

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Avaliação do teste Inexscreen® para o diagnóstico de gravidez
ectópica e Abortamento**

Doutorando: João Leandro Gambino Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Francalacci Savaris

Porto Alegre, 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Avaliação do teste Inexscreen® para o diagnóstico de gravidez
ectópica e abortamento**

Doutorando: João Leandro Gambino Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Francalacci Savaris

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

Porto Alegre, 2019

FICHA BIBLIOGRÁFICA

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, ao professor Doutor Ricardo Savaris pela enorme competência, paciência e a oportunidade que me foi dada de ingressar neste Programa de Pós-graduação da UFRGS.

Aos meus colegas de pesquisa do HCPA pelas portas abertas sempre que precisei.

Aos colegas do laboratório do HCPA pela dicas, pelo espaço e pela cobertura de trabalho afim de conseguir concluir todo o doutorado.

Agradeço também, a equipe da ginecologia da emergência do HCPA pelo apoio no momento das coletas de dados, aos colegas da coleta pela cobertura de trabalho, possibilitando assim a coleta de inúmeras pacientes, aumentando e qualificando mais o meu trabalho de conclusão.

Aos meus pais, irmãos, amigos pela compreensão das ausências devido a aulas, trabalhos e apresentações.

A minha esposa Aline pela ajuda fundamental para a confecção dos artigos, tese, apresentações e participação como colaboradora em tantos outros projetos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DA LITERATURA	15
JUSTIFICATIVA.....	31
OBJETIVOS	32
ARTIGO EM INGLÊS	33
ARTIGO EM PORTUGUÊS	37
ANEXOS	39
REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

GE- Gravidez Ectópica

AE - Aborto espontâneo

DIU - Dispositivo intrauterino

ART - Tecnologia de reprodução assistida

β hCG - Fração beta livre do hormônio hCG

MUC1 - Glicoproteína de superfície externa

CK - creatina quinase sérica total

PAPPA - Proteína plasmática a associada a gravidez

HPL - Lactogênio da placenta humana

PSG - Glicoproteína beta-1 específicas da gravidez

E2 - Estradiol

AFP - Alfa-fetoproteína

MUC 16 - Marcador tumoral (CA 125)

PDS - Cadeia pesada da miosina do músculo liso

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

LIF - Fator inibitório de leucemia

PP14 - Proteína placentária

PIGF - Crescimento placentário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura mostrando a Implantação normal do embrião no útero (gravidez normal) e falha na implantação do embrião na trompa de Falópio (página 17).

Figura 2 - Figura mostrando os locais onde ocorrem falhas na implantação do embrião (página 17).

RESUMO

O hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) e suas frações (α e β) a anos são alvos de estudos como biomarcadores de anomalias na gravidez. Dentro desse contexto, pesquisadores coreanos desenvolveram o Inexscreen©, um teste urinário comercial que utiliza essas frações para detectar anormalidades já no primeiro trimestre da gravidez. Segundo o fabricante, o diagnóstico é rápido e confiável em detectar uma possível gravidez ectópica ou abortamento, e isso seria de grande valia ao médico nos atendimentos de emergências ginecológicas, gerando assim uma grande economia ao sistema único de saúde e um diagnóstico mais rápido, evitando possíveis complicações a gestante. Nosso estudo de coorte observacional prospectiva foi realizado em mulheres com uma gravidez confirmada no primeiro trimestre, (idade gestacional <12 semanas). A viabilidade da gravidez e o teste de localização foram confirmados por ultrassom e/ou laparoscopia como padrão ouro. Foram aplicados o teste em 815 pacientes elegíveis para o estudo, 12 excluídos por não terem uma gravidez confirmada ou foram perdidos no seguimento. Assim, um total de 803 pacientes foram submetidos ao teste e acompanhamento completo. A probabilidade de pré-prova de uma gravidez anormal foi de 44% (9% para gravidez ectópica e 35% para aborto espontâneo). O teste apresentou os seguintes parâmetros para identificar uma gravidez anormal no primeiro trimestre (sensibilidade, 13%; intervalo de confiança de 95% [IC], 10-17; especificidade, 82%; IC 95%; 78-86; valor preditivo positivo; 36 IC 95%, 28-46, valor preditivo negativo, 54; IC 95%, 50-58; precisão, 47%, razão de verossimilhança positiva, 0,74; IC 95%; 0,53-1,03; razão de verossimilhança negativa, 1,06; 95% CI; CI, 1-1.12). A

reprodutibilidade do teste em nosso estudo foi alta (índice kappa entre leitores, 0,89; IC 95%, 0,77-1). Como conclusão os resultados apresentados em nosso trabalho (Em uma emergência), não foram possíveis para validar se o teste comercial é adequado para detectar ou excluir uma gravidez anormal no primeiro trimestre.

PALAVRAS-CHAVE: inxscreen; gravidez anormal; primeiro trimestre; gravidez; teste de triagem; sensibilidade; especificidade.

ABSTRACT

The hormone Beta hCG hormone and its fractions to years are targets of studies as a biomarker of abnormalities in pregnancy. Created from Korean researchers, Inexscreen[®], a commercial urine test, uses these fractions to detect these abnormalities and according to the manufacturer, the diagnosis is quick and reliable in predicting a possible ectopic pregnancy or miscarriage. This would be of great value to the doctor of gynecological emergencies, thus generating great savings to the single health system, and a faster diagnosis, avoiding possible complications to the pregnant woman. Our prospective observational cohort study was performed in women with a confirmed pregnancy in the first trimester, (gestational age <12 weeks). The viability of pregnancy and the localization test were confirmed by ultrasound and / or laparoscopy as gold standard. The test was applied to 815 patients eligible for the study, 12 excluded because they did not have a confirmed pregnancy (n = 6) or were lost at follow-up (n = 6). A total of 803 patients underwent the test and complete follow-up. The pretest probability of an abnormal pregnancy was 44% (9% for ectopic pregnancy and 35% for miscarriage). The test had the following parameters to identify an abnormal pregnancy in the first trimester (sensitivity, 13%, 95% confidence interval [CI], 10-17, specificity, 82%, 95% CI, 78-86, positive predictive value , 95% CI, 28-46, negative predictive value, 54, 95% CI, 50-58, precision, 47%, positive likelihood ratio, 0.74, 95% CI, 0.53-1.03; negative likelihood ratio, 1.06, 95% CI, CI, 1-1.12). The reproducibility of the test in our study was high (kappa index among readers, 0.89, 95% CI, 0.77-1). As a conclusion, the results presented in our paper (In an emergency) were not possible to validate if the

commercial test is adequate to detect or exclude an abnormal pregnancy in the first trimester.

