	84.2	99.6	98.3
95%CI upper			99.8	99.2	92.8	99.9	99.2
Total (n)	185	2000					

Sens.: sensitivity

Spec.: specificity

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

SUPPLEMENT OF THE ARTICLE

Methods to reach the Likelihood Ratio of different tests

Transvaginal Ultrasound

All subjects underwent a TVUS (index test) using a 4-9 MHz probe (Philips HD11 XE Ultrasound Machine, Koninklijke Philips N.V., Netherlands). Ultrasound scans were performed by the hospital staff (medical residents supervised by attending physicians). Images were taken and stored electronically in a central database (AGFA IMPAX SE, Omaha, NE, USA), following guidelines (1). This database has been prospectively maintained since January 1, 2007, as part of an ongoing quality improvement project with stored digital images and videos.

Digital images, ultrasonographic reports, and patients' electronic records were reviewed by 3 researchers assistants (VO, GC, and CP) with cross-check validation by a researcher (JM). Any disagreement between the digital image and ultrasound reports, or between researchers, were reviewed and interpreted by a board-certified radiologist.

The clinical information, but not the result of the final outcome for the patient, was available for hospital staff who performed the TVUS and to researchers that transcribed the ultrasound report into our database. Pathologists were not aware of the ultrasound findings.

The TVUS findings (index test) of this study were classified according to the presence or absence of the following findings (2) **a**) adnexal mass (either a cystic or a solid homogeneous/heterogeneous mass apart from the ovary), **b**) free fluid (any presence of fluid in cul-de-sac), **c**) when both adnexal mass and free fluid were visualized, **d**) ectopic fetal cardiac activity (E-FCA), **e**) an ectopic gestational sac (E-GS) without cardiac activity, **f**) pregnancy of unknown location (no intrauterine or

extrauterine findings), **g**) an intrauterine gestational sac without embryo, and **h**) the presence of an embryo inside the intrauterine gestational sac.

The outcome for each patient (i.e., the reference standards) was defined as **1**) IUP: gestational sac or embryo/foetus were identified within the uterus **2**) spontaneous miscarriage (SM): fetal heartbeat not visualized after 7 weeks of gestational age, an embryo was not visualized on gestational sac > 25 mm of mean diameter, an absence of an IUP after a previous TVUS showing an IUP, identification of products of conception on uterine evacuation, or complete resolution of hCG from the serum **3**) EP: visualization of ectopic gestational sac with yolk sac or embryo/foetus with or without cardiac activity by TVUS, or confirmed surgical pathologic specimens of products of conception obtained from outside the uterine cavity. Women with a pregnancy of Unknown Location (PUL) were followed until an outcome was reached. Outcomes included: a) an IUP (PUL-IUP), b) EP (PUL-EP), c) SM (PUL-SM) with an endometrial thickness <15 mm with mild or no pain and light or no bleeding, with significant reduction of hCG after 4 days of the first consultation (3), or after a confirmed IUP in a recent TVUS, and d) persistent PUL (PUL-P), defined as when >3 serial serum human chorionic gonadotropin (hCG) levels change less than 15%, while the location of the pregnancy remains unclear using TVUS (4). For statistical purposes, outcomes were further dichotomized into EP and no EP. No EP included SM, IUP, PUL-IUP, PUL-SM, and PUL-P, while EP included EP and PUL-EP.

Indeterminate index test (TVUS) was handled by a senior researcher (RS), and absence of reference standard (outcome) in the electronic medical record was dealt with contacting patients directly.

hCG assay

Serum hCG was collected and processed within 1 hour in an automatized system (Cobas hCG+ β Elecsys 2010 Modular Analytics E170, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) calibrated with the 4th International Standard for Chorionic Gonadotropin (code 75/589). The hCG detection range was between 0.1 to 10000 mUI/mL. The inter- and intra-assay precision (defined by the percentage coefficient of variation (%CV) of the method was 2.8 and 4.6, respectively. Blood samples for measuring hCG levels were drawn on ± 1 day of the ultrasound (index test).

Distribution of all outcomes stratified by hCG levels and establishment of the discriminatory zone

All outcomes were plotted against different thresholds (< 500, 501-999, 1000-1499, 1500-1999, 2000-2499, 2500-2999, 3000-466, 3500-3999, 4000-4499, 4500-4999, 5000-5499, 5500-5999, ≥ 6000). The analysis of the hCG discriminatory zone was determined by considering only cases of PUL-IUP. The first cut-off from the PUL-IUP cases without cases was considered as the discriminatory zone (DZ). From this cut-off, it would be expected to find a normal IUP.

Performance of TVUS findings according to discriminatory zone

After identification of the DZ, the LR of each ultrasound finding (free fluid, adnexal mass, free fluid+adnexal mass) for diagnosing an EP was analyzed considering hCG values above or below the DZ.

Performance of hCG variation according to the difference in days

The likelihood ratio on the variations of hCG was obtained from the literature (5,6). Briefly, a reduction of hCG after 2 days > 50%, a reduction between 35% and 50%, a reduction between 1% and 35%, and any rise had a likelihood ratio of 0, 0.8, 16.6 and 3.3, respectively.

Statistical Analysis

Performance of TVUS findings, hCG values according to the DZ and TVUS findings were analyzed using sensitivity, specificity, positive, and negative likelihood ratios with their 95% confidence interval. Percentages were given with a 95% confidence interval. The diagnostic accuracy of TVUS findings was estimated in a 2x2 table for each abnormal finding, compared to normal findings (pregnancy of unknown location without the presence of free fluid or adnexal mass).

Values of hCG that were missing, in the presence of TVUS with a gestational sac or IUP, were replaced by reagent. Descriptive analysis included calculation of the incidence of each outcome in the total population. The DZ was identified using different thresholds of hCG and cross-referenced with the outcome. The threshold with the first empty cell in the PUL/IUP columns was considered as the DZ.

Results of different methods

Between January 1, 2009, and December 30, 2016, a total of 6102 TVUS were ordered as potential tests for the study. From these, 2990 were excluded for not having the inclusion criteria, yielding 3112 TVUS for analysis. These TVUS were originated from 2495 patients.

Performance of TVUS findings

The performance of the ultrasonographic exams for diagnosing ectopic pregnancy based on the ultrasound findings is depicted in Figures 3 and 4 in the supplement.

The presence of free fluid + adnexal mass in the initial TVUS exam had the highest LR+ (LR+= 47; 95%CI=26 to 86), except for ectopic fetal cardiac activity and ectopic gestational sac, which were pathognomonic. The performance of the presence or absence of an IUP finding in all 3112 TVUS is depicted in Table 3 supplement.

Establishment of the discriminatory zone

All outcomes were plotted against different hCGs thresholds. Based on these data, the level of hCG that visualized all normal intrauterine gestation and no PUL-IUP was 2000 mUI/ml; this cut-off establishes the discriminatory zone (Table 2 supplement).

Performance of TVUS findings according to discriminatory zone

After removing cases of qualitative hCG, ectopic fetal cardiac activity or extrauterine gestational sac, those without hCG and cases with IUP, a total of 565 patients remained and had their qualitative hCG compared to TVUS findings (Table 5 supplement). The highest likelihood ratio was the presence of an adnexal mass in women with hCG \geq 2000 mUI/ml (LR+=55;95%CI=7.8 to 383). Further details are depicted in Table 5 supplement.

Supplement media

A short video explaining the methodology may be accessed by QRCode,



or by the following link:

https://drive.google.com/file/d/1cPyM8IPU_3xPIMq2sTabJDHKTeMn_exL/view

References supplement

1. AIUM Practice Guideline for the Performance of Pelvic Ultrasound Examinations. *J Ultrasound Med* [Internet] 2010;29(1):166–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.7863/jum.2010.29.1.166>
2. Barnhart K, van Mello NM, Bourne T, Kirk E, Van Calster B, Bottomley C, et al. Pregnancy of unknown location: a consensus statement of nomenclature, definitions, and outcome. *Fertil Steril* [Internet] 2011;95(3):857–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.006>
3. Cameron KE, Senapati S, Sammel MD, Chung K, Takacs P, Molinaro T, et al. Following declining human chorionic gonadotropin values in pregnancies of unknown location: when is it safe to stop? *Fertil Steril* [Internet] 2016;105(4):953–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.050>
4. Bobdiwala S, Al-Memar M, Farren J, Bourne T. Factors to consider in pregnancy of unknown location. *Womens Health* [Internet] 2017;13(2):27–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1745505717709677>
5. Mol BW, Hajenius PJ, Engelsbel S, Ankum WM, Van der Veen F, Hemrika DJ, et al. Serum human chorionic gonadotropin measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy when transvaginal sonography is inconclusive. *Fertil Steril* [Internet] 1998;70(5):972–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00278-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00278-7)
6. Seeber BE, Sammel MD, Guo W, Zhou L, Hummel A, Barnhart KT. Application of redefined human chorionic gonadotropin curves for the diagnosis of women at risk for ectopic pregnancy. *Fertil Steril* [Internet] 2006;86(2):454–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.12.056>

Table 1 supplement. Performance of ultrasonographic findings for diagnosing ectopic pregnancy, based on Figure 1, without considering fetal cardiac activity and ectopic gestational sac (n=57), intrauterine pregnancy (n=2026). Numbers are the values of the performance (95%CI). LR+= positive likelihood ratio; LR- = negative likelihood ratio. Results of sensitivity and specificity can be achieved using numbers on EP and No EP, compared to (PUL) normal.