KEY WORDS: inxscreen; abnormal pregnancy; first trimester; pregnancy; screening test; sensitivity; specificity.

INTRODUÇÃO

A gestação ectópica (GE) é uma doença abdominal aguda de grande relevância médica, sendo esta, uma das causas de mortes em mulheres grávidas. Apresenta uma incidência média de 1 a 2% de todas as gestações (1). O termo gestação refere-se ao processo de implantação e desenvolvimento de óvulos fertilizados, e se o óvulo fertilizado implantar em sítios além do útero, então é chamado de gestação ectópica (2) (3). Atualmente, a incidência de GE tende a ser maior de ano para ano, e a doença não é específica no estágio inicial, portanto, o diagnóstico precoce é de grande significado para garantir a vida das pacientes (2).

Uma vez confirmada a gravidez com a fração β do hormônio gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) (4), faz-se necessário identificar a localização e se o embrião está vivo. Dentre alguns sintomas que possam identificar uma GE, o sangramento uterino anormal no primeiro trimestre é um dos achados mais preocupantes nos atendimentos em emergências ginecológicas (5). As pacientes que apresentam diagnóstico de sangramento já no primeiro trimestre, devem ser imediatamente investigadas com relação a uma possível GE ou abortamento, pois entre esses dois diagnósticos, a GE é a principal causa de mortalidade materna no primeiro trimestre da gestação (6).

As prevalências de GE e abortamento são 1-2% e de 25% respectivamente, e o diagnóstico padrão ouro para a identificação de uma GE tem por base os exames de ultrassom e o β -hCG (7), sendo que em muitos casos, o acompanhamento ultrassonográfico e as dosagens seriadas do β -hCG são necessárias e repetidos por

várias vezes, o que aumenta o número de consultas na emergência ginecológica e os custos para o sistema de saúde.

Pesquisadores buscam constantemente novos biomarcadores afim de reduzir o tempo de diagnóstico de gravidez ectópica e abortamento, realizando assim, um diagnóstico final e preciso utilizando um método não invasivo baseado apenas em dosagens séricas, mas isso ainda continua sendo um desafio clínico (8). Dentre esses marcadores, estão as subunidades do hCG (fragmentos de hCG).

Baseando-se em estudos dessas subunidades, uma empresa sul-coreana em 2003 lançou no mercado Europeu o Inexscreen® (Humansis, Gyeonggi-do, 431-836, Coréia do Sul (9) com o intuito de diagnosticar os casos de gravidez ectópica e abortamento através de um teste rápido em amostras de urina. A presente tese tem como objetivo abordar os aspectos fisiopatológicos, os fatores de risco e os biomarcadores para gravidez ectópica e por fim apresentará uma avaliação do teste Inexscreen®.

REVISÃO DA LITERATURA

GRAVIDEZ ECTÓPICA

A implantação de embriões é um pré-requisito importante para o estabelecimento bem-sucedido de uma gravidez, sendo que uma implantação fora da cavidade intrauterina e o desenvolvimento de uma GE, continua sendo uma das principais causas de morbidade materna e ocasionalmente mortalidade durante o primeiro trimestre (10). Uma melhor compreensão sobre os fatores de riscos da GE pode ajudar a prevenir a sua ocorrência que apresenta em média 2% de todas as gravidezes. Esse percentual é cinco vezes maior do que o registrado nos anos de 1970 (11), e apresenta a histórias de infecções na cirurgia tubária e o tabagismo como principais fatores de risco para o desenvolvimento da GE (sem contracepções)(12). Mais de 50% dos casos de GE são atribuíveis a esses dois fatores, surtindo um aumento sobre as taxas de GE em programas de prevenções médicas, além desses fatores de risco mais comuns, o uso de dispositivo intrauterino (DIU) desempenha um papel preocupante também na ocorrência de GE (10).

FISIOPATOLOGIA DA GRAVIDEZ ECTÓPICA

Pouco se sabe sobre as razões pelas quais em algumas gravidezes o implante dos embriões ocorre dentro da tuba de Falópio, enquanto que a maioria ocorre dentro da cavidade uterina (7). Na GE ocorre a implantação do blastocisto em locais onde não será possível seu desenvolvimento, como por exemplo no colo do útero, na porção intersticial da tuba de falópio, no ovário, no abdômen, e também na cicatriz de cesarianas, essa última representando menos de 10% de todas as GE (13). Estudos tem relacionado a GE a possíveis falhas do mecanismo de transporte tubário, no mecanismo de contração da musculatura ou até mesmo no movimento ciliar celular, o que levaria a um problema no transporte do embrião (7). Alternativamente, um aumento da receptividade epitelial tubária tem sido sugerida por alguns autores; como resultado, há um atraso no transporte do embrião nas tubas, a receptividade endometrial fica prejudicada com o implante ectópico que ocorre após o fracasso das interações biológicas normais entre o endométrio, e as tubas de Falópio (14). Os diferentes locais de implantação da gravidez ectópica encontram-se na Figura 1 e 2.

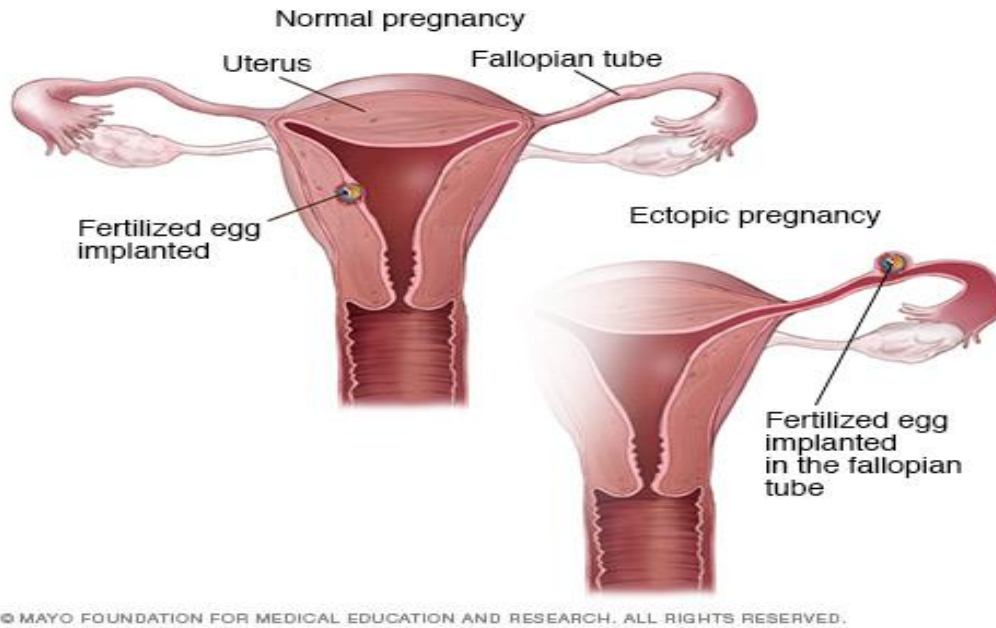


Figura 1: Implantação normal do embrião no útero (gravidez normal) e falha na implantação do embrião na trompa de Falópio (<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/ectopic-pregnancy/multimedia/normal-and-ectopic-pregnancy/img-20006402>).