US finding	Sensitivity	Specificity	LR+	LR-	EP (n)	No EP (n)
Free Fluid	62 (48 to 74)	74.3 (71 to 77)	2.4 (1.8 to 3)	0.51 (0.3 to 0.7)	31	201
Adnexal Mass	64.2 (50 to 75)	98.3 (96 to 99)	38 (20 to 73)	0.36 (0.2 to 0.5)	34	10
Free Fluid + Adnexal Mass	88.2 (82.3 to 92.3)	98.1 (96 to 98)	47 (26 to 86)	0.12 (0.08 to 0.18)	142	11
PUL (normal)					19	581

Table 2 supplement. Range of serum hCG concentrations and the presence or absence of gestational sac in 3112 serial transvaginal ultrasounds. Numbers represent individual cases of TVUS findings according to hCG thresholds. The shaded area identifies the discriminatory zone. This cut-off was defined since all normal intrauterine gestation and no PUL-IUP was identified below the 2000 mUI/ml; SM = spontaneous miscarriage, EP=ectopic pregnancy, IUP= intrauterine pregnancy, PUL-SM, pregnancy of unknown location that evolved to spontaneous abortion, PUL-EP, pregnancy of unknown location that evolved to ectopic pregnancy, PUL-IUP, pregnancy of unknown location that evolved to an intrauterine pregnancy.

Outcome Threshold	Ectopic	IUP	PUL-EP	PUL-SAB	PUL/IUP	SAB	Total
hCG positive	22	1071	29	427	7	724	2280
<500	8	8	47	171	20	9	263
500-999	3	4	42	35	7	6	97
1000-1499	2	8	14	20	2	3	49
1500-1999		8	23	17	5	5	58
2000-2499	2	4	18	13		2	39
2500-2999	1	9	7	7		5	29
3000-3499	1	3	2	7		2	15
3500-3999	1	4	3	3		4	15
4000-4499		6	3	2			11
4500-4999		4	2	1		1	8
5000-5499		7	3	2		1	13
5500-5999	2	4	3	1		2	12
6000+	15	93	30	55		30	223
Total	57	1233	226	761	41	794	3112

Table 3 supplement. Performance of ultrasound findings in 566 exams according to the hCG thresholds. Calculations were using a 2x2 table. For example, cases with free fluid + adnexal mass and hCG <2000 had EP=79 and No EP=9 and were compared to normal TVUS, which had EP=11 and No EP=167.

Ultrasound finding	hCG threshold (mUI/ml)	Sensitivity	Specificity	LR+	LR-	EP (n)	No EP (n)
Free Fluid	< 2000	63 (45 to 78)	64 (58 to 69)	1.8 (1.29 to 2.43)	0.6 (0.35 to 0.92)	19	93
	≥ 2000	64 (41 to 82)	68 (58 to 77)	2.1 (1.3 to 3.32)	0.51 (0.27 to 0.99)	11	28
Adnexal Mass	< 2000	61 (42 to 76)	95 (91 to 97)	13 (6.3 to 28)	0.42 (0.26 to 0.65)	17	8
	≥ 2000	71 (50 to 86)	98 (91 to 99)	45 (6.32 to 320)	0.29 (0.15 to 0.57)	15	1
Free Fluid + Adnexal Mass	< 2000	88 (79 to 93)	95 (91 to 97)	17 (9 to 33)	0.12 (0.07 to 0.22)	79	9
	≥ 2000	0.87 (0.73 to 0.93)	98 (91 to 99)	55 (7.8 to 383)	0.13 (0.06 to 0.29)	39	1
PUL (Normal)	< 2000			0.14 ^a (0.08 to 0.26)		11	167
	≥ 2000			0.13 ^a (0.06 to 0.27)		6	62

LR+: positive likelihood ratio; LR-: negative likelihood ratio; EP= ectopic pregnancy; No EP: no ectopic pregnancy

^a The LR+ of a normal pregnancy for not having an EP was calculated by adding all TVUS abnormal findings, compared to normal cases. For instance, for normal findings and hCG <2000, we compared the sum of abnormal findings of EP (19+17+79) and No EP (93+8+9) to normal TVUS (EP=11 and No EP=167).