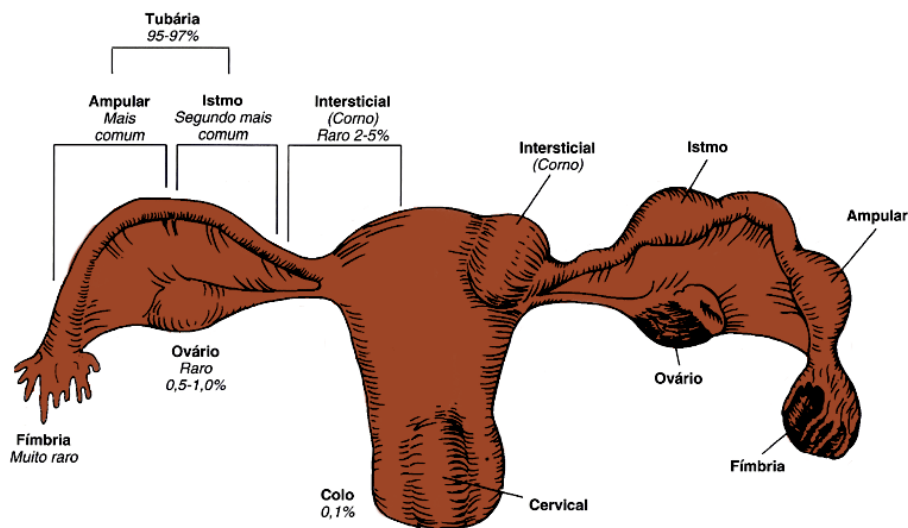


Figura 2: Locais onde ocorrem falhas na implantação do embrião (<https://www.fetalmed.net/gravidez-ectopica/>).

FATORES DE RISCO PARA GRAVIDEZ ECTÓPICA

Os fatores de risco nos casos de gravidez ectópica estão relacionados com a alteração no transporte do óvulo dentro da tuba de Falópio. Dentre eles estão, características sócio demográficas, infertilidade, uso prévio de certos tipos de contraceptivos, história de infertilidade, tabagismo, alterações anatômicas das tubas uterinas, cirurgias prévias na pelve e na tuba uterina, infecção do sistema reprodutivo, como a doença inflamatória pélvica, múltiplos parceiros sexuais, concepção oriunda de fertilização assistida, uso de dispositivo intrauterino, cesáreas prévias e tabagismo e endometriose (5, 15, 16).

Fatores sociodemográficos podem afetar pela prática a padrões alimentares específicos durante a gravidez (17). Em estudo retrospectivo realizado por Al-turki *et al.*, foi demonstrado que a idade também é um importante fator de risco para o desenvolvimento de GE, principalmente em mulheres que tiveram mais de um filho (18).

Algumas GE se resolvem espontaneamente, porém, outras continuam a crescer e podem levar à ruptura do tubo, estudos já vem demonstrando que em mulheres fumantes, os riscos de uma ruptura são bem maiores, (19) pesquisas comparativas entre a toxicidade do fumo a partir de diferentes tipos de cigarros, incluindo cigarros eletrônicos em relação a GE, são alvos de constantes debates, e as substâncias químicas presentes na fumaça podem prejudicar o funcionamento correto de vários órgãos, como também pode prejudicar o funcionamento do oviduto (19). O tabagismo é um dos fatores mais relevantes para o risco de GE também em adolescentes e isso deve ser levado em conta, apesar que a maioria dos

estudos apontam uma maior relação de incidências de GE em mulheres na fase adulta (20). Dados epidemiológicos demonstram que repetidamente mulheres que fumam têm um risco a uma maior variedade de problemas reprodutivos, a exposição a fumaça (fumante primário ou secundário), aumenta o risco de aborto espontâneo, GE, restrição do crescimento intrauterino, ruptura prematura de membranas, parto prematuro, hematoma retroplacentário, placenta prévia, e da morte súbita do lactente (21). Os efeitos do uso do tabaco pelas mães durante e após a gravidez também incluem o aumento do risco de aborto espontâneo repetidos, descolamento prematuro da placenta, ruptura prematura das membranas, baixo peso ao nascer, síndrome da morte súbita infantil, morte perinatal, e infância com distúrbios respiratórios (22). Os dois principais fatores de risco para GE sem contracepção são: Histórico de infecção ou cirurgia tubária e o tabagismo, quantitativamente, essas relações com o fator de risco para GE são praticamente as mesmas, e o risco atribuível total de todos estes fatores são de 76% (12).

A GE é uma complicação já conhecida no pós-tratamento de tecnologia de reprodução assistida (ART). Estima-se que a taxa de GE em gestações após o tratamento ART dobra em relação a gravidezes espontâneas. (23) infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* também são um achado importante e podem resultar em doenças sérias, incluindo a doença inflamatória pélvica, que pode gerar uma GE, e infertilidade (24). Assim como também o formato da tuba da Falópio continua sendo uma das chaves para compreender o processo de transporte do ovo ao sítio de fertilização. Além disso, existem inúmeras causas documentadas de infertilidade tubária: infecções (*Chlamydia trachomatis*, gonorréia e tuberculose genital), uso de DIU, endometriose e complicações após cirurgia abdominal, existem ainda muitas controvérsias sobre a etiologia da esterilidade tubária. A organização

mundial de saúde, (OMS) estima que a infertilidade afeta 50-80 milhões de mulheres no mundo, sendo que apenas 35% buscam ajuda, e dessas, a infertilidade tubária é creditada em 30% (19). Em estudos recentes as complicações nas tubas de Falópio estão definidas como um dos principais riscos para GE, em particular após a cirurgia corretiva tubária (26).

GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA

O hCG é o primeiro sinal hormonal a partir da placenta e trofoblasto para a mãe, é detectável no sangue materno dois dias depois da implantação (cerca de uma semana após a fecundação) e é utilizado no diagnóstico de gestação, tendo um papel essencial para a gravidez e adaptação materna (19).