Table 4 supplement. Characteristics of 27 cases of ectopic pregnancy that were excluded. PTP = post-test probability, FF=free fluid, AM = adnexal mass, FF+AM = free fluid and adnexal mass, TVUS = transvaginal ultrasound findings, US = ultrasound, D&C =dilation and curettage, FAST= focused abdominal sonography trauma.

Case #	signs and symptoms	Risk factor	TVUS findings	hCG levels	PTP (%)	observations
1	Pain	No	FF	5744	42.9	After 3 hours of the arrival, pain levels increased to intense levels, leading to acute abdomen
2	Pain+bleeding	No	FF	4848	47.0	Patient had a TVUS performed outside the GEU showing a cornual EP; 2 weeks before she was admitted for D&C and pathology report was products of conception.
3	Pain+bleeding	No	FF	7403	47.0	Patient arrived in hypovolemic shock and FAST showed great amount of free fluid
4	bleeding	No	FF+AM	positive	59.2	US with massive amounts of free fluid in abdominal cavity
5	Pain	yes	FF	7241	77.0	Patient evolved to acute abdomen after the initial consultation
6	Pain+bleeding	yes	FF	112	78.6	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity
7	Pain+bleeding	yes	FF	8240	81.1	patient had an EP 3 months before and she had the same intense pain.
8	Pain+bleeding	yes	FF	2161.1	81.1	Patient had 2 EP and had 2 hCGs with an increase of 36% between 4 days, from another laboratory. Attending physician decided to send to surgery
9	Pain+bleeding	No	AM	positive	87.0	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity, hemoglobin levels were 5.6 g/dL
10	Pain	No	FF+AM	positive	87.5	Patient arrived in hypovolemic shock and TVUS showed great amount of free fluid
11	Pain	No	FF+AM	positive	87.5	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity
12	Pain	No	FF+AM	positive	87.5	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity, hemoglobin = 9.2 g/dL
13	Pain	No	FF+AM	positive	87.5	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity and increased pain
14	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid

						in the abdominal cavity, culdocentesis was positive
15	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity
16	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity, culdocentesis was positive
17	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity and increased pain
18	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity and rebound tenderness
19	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity and increased pain
20	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity and intense abdominal pain
21	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity
22	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	TVUS with the presence of Bagel sign, and acute abdominal pain.
23	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity and intense abdominal pain
24	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity
25	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	89.2	US with massive amounts of free fluid and intense abdominal pain
26	Pain+bleeding	No	FF+AM	positive	0.892	US with massive amounts of free fluid in the abdominal cavity
27	Asymptomatic	No	FF+AM	992	93.2	Patient had serial hCG from another service showing an abnormal increase. The attending physician decided to send to surgery

Table 5 supplement. Characteristics of 22 cases of false positive cases of ectopic pregnancy. PR= pathology report; D&C = dilation and curettage; FF= free fluid; AM= adnexal mass; CL = corpus luteum; IUP= intrauterine pregnancy; PID=pelvic inflammatory disease; PUL-SM= pregnancy of unknown location that evolved to spontaneous miscarriage; TA= Tubal abortion.

The table is displayed in lines, and each paragraph from "observations" is related to one consultation. For instance, Case#9; patient had 5 days earlier obtained from another clinic. She went to GEU and the attending physician just ordered an hCG on day 1 and asked her to return the next day. She returned 2 days later with abdominal pain, and the ultrasound showed an adnexal mass. She was sent to laparoscopy, and a paratubal cyst and multiple adhesions, sequelae of PID, were found.