O sinciciotrofoblasto é a principal fonte de produção de hCG cujo 99% é liberada no sangue materno, sendo que o hCG e sua fração beta livre, são detectados no sangue materno a partir da segunda semana de gravidez e os seus níveis aumentam até atingir um pico em cerca de 10 a 12 semanas (20). O hCG é metabolizado na placenta, sangue e rins e sete diferentes formas são detectados na urina (21). A medição no soro da subunidade β do hCG, ainda continua sendo o único biomarcador que é rotineiramente utilizado clinicamente para auxiliar no diagnóstico de GE, (22) essa fração beta e seus fragmentos, vem sendo extensivamente estudado como um biomarcador de GE nos últimos 30 anos.

ISOFORMAS β -hCG

Existe uma necessidade de biomarcadores amplamente aplicáveis ao resultado de β -hCG para estudos de base populacional que avaliam os riscos para a reprodução humana (50). Ao considerar biomarcadores de GE, deve-se observar as características do biomarcador ideal, bem como as etapas necessárias para trazer essa ferramenta para a área clínica. Como a localização da gravidez é determinada antes da detecção do hCG, o biomarcador ideal estaria presente no início do primeiro trimestre (26). O hCG não é uma única molécula biológica. Existe a forma regular de hCG produzida por células do sincitotrofoblasto diferenciadas (hCG regular) (27). Cole *et al*, relataram que o nível do fragmento β -core estaria reduzido em GE ou aborto espontâneo, quando comparada com mulheres grávidas normais (51). Estudos recentes também relatam que níveis muito elevados de β -core podem gerar resultados falsos negativos em testes de gravidez. (28)

BIOMARCADORES PARA GRAVIDEZ ECTÓPICA

Uma mulher com teste de gravidez positivo, que apresenta também dor abdominal e/ou sangramento vaginal, o médico certamente terá um trabalho extra para excluir com segurança a possibilidade de GE. A base do diagnóstico (padrão ouro), ainda é a ultrassonografia, ecografia vaginal e especialmente o uso do biomarcador β -hCG. Porém, o uso de subunidades β -hCG, em vez de hCG total podem ser úteis como teste único para detectar uma GE (3). Pesquisas apontam que dosagens de frações de β -hCG no soro e na urina, podem também identificar as mulheres com uma elevada probabilidade de gravidez ectópica ou abortamento, o que pode aumentar a vigilância, reduzindo o risco de ruptura das trompas (22).

Diferenciar gravidezes ectópicas de gravidezes intrauterinas pode ser um desafio e um dilema para o médico clínico, dado o perigo existente de ruptura das trompas de uma GE versus o medo de intervir no caso de uma gravidez desejada sem certeza do diagnóstico. Modalidades de diagnóstico precoce são claramente visíveis e marcadores biológicos estão sendo investigados como uma saída para um teste rápido e preciso para GE (23).

Além desses, inúmeros outros biomarcadores vem sendo estudados afim de diminuir o tempo do diagnóstico de uma GE ou abortamento e da ação médica em relação a paciente, a glicoproteína de superfície externa (MUC1) é uma delas. A imunexpressão de diferentes epítomos (externos e citoplasmáticos) da expressão de MUC1 é alterada em tubos com gravidez ectópica em comparação com tubos normais, sugerindo associação para explicar sua etiologia. Estudos demonstraram que o segmento do domínio externo é reduzido na GE, sugerindo que o MUC1 pode fornecer um mecanismo de proteção contra a GE (25). Outro biomarcador estudado, é a creatina quinase sérica total e suas isoformas e sua relação a casos de GE, Soundravally, *et al* em seus estudos demonstraram valores estatisticamente relevantes e podem ser auxiliares no diagnóstico rápido e preciso para diagnóstico de GE. (26) a proteína plasmática associada a gravidez (PAPPA) é uma outra glicoproteína produzida pelo trofoblasto e pesquisas já vem demonstrando que concentrações de PAPPA foram menores em pacientes com uma GE tubária quando comparado com a gravidez normal, o estudo demonstrou que PAPPA não apresentou níveis detectáveis em 84,8% das amostras de mulheres com gravidez ectópica tubária, mas também não foi detectável em 55% dos abortos espontâneos intrauterinos, o que indica que as concentrações de PAPPA no soro são muito baixas

antes da 7 semanas de gestação e em isolamento são poucos discriminativos entre o aborto espontâneo e GE (27).

O lactogênio da placenta humana (HPL), outro biomarcador estudado, pode ser detectado durante o primeiro trimestre e possui efeito somatotrópico nos tecidos fetais auxiliados por permitir o fornecimento de nutrientes ao feto. Estudos constataram que não houve diferenças nas concentrações séricas de HPL entre gravidezes ectópicas e normais, mas no entanto, um estudo subsequente, demonstrou que os níveis HPL foram menores em pacientes com gravidez ectópica tubária em comparação com a gravidez normal após a 7ª semana de gestação (28) (29, 30).

A glicoproteína beta-1 específicas da gravidez (PSG) são conhecidas pela sua elevada expressão durante a gravidez (31). É uma das primeiras proteínas da gravidez no soro detectáveis e ao contrário da imagem ultrasonográfica, os métodos bioquímicos permitem esclarecer a patogênese e o patomecanismo de gravidezes de alto risco, anomalias fetais e implantação fetal anormal. As dosagens de PSG sérica precoce podem ser muito útil apenas no prognóstico de gravidezes de localização desconhecida (32).

Outra importante proteína durante a gravidez é a activina A, que é liberada pelo ovário e placenta (33), mas no entanto, na gravidez, a principal fonte de secreção é o trofoblasto (34). Pesquisas recentes determinaram que os níveis de activina A em mulheres com gravidez ectópica tubária eram mais baixos do que aquelas com gravidez intrauterina e aborto espontâneo, mas infelizmente o desempenho e as diferenças significativas foram achadas após 7ª semanas de gestação (35). (36). A activina B apresenta valores também menores na gravidez

ectópica tubária, e podem diferenciar da gravidez normal com uma precisão moderada. Ela também mostra melhora do potencial de diagnóstico em associação com a fração livre do beta-hCG, mas é preciso estudos posteriores. (37)

Pouco se tem pesquisado a progesterona como um biomarcador de gravidez ectópica ou uma gravidez em local desconhecido. Foi inicialmente relatado, em um pequeno estudo de coorte, a qual todas as mulheres com gravidez ectópica tubária tiveram seus níveis de progesterona sérica 15 ng/mL, o que foi menor do que em mulheres com uma gravidez intrauterina viável (38), porém, um estudo realizado em torno do mesmo tema, os níveis de progesterona sérica, mostraram-se um valioso teste de diagnóstico para gravidez ectópica tubária. (39)

Outro marcador que se destaca é a inibina A, produzida pelo corpo lúteo e regulado pelo hormônio hCG (40, 41). A inibina A apresenta valores menores em mulheres com gravidez ectópica tubária do que em gravidezes intrauterinas em curso (42), e em dosagens séricas, seus valores caíram bem mais do os níveis de hCG após o tratamento para gravidez ectópica, devido à sua curta meia-vida (33). Em estudo prospectivo recente sugere-se que inibina A apresenta valores menores em gravidezes ectópicas e pode ser um marcador para identificar uma GE (43). É assim é um potencial biomarcador, porém, são necessários mais estudos para avaliar a sua utilidade na prática clínica (36).

O Estradiol (E2) também é produzido pelas mulheres em resposta ao hCG e também poderia funcionar como um biomarcador da dinâmica da gravidez. Um estudo preliminar em 205 mulheres confirmou que todas as gravidezes ectópicas apresentaram níveis de E2, relatando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 99%. (44) No entanto, outro estudo demonstrou que houve diferença no E2 no

soro quando as mulheres apresentavam fertilização nas trompas e também houve diferentes concentrações séricas de E2 em gravidezes ectópicas tubárias, quando comparado com gravidez intrauterina dosadas até 11 semanas de gestação (36). No entanto, avaliando a progesterona entre diferentes grupos, a sobreposição de valores foi discriminatória e o E2 não entrou como biomarcador na prática clínica (29). Ao contrário de outros marcadores de função do trofoblasto que são mais baixos em gravidezes ectópicas, foi estudada a hipótese de que alguns marcadores embrionários seriam lançados durante a implantação tubária anormal. A alfa-fetoproteína (AFP) é um produto tanto do saco vitelino, quanto do fígado fetal (45), mas um estudo inicial apontou que a AFP no soro foi elevada na gravidez ectópica tubária (46) mas entanto, um estudo posterior não confirmou este achado (29) e é conhecida em programas de rastreio no soro de ameaças de aborto que a AFP pode aumentar os níveis nas gravidezes de curso.

Alguns biomarcadores como o antígeno cancerígeno 125, tem sido utilizado na pratica clinica como um ótimo biomarcador para o carcinoma do ovário (47), no entanto, é utilizado em condições benignas com envolvimento peritoneal tais como endometriose e miomas uterinos. Também se sabe que está elevado durante a fase inicial de gravidezes e, por conseguinte, podem ser mais do que um marcador de irritação peritoneal ou inflamação. O marcador tumoral MUC 16 (CA125), também é utilizada em estudos de casos de gravidezes ectópicas, em um estudo de carcinoma de ovário, foram incluídos 15 casos de GE, porém todos tiveram baixas concentrações de MUC16 no soro (48). Quando dosado no início da gravidez, o MUC16 aumenta no início de gravidezes normais, (49) e em mulheres com gravidez tubária ectópica tiveram uma ampla gama de concentrações de MUC16, mas em geral elas eram mais baixas do que os observados em indivíduos normais (49). Outro

biomarcador estudado em várias pesquisas é a relaxina, que é um hormônio peptídico bem reconhecido e produzido pelo corpo lúteo durante a gravidez (50). Estudos demonstram que dosagens estão elevadas logo após a concepção e permanecem firme até a 15 semanas de gestação (51). Avaliações preliminares mostraram que as concentrações de relaxina sérica em mulheres que apresentaram gravidez ectópica tubária foram significativamente mais baixos do que naquelas com uma gravidez intrauterina viável (52). No entanto, 67 de 74 (91%) mulheres que apresentaram quadro de aborto espontâneo ou gravidez ectópica tubária tiveram baixas concentrações de relaxina e, como tal, foi praticamente descartada como biomarcador de gravidez ectópica

A renina assim como outros biomarcadores, vinha sendo muito pesquisada devido a seus valores séricos baixos estarem associados a mulheres com gravidez ectópica, quando comparada com aquelas com uma gravidez intrauterina em curso ou aborto espontâneo, (53) porém, apesar desse baixo nível de renina ativa (30 pg/ml), ela em combinação com baixos níveis de hCG poderiam prever uma gravidez ectópica tubária, mas sua especificidade de 76% e de o valor preditivo positivo de 75% sugeriram pouca utilidade clínica e estudos ficaram bem mais limitados (53). A desintegrina e metaloproteinase ADAM12 que pertence a uma grande família de moléculas, tem sido usada em pesquisas para tentar diferenciar uma GE (54), a ADAM 12 apresentou níveis baixos em GE e AE, e houve diferenças significativas em comparação com gestações normais. A ADAM12 é um marcador promissor para o diagnóstico de aborto espontâneo e gravidez ectópica em mulheres sintomáticas, e sob certas condições, ADAM12 pode diagnosticar gravidez ectópica e aborto espontâneo antes de uma detecção ultrassonográfica (48).

Existe sem dúvida uma necessidade de selecionar elementos imunológicos no soro materno, como potenciais biomarcadores, e alguns pesquisadores já vem demonstrando que os complexos de anticorpo como a cadeia pesada da miosina do músculo liso (PDS) e os níveis séricos de interleucina-15 (IL-15) podem desempenhar um papel na diferenciação abortos, GE e gravidezes normais, (49) assim como também o PDS possui uma boa utilidade para um prévio diagnóstico de GE, nesse caso, existe uma elevação estatisticamente significativa dos níveis séricos de PDS na gravidez tubária, embora pesquisas demostrem que o ensaio tem utilidade clínica muito limitada como um marcador solitário para a gravidez ectópica, necessitando outros como complemento, (55) já o (VEGF) fator de crescimento vascular endotelial não apresentou concentrações séricas significativas e também não vem demonstrando diferença estatisticamente significativa entre as mulheres que abortaram, dosagens de VEGF também não conseguiriam distinguir uma GE de um aborto espontâneo. No entanto, as concentrações de VEGF no soro poderiam discriminar uma gravidez intrauterina normal a partir de uma gravidez inviável (56).

O receptor de interleucina 2, que é uma proteína que regula as atividades das células brancas do sangue que são responsáveis pela imunidade também vem sendo estudada quanto a sua relevância como diagnóstico de GE., Soriano *et al* , realizaram estudo de coorte em 17 mulheres com GE, 22 com aborto espontâneo e 33 com gravidezes normais, sendo que o receptor de interleucina 2 não apresentou valores estatísticos, sugerindo mais estudos para determinar o seu valor como diagnóstico clinico fiel (57).