Case #	signs and symptoms	Risk factor	TVUS findings	PTP (%)	observations
1	Pain	yes	FF+AM	96.9	PR (day 1): Salpingectomy - fallopian tubes with inflammation, no evidence of ectopic pregnancy patient returned in 5 days and she was submitted to D&C PR (day 5): from D&C: products of conception
2	Pain+bleeding	no	AM	99.7	hCGs (day 1): 2047.6 mUI/ml - laparoscopy, normal PR (day 3) from D&C: products of conception
3	Asymptomatic	no	FF+AM	99.8	hCG (Day 1): reagent hCG (Day 2): 140.9 mUI/ml hCG (Day 4): 497.2 mUI/ml hCG (Day 8): 2824.2 mUI/ml - laparoscopy - normal TVUS (Day 29) IUP 6 weeks of pregnancy
4	Pain	no	AM	98.7	hCG (Day 1): 256.1 mUI/ml Presence of adnexal abscess; patient did not inform that an illegal abortion was performed. During the laparoscopy, an abscess was found. Adnexectomy was performed; PR=tubo-ovarian abscess
5	bleeding bleeding Asymptomatic Asymptomatic	no	FF AM	11.7 92.3 98.8	hCG from other clinic Day -3 > 1000 mUI/ml hCG (Day 1): 129.1 mUI/ml hCG (Day 4): 127.5 mUI/ml hCG (Day 6): 128.7 mUI/ml hCG (Day 8): 98.3 mUI/ml - patient refused to perform laparoscopy PUL-SAB, with follow-up
6	Pain Asymptomatic	no	FF+AM IUP	99.1 0	hCG (Day 1): 361 mUI/ml hCG (Day 3): 1044.2 mUI/ml hCG (Day 6): 4573.6 mUI/ml hCG (Day 11): 21968.3 mUI/ml - not sent to laparoscopy, AM was the CL
7	Pain Pain	no	Normal AM	1.04 98.8	hCG (Day 1): 38 mUI/ml hCG (Day 2): 213.8 mUI/ml

			IUP		Day 2 - Attending physician disagrees with TVUS report, AM was likely to be CL Day 11: IUP not sent to laparoscopy, AM was the CL
8	Asymptomatic Asymptomatic	no	FF+AM FF IUP	97.1	hCG (Day -2) 68 mUI/ml (another clinic) hCG (Day 1) 203.7 mUI/ml - Attending physician decided to observe, asked to return in 2 days. hCG (Day 2) 546 mUI/ml - sent to laparoscopy, presence of a paratubal cyst Day 11 - IUP
9	Pain	yes	AM	99.7	hCG (Day -5) 47 mUI/ml (another clinic) hCG (Day 1) 49.9 mUI/ml hCG (Day 3) 45.9 mUI/ml - sent to laparoscopy, presence of a paratubal cyst and multiple adhesions, sequelae of PID
10	Pain+bleeding	no	FF+AM	99.3	hCG (Day -15) 23382 mUI/ml (another clinic) hCG (Day 1) 371.2 mUI/ml patient was not sent to laparoscopy. PUL-SM
11	Pain+bleeding bleeding	no	FF AM	43.2 96.9	hCG(Day 1) 161 mUI/ml hCG(Day 3) 48 mUI/ml - Attending physician decided to give more importance to hCG decreasing levels, than to the TVUS finding. not sent to laparoscopy, follow-up PUL-SM
12	Pain	no	FF+AM FF	99.2	hCG(Day 1) 13.1 mUI/ml Attending physician decided to observe, since patient was in good condition. asked to return in 2 days hCG(Day 2) Patient in good condition. hCG(Day 5): < 2 mUI/ml - not sent to laparoscopy, most likely a TA
13	Pain+bleeding Pain+bleeding Pain+bleeding	no	Normal Normal Normal	1.2 18.1 9.1 1.2 3.0	hCG(Day 1) 721.5 mUI/ml hCG(Day 3) 610 mUI/ml hCG(Day 5) 623 mUI/ml hCG(Day 11) 356.2 mUI/ml hCG(Day 20) 111.4 mUI/ml hCG(Day 39) 5.6 mUI/ml not sent to laparoscopy, most likely PUL-SM WITHOUT DIAGNOSIS
14	Pain+bleeding Pain+bleeding Bleeding Pain+bleeding Asymptomatic	yes	FF FF FF	78.63 96.3 99.7	hCG (Day 1): 409.8 mUI/ml hCG (Day 3): 260.7 mUI/ml - Attending physician asked the patient to return in 48h, since she was in good conditions- mild pain and bleeding Day 5 - Attending physician asked the patient to return in 7 days, since she was in good conditions- mild bleeding hCG (Day 11): 61.4 mUI/ml hCG (Day 13) 40.9 mUI/ml not sent to laparoscopy, most likely a TA
15	Pain+bleeding Pain+bleeding	yes	FF FF	81.1 95.5	hCG(Day 1): 3853 mUI/ml hCG (Day 3): 700 mUI/ml - the threshold was crossed with the TVUS result, but the reduction of hCG was more than 50%; the attending physician decided to follow. not sent to laparoscopy, follow-up PUL-SM
16	Pain+bleeding	no	AM	98.9	hCG (Day 1): 1390 mUI/ml -Attending physician