Publicações recentes sobre a combinação de biomarcadores vem crescendo ao longo dos últimos anos e parece ser a chave para desenvolver um biomarcador confiável para GE, os múltiplos testes de marcadores, que podem tirar proveito de diferentes mecanismos biológicos de um painel de biomarcadores, em vez de uma única proteína, provavelmente serão capazes de se diferenciar entre gestações normais e anormais (58). Aproveitando isso, vários pesquisadores têm se utilizado de combinações de vários marcadores em um único teste com melhores diagnósticos para GE. A combinação por exemplo das citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 eTNF-alfa foi capaz de detectar uma GE com especificidade de 100%, porém, com uma sensibilidade de 52,9%, a combinação de marcadores com múltiplas funções biológicas provou ser bem mais bem relevante e com maior poder estatístico para prevenção de GE (58). Uma outra associação entre o gene que codifica a gravidez, associada à proteína plasmática-A2 (PAPPA2), não teve nenhum efeito sobre o desempenho reprodutivo feminino. Em contraste, PAPPA2 mostrou melhor desempenho estatísticos em relação a fertilidade masculina, embora o mecanismo requer mais estudos e continua por ser elucidado (66).

A utilização de novos biomarcadores como as interleucinas, pode ser a chave para um diagnóstico que utiliza biomarcadores múltiplos, mesmo eles não possuindo uma capacidade de diagnóstico como marcadores individuais, (58) um exemplo de estudo de combinações foi o estudo publicado por Mulayim, *et al.* (2003), onde o principal mediador da resposta imune inata, a interleucina-8, foi dosado em células epiteliais do estroma das trompas, e apresentou uma variação significativa em resposta a citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-1 α e fator de necrose tumoral- α , o resultado disso, pode ser importante achado na patogênese da salpingite (59).

Outra citocina o LIF (fator inibitório de leucemia) que é uma citocina pleiotrópica da família da interleucina-6 que possui ações biológicas em vários tecidos e tem como uma de suas funções, a regulação do crescimento e diferenciação de células estaminais embrionárias, células germinativas primordiais, os neurónios periféricos, os osteoblastos, os adipócitos e células endoteliais. A LIF é essencial para o sucesso da implantação do embrião e a sua expressão aumentada nas culturas de células do estroma das tubas pelas citocinas inflamatórias sugere uma ligação entre o implante e salpingite ectópica (60).

A proteína placentária (PP14) vem sendo descrita por muitos pesquisadores independentes, as suas aplicações clínicas e medições não são limitadas apenas a doenças uterinas, mas também incluem o cancro (marcadores tumorais) e gravidez (gravidez molar e gravidezes extrauterinas). Os níveis relativamente altos de PP14 em pacientes hysterectomizadas indicam GE (61, 62). Segundo estudo realizado por Nylund, *et al.*, a PP14 e o hCG em combinação exibem valores alterados durante uma implantação anormal que pode ser clinicamente útil (63).

A descoberta de micro RNAs no sangue materno foi um grande achado e não só facilitou a compreensão de seu papel na gravidez normal, mas também a descoberta de biomarcadores para detectar complicações associadas à gravidez, como a pré-eclâmpsia e gravidez ectópica (64). Miura, *et al.* demonstrou que microRNAs possuem um grande potencial como marcadores moleculares de gravidez ectópica (65). Patrelli, *et al.*, em estudo utilizando o fator de crescimento placentário (PIGF), pesquisou um grupo de 163 pacientes e um grupo de 214 pacientes grávidas controle durante todo o período gestacional, demonstrou que os valores achados não foram influenciados pela idade biológica, mas tinham relação

com a idade gestacional, PIGF, revelou um aumento particularmente após a 20^a semana de gestação e não apresentou uma estatística significativa em relação à gestação fisiológica espontânea, ameaça de abortos e em gravidezes ectópicas, conclui-se que o PIGF pode desempenhar um papel diagnóstico e prognóstico na gravidez, mas serão necessário estudos posteriores para compreender melhor o significado da variabilidade dos seus valores (66). Em outro estudo associado, a combinação dos biomarcadores sFlt-1 e PIGF pode diferenciar gravidezes com falha, enquanto sFlt-1, bem como sFlt-1 rácio / PIGF também pode discriminar uma gravidez ectópica. (66). Martinez *et al.*, sugeriram que a sFlt-1 poderia ser um ótimo biomarcador para discriminar uma gravidez ectópica de uma normal, isso quando os níveis de β hCG são semelhantes em ambos os grupos. A combinação do sFlt-1 com a progesterona ajuda a aumentar o desempenho e precisão do diagnóstico (67).

Concentrações de alfa-fetoproteína no soro materno como testes de triagem para defeitos do tubo neural fetal estão bem estabelecidos. A alfa-fetoproteína pode facilmente atingir a circulação materna ou ocorrer a absorção de sangue fetal após o aborto tubário. As concentrações de alfa-fetoproteína, por esses fatores, pode ser um coadjuvante no diagnóstico de gravidez ectópica (67). Outro biomarcador estudado e que apresentou diferenças significativas foi o DNA fetal livre que detecta síndromes cromossômicas ainda durante a gestação com baixa margem de erro no plasma de mulheres grávida. Este marcador varia durante a gravidez e foi demonstrado ser diferente em gravidezes normais, abortos ou GE, a quantidade média DNA fetal livre é significativamente maior em mulheres com GE, sugerindo que este método pode ser útil no diagnóstico da GE (68).

JUSTIFICATIVA

O valor preditivo negativo do Inexscreen, aliado ao valor do produto (US\$ 1,40) e pelo fato de ser um kit pronto para analisar apenas uma pequena amostra na urina, são fatores muito interessantes e de baixo custo para o SUS, o diagnóstico rápido e confiável para o médico em emergências ginecológicas também contribuiria para uma maior agilidade no atendimento, diminuindo assim a taxa de mortalidade de mulheres grávidas. Para que o exame seja validado no nosso meio, a metodologia a ser utilizada deve ser mais adequada, e um número maior de mulheres grávidas também deve ser considerado no projeto.

OBJETIVO

- Avaliar o desempenho diagnóstico do Inexscreen para o diagnóstico de gestações anormais (gravidez ectópica e abortamento).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos referentes a essa tese estão descritos no artigo anexado a seguir.

Title

Sensitivity and specificity of a urinary screening test for first trimester abnormal pregnancy at an emergency setting.

List of authors

João L. G. TEIXEIRA, BSc ^a

Paola RABAIOLI, BSc ^b

Ricardo F. SAVARIS, MD, PhD ^{a,b}

This study was conducted at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Departamento e Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903

^b Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903

Disclosure

The authors report no conflict of interest.

Sources of financial support for the research

This work was supported by Fundação de Incentivo a Pesquisa e Ensino (FIPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – grant 11-0113

Reprint requests and corresponding author:

Ricardo F Savaris

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/1124

Porto Alegre – RS – Brazil

90035-003

E-mail: rsavaris@hcpa.ufrgs.br

Fax: 55 51 33598117

Abstract word count: 201

Word count: 2673

Condensation

Inexscreen® does not have a high specificity to rule out ectopic pregnancy or miscarriage.