					had the impression that the adnexal mass was a dermoid cyst hCG (Day 7): 102.7 mUI/ml not sent to laparoscopy, follow-up SM
17	Pain	no	FF+AM IUP	99.2	hCG (Day 1): 258.7 mUI/ml - Attending physician asked the patient to return in 2 days without plausible justification. TVUS report was suggestive of EP hCG (Day 3): 559.6 mUI/ml not sent to laparoscopy
18	Pain+bleeding Bleeding Bleeding Bleeding Pain+bleeding Asymptomatic Asymptomatic	no	FF FF	43.2 98.7	hCG(Day 1): 99.2 mUI/ml hCG (Day 2): 120.5 mUI/ml hCG (Day 3): 109 mUI/ml hCG(Day 4): 84.4 mUI/ml hCG(Day 7): 69.3 mUI/ml -Attending physician decided to ask her to return in 48h, since she had no pain after analgesics. hCG(Day 9): 50.7 mUI/ml hCG(Day 13): 41.3 mUI/ml hCG (Day 20): 21.3 mUI/ml hCG (Day 24): 17.9 mUI/ml hCG (Day 31): 5.2 mUI/ml not sent to laparoscopy, follow-up PUL-SM
19	Pain	yes	AM IUP	99.7	hCG(Day 1): 517.5 mUI/ml - patient was discharged and asked to return next day for hCG result. Day 2: Outcome: an anembryonic pregnancy
20	bleeding	no	FF+AM	96.1	hCG 14/03/2014: 1816.8 mUI/ml Laparoscopy on the same day found a denser area in the mid portion of the fallopian tube - not ectopic pregnancy. After 2 weeks, hCG levels were negative.
21	Pain+bleeding Pain Asymptomatic Asymptomatic	yes	FF FF Normal Normal	78.6 98.3	hCG (Day -2): 87.6 mUI/ml (from another clinic) hCG (Day 127/11/2015): 190.6 mUI/ml- asked to return in 48 h hCG (Day 3)30/11/2015: 335.8 mUI/ml hCG (Day 14)11/12/2015: 7146 mUI/ml Laparoscopy did not find any EP, Day 46 hCG (Day 49)16/12/2015: 15500 mUI/ml hCG (Day) 04/01/2016 21752 mUI/ml hCG 19/8/2016: 178.8 mUI/ml follow-up , PUL-SM
22	Bleeding Asymptomatic Asymptomatic Bleeding	no	FF FF FF	11.7 68.5 96.9	hCG (Day -5): 71 mUI/ml (from another clinic) hCG (Day 1): 101.2 mUI/ml hCG (Day 2): 155.9 mUI/ml hCG (Day 4): 234 mUI/ml Eventually, the attending physician decided to observe. She returned in 1 week and it was a PUL-SM hCG (Day 11): 98.8 mUI/ml

Table 6. Sensitive analysis of the algorithm for diagnosing ectopic pregnancy after including the 27 cases of ectopic pregnancy that were sent directly to surgery.

Predicted(n)	Actual (n)		Sens.	Spec.	PPV	NPV	Accuracy
	ectopic	No ectopic					
ectopic	183	22					
No ectopic	2+27	1978	86.3	98.9	89.2	98.5	97.7
95%CI lower			81	98.3	84.2	97.9	96.9
95%CI upper			90.3	99.2	92.8	98.9	98.2
Total (n)	212	2000					

Sens.: sensitivity

Spec.: specificity

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

Figure 1 supplement. The outcome for 2495 patients after the initial transvaginal ultrasound findings. Values are n (%). FAC/GS=Fetal Cardiac Activity/Gestational Sac; SM= spontaneous miscarriage, EP=ectopic pregnancy, IUP= intrauterine pregnancy; PUL-EP=pregnancy of unknown location that evolved to ectopic pregnancy; PUL-IUP=pregnancy of unknown location that evolved to an intrauterine pregnancy; PUL-SM=pregnancy of unknown location that evolved to spontaneous miscarriage.

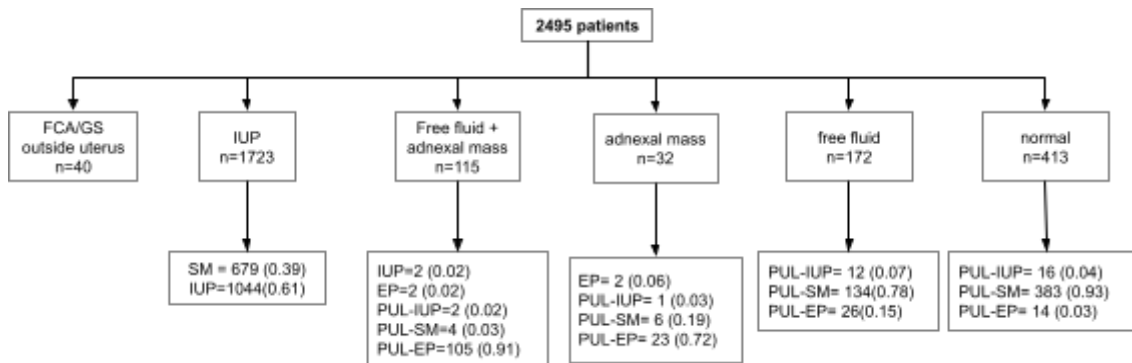


Figure 2 supplement. Flow chart of the performance of ultrasonographic findings for diagnosing ectopic pregnancy, considering all ultrasound scans. IUP on ultrasound included cases with and without fetal heartbeat. Numbers are different from patients, since patients performed more than one TVUS.

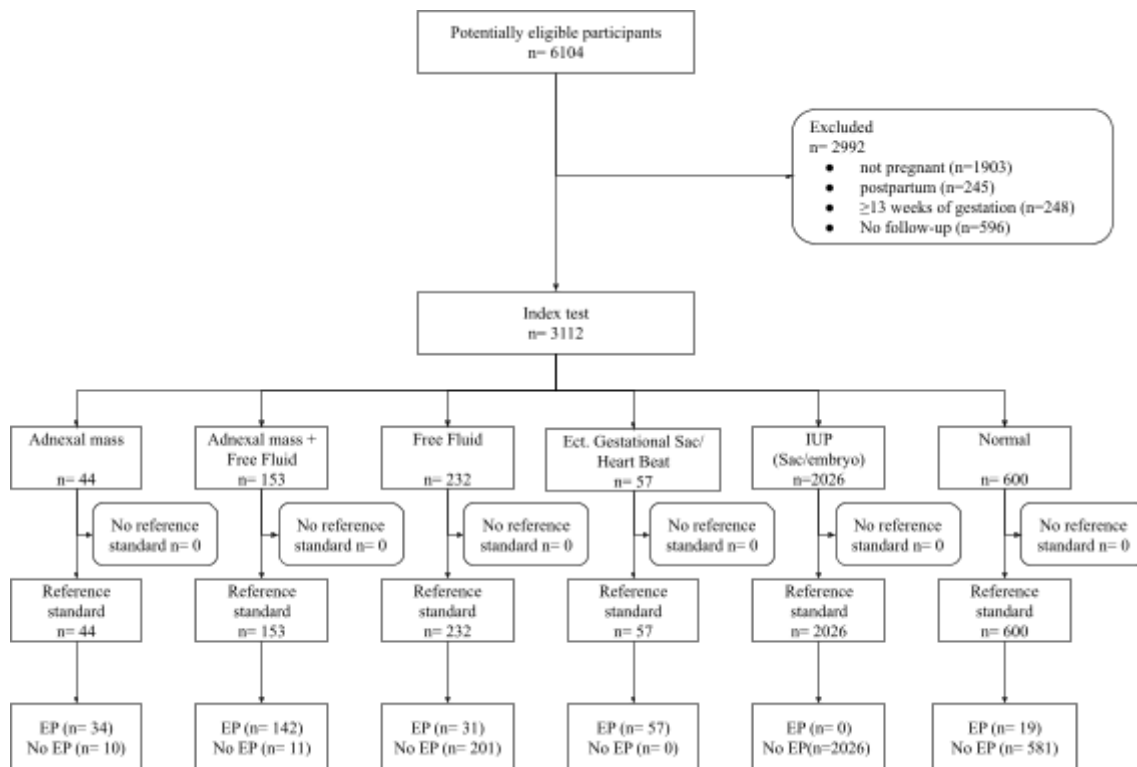


Figure 3 supplement. Outcome for 2495 women after using the algorithm for diagnosing ectopic pregnancy. One case (*) had a post-test probability of 3% of ectopic pregnancy after the 3rd TVUS and the algorithm was not able to predict the outcome above or below the decision threshold. This case was considered as an error prediction of the algorithm. Eventually, the outcome was a spontaneous *miscarriage*. EP=ectopic pregnancy, No EP= no ectopic pregnancy. PUL-EP=pregnancy of unknown location that evolved to ectopic pregnancy; PUL-SM=pregnancy of unknown location that evolved to spontaneous *miscarriage*; PUL-IUP=pregnancy of unknown location that evolved to an intrauterine pregnancy.