Short version of the article:

Inexscreen® performance with first trimester pregnancy at gynecological emergency room.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the performance of a commercial urinary test to screen an abnormal first trimester pregnancy.

Study Design: In this prospective observational cohort, women with a confirmed first trimester pregnancy (gestational age < 12 weeks) provided a urine sample for diagnosing the viability of their gestation. Pregnancy viability and location testing were confirmed by ultrasound and/or laparoscopy.

Results: From 815 eligible patients for the study, 12 were excluded for not having a confirmed pregnancy (n=6) or for lost to follow up (n=6). A total of 803 patients underwent testing and completed follow-up. The pre-test probability of an abnormal pregnancy was 44% (9% for ectopic pregnancy and 35% for miscarriage). The test had the following parameters to identify an abnormal first trimester pregnancy [% (95% CI)]: sensitivity:13 (10 to 17); specificity:82 (78 to 86); positive predictive value:36 (28 to 46); negative predictive value: 54 (50 to 58); accuracy: 47%; positive likelihood ratio=0.74 (0.53 to 1.03); negative likelihood ratio=1.06 (1 to 1.12). Kappa Index between readers was 0.89 (0.77 to 1). Values are percentage (95% confidence interval).

Conclusion: In our emergency setting, we were not able to confirm that the commercial test is adequate to detect or exclude an abnormal first trimester pregnancy.

KEY WORDS: Inexscreen®; sensitivity; specificity; pregnancy; first trimester

Introduction

Vaginal bleeding and pelvic pain are common complaints in emergency facilities.¹ Once the diagnosis of pregnancy is established, the next step is to identify the location and viability of this pregnancy.² The main differential diagnoses are miscarriage and ectopic pregnancy. The use of vaginal ultrasound (VUS) and quantitative β -hCG are the main diagnostic tools.³ These diagnostic modalities can be both time consuming and expensive. The search of a biomarker for miscarriage and ectopic pregnancy has been pursued by many researches.⁴⁻⁶

The peculiarities of β -hCG and its different plasmatic levels in normal and abnormal pregnancy led the medical industry to launch in the market Inexscreen®, a point-of-care urinary test. Inexscreen® is a urinary lateral flow test with two windows, A and B. Window “A” detects the intact hCG (i-hCG) and window “B” detects the β -core fragments, the nicked β -hCG and the β -hCG isoforms. These isoforms are called human chorionic gonadotropin related protein (hCGRP). The hCGRP:i-hCG ratio is significantly decreased in ectopic pregnancies and miscarriages. As a rapid urinary test, without the need of special equipment or specialized staff, Inexscreen® had promised to be an excellent screening tool to rule out abnormal pregnancy. In 2011, Mazouz *et al* published the initial results of Inexscreen® in the clinical context. According to their data, Inexscreen® had a negative predictive value of 99.3% and 96.6% for ectopic pregnancy and miscarriage, respectively.⁷ A negative predictive value >99% for ectopic pregnancy is ideal in the clinical context, given the fact that time and costs can be reduced. However, the authors recognized this first report should be confirmed with a larger prospective study.⁷ The objective of this study was to estimate the diagnostic accuracy of Inexscreen® test compared to ultrasonography and surgery in diagnosing abnormal pregnancy in the first trimester.

Materials and methods

Participants

The study population consisted in a consecutive series of subjects who attended the gynecological emergency department (GED) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre between April 14th, 2011 and October 31st, 2013.

Participant recruitment

Consecutive pregnant women between 14 and 49 year old who attended the GED for any reason were invited to participate in the study.

Inclusion and exclusion criteria

Subjects were included if they had a pregnancy < 12 weeks according to the last menstrual period or previous gestational ultrasonography. Subjects were excluded if their pregnancy was not confirmed by urinary ®-hCG, if they had a pregnancy of \geq 12 weeks, or if they did not give written consent to participate in the study. Pregnancy and gestational age were confirmed by urinary and/or serum ®-hCG and ultrasound respectively.

Data collection

After signing the written consent, a standard questionnaire was obtained. Next, a fresh urine sample was collected from the patient for the index test (Inexscreen®). Subjects were followed with serial plasma ®-hCG and transvaginal ultrasound. In case of pregnancy of unknown location, subjects were followed every 48 h or every week until the outcome of pregnancy was identified.

Reference standard and its rationale

A transvaginal ultrasound was used as the reference standard to confirm the presence of a viable, or a non-viable pregnancy. Vaginal ultrasound was performed within 4 hours after the Inexscreen® test. Pregnancy viability was defined as the presence of intrauterine embryo/fetus with cardiac activity. Miscarriage was defined by the absence of visible heartbeat in an embryo with crown-rump length \geq 7 mm, or if the mean gestational sac diameter was \geq 25 mm and no structure was visualized inside. The diagnostic algorithm published by Mol *et al* was

used for diagnosis of ectopic pregnancy.⁸ Ectopic pregnancy was confirmed by surgery and pathology report.

Technical specifications

Inexscreen® (Humasis Co., Ltd, Gyeonggi-do, 431-836, Korea) was the index test for screening viable or non-viable first trimester pregnancy. Urine specimens were collected in a clean, dry, plastic container and Inexscreen® was run within 10 minutes of collection. With the disposable pipette provided with the Inexscreen® kit, 5 drops of urine were loaded into the sample well of the Inexscreen® test device. Interpretation of the test result was performed after 5 minutes, according to the manufacturer's instructions. Briefly, Inexscreen® test has 2 windows (A and B), and two lines in each window (C and T). Line C is the internal control; if it is absent in one of the windows, the test is discarded and a new test used. The intensity of the T line was defined by visual comparison with standards given by the manufacturer. The intensity of the lines was graduated in a grading system of whole numbers between 0 and 10. The cut-off between normal and abnormal followed the manufacturer instructions. A ratio of the intensity of lines $A > B$ was consider abnormal; a ratio $A \leq B$ was consider normal.

Persons executing and reading Inexscreen ®

Two experts in Inexscreen® reading (JLG, RFS) trained and supervised the clinical physicians (n=8), the residents and medical students that were in rotation every month (total n= 37/30.5 months). The physicians, residents and medical students evaluated the intensity of line T in windows A and B.

Persons executing ultrasound and pathological analysis

Board certified radiologists and pathologists were responsible for executing transvaginal ultrasound and pathological analysis, respectively. Readers of the Inexscreen® test, radiologists and pathologists were blind to the results of each other's test.