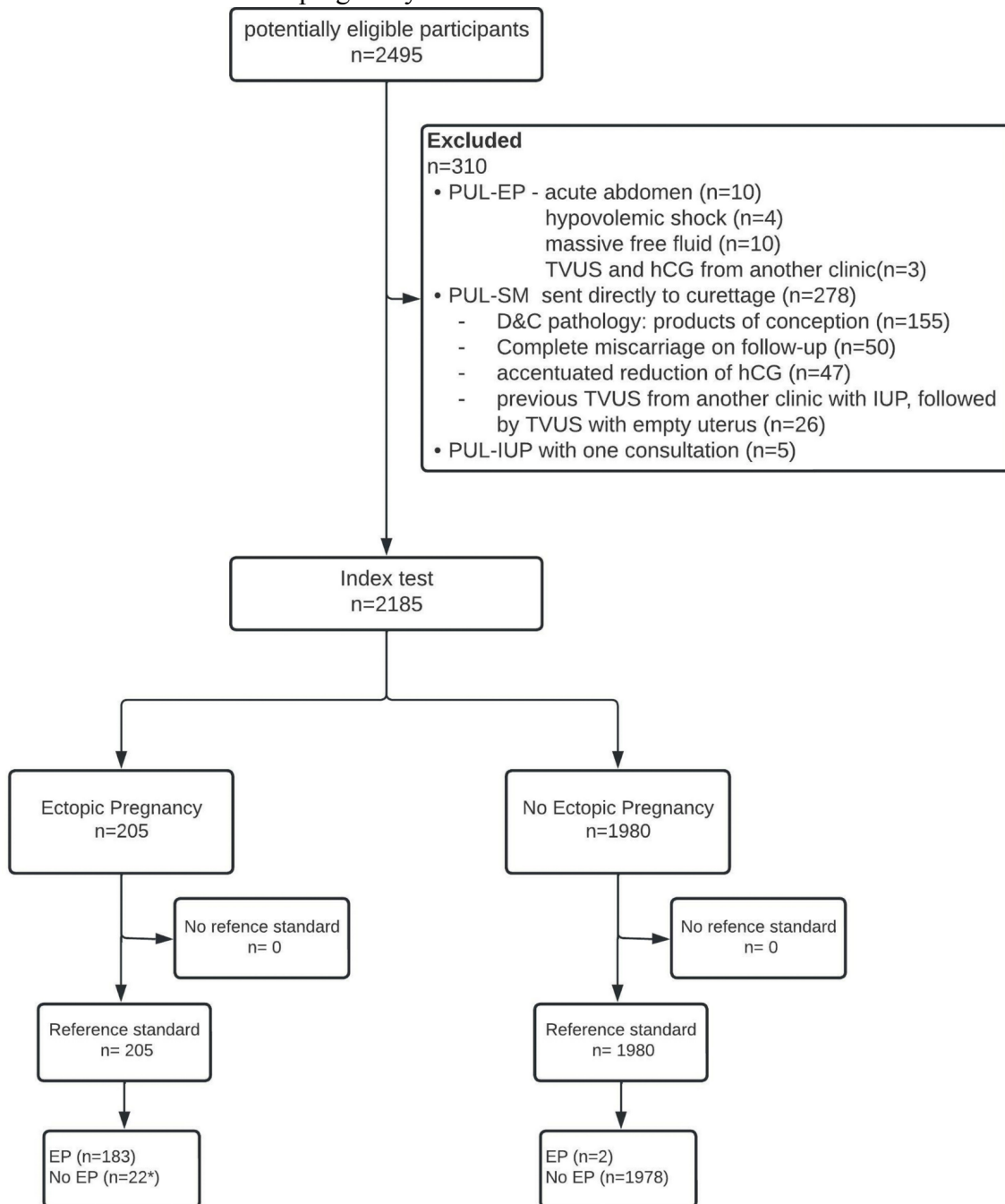


Figure 4. Receiving Operating Characteristics (ROC) curve of the algorithm for diagnosing ectopic pregnancy. Blue and black arrows represent the thresholds of 0.011 (best specificity), and 0.949 (best sensitivity) respectively. The red arrow represents 0.871 (best cut-off, balancing specificity, and specificity). This was not used in the study.