Statistical methods and sample size

The performance of the Inexscreen® test was calculated using a 95% confidence interval (95% CI) for sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and positive and negative likelihood ratios. Kappa index was used to assess inter- and intraobserver agreement. Reproducibility of the test, i.e., normal or abnormal, was verified between two independent observers using 60 cases comprising the whole spectrum of results, i.e., from 0 to 10. Digital pictures of lines A and B of these 60 cases were taken and stored in a file. Results from a senior researcher (RFS) were compared to the results of a naïve researcher for inter-observer agreement. The senior researcher scored the same 60 cases in two different occasions for intra-observer agreement. Analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA), online Kappa calculator (<http://vassarstats.net/kappa.html>) and online diagnostic test calculator (<http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>).

Sample size was calculated according to the nomogram described in the literature.⁹ The following parameters were used: an estimated incidence of ectopic pregnancy of 10% ($\pm 5\%$) and an estimated specificity of 95% (with a precision of $\pm 5\%$). Sample size calculation yielded a total number of 730 subjects. For cases of miscarriage, where the estimated incidence of miscarriage was 40%, the minimal number of subjects was 180. With these parameters we were able to verify with a 95% CI, that Inexscreen® has specificity between 90 and 100% to diagnose ectopic pregnancy in a population where the prevalence is between 5 to 15%.

Ethical issues

This study was submitted and approved by *Comite de Ética em Pesquisa of Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, the local Institutional Review Board (number 11-0113). Inexscreen® was evaluated in the gynecological emergency department (GED) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, in Porto Alegre, RS, Brazil.

Results

Beginning and end dates of recruitment

Data collection was performed between April 14th, 2011 and October 28th, 2013.

Clinical and demographic characteristics of the study population

Most of the participants were white and the mean gestational age was 8.1, 6.5 and 7.9 weeks for intrauterine pregnancy, ectopic pregnancy and miscarriage, respectively (Table 1).

Number of participants

A total of 815 Inexscreen® tests were used in the study and none of them were discarded for being faulty, i.e., negative control line. Six subjects did not satisfy the inclusion criteria and were excluded; six were lost to follow-up. A total of 803 subjects satisfied inclusion criteria and had a vaginal ultrasound or were submitted to surgery (Fig. 1). The median follow-up was 3 days (range 1 and 60 days).

Time interval between tests results

The time interval between the Inexscreen® test and the vaginal ultrasound was 4 hours or less. No treatment was administered in between.

Distribution of the severity of the disease

A total of 125 subjects were asymptomatic with no or ≥ 1 risk factor. Asymptomatic subjects without risk factor comprised 6.6% (53 out of 803) of the study population. From these 53 subjects, 39.6% had an abnormal pregnancy (3 cases were ectopic pregnancy; 18 cases of miscarriage). The majority of subjects (93.4%) had pelvic pain and/or vaginal bleeding.

Cross tabulation of the Inexscreen ® and transvaginal ultrasound

All 803 subjects included in the study underwent transvaginal ultrasound and had a urine sample analyzed by Inexscreen ®. Positive Inexscreen® (abnormal) in abnormal pregnancy was seen in 47 cases; abnormal Inexscreen in normal pregnancy was seen in 81 cases. Normal Inexscreen® in abnormal pregnancy was seen in 306 cases, and normal Inexscreen® in normal pregnancy was seen in 369 cases. There were no missing or indeterminate results.

Adverse events from Inexscreen® and vaginal ultrasound

No adverse event occurred by performing the index test (Inexscreen®) or reference standard (transvaginal ultrasound).

Estimates of the test

The test performance to identify an abnormal first trimester pregnancy was as following: sensitivity:13% (95% CI, 10 to 17%); specificity:82% (95% CI, 78 to 85%); positive predictive value:37% (95% CI, 28 to 46%); negative predictive value: 55% (95% CI, 50 to 58%); accuracy: 52%; positive likelihood ratio: 0.74 (95% CI, 0.53 to 1.03); negative likelihood ratio: 1.06 (95% CI, 1 to 1.12). The pretest probability of an abnormal pregnancy was 44%; the posttest probability after a positive and negative test was 37 and 45%, respectively (Table 2). Similar results were observed in a subgroup of symptomatic subjects with gestational age between 5 and 8 weeks of pregnancy (Table 3).

No indeterminate results or outliers were observed. The six cases that were lost to follow-up were excluded from the analysis.

Kappa index for inter- and intraobserver agreement was 0.89 (95% CI, 0.77 to 1) and 0.93 (95% CI, 0.84 to 1), respectively.

Discussion

Our results revealed that Inexscreen® correctly identified 6 cases of women that did not have a positive ®-hCG (Figure 1). After comparing our results to those published by Mazous *et al*,⁷ it was possible to identify that the specificity of the test was around 82% in both studies; in our setting, however, the test was neither sensitive, nor specific to rule in or to rule out abnormal pregnancy with a precision higher than 95% (Table 2). The low performance of the test in our scenario can be seen by the posttest probability of a positive and negative test: 37 and 45%, values that did not differ much from the pretest probability, i.e., 44% (Table 2). The negative predictive value (NPV) for ectopic pregnancy was 85% (95% CI, 81 to 88), while in Mazous *et al* it was higher 96.6% (95% CI; 91 to 98%). Although both studies present a high NPVs, they are not similar. The sensitivity of the test found in our study was different from Mazous' publication.

While we found a low sensitivity, 13% (95% CI, 10 to 17), Mazous *et al* found a sensitivity of 92% (95% CI, 84 to 97).⁷ Possible explanations for these discrepancies could be related to the fact we used the test in asymptomatic pregnant women that attended the gynecological emergency department for non-obstetric reasons, which alters the pre-test probability. This subgroup represented 6% of the population, but 39.6% of the cases had an abnormal pregnancy, and they would benefit the most for a screening test. However, if only women with pelvic pain and/or vaginal bleeding were included, as it was in the original work of Mazous *et al*, the negative predictive value for ectopic pregnancy would remain low, i.e., 80% (95% CI, 74 to 85%), as shown in Table 3. Predictive values of a test are influenced by the prevalence of a condition.¹⁰ Therefore, it is important to test Inexscreen® in a real-life scenario, in a population that reproduce the true prevalence of ectopic pregnancy and miscarriage. If these steps were not taken, a selection bias would ensue. In our study, the prevalence of ectopic pregnancy was 9% (95% CI, 7 to 11%), which is in accordance to the literature.^{7, 11} The prevalence of miscarriage was 35% (95% CI, 31 to 38%), which was higher than in the population presented by Mazouz *et al*,⁷ but similar to a larger study published by Tude-Byass *et al*.¹²

Other possibilities for the discrepancies could be related to the inclusion criteria. In our study we included pregnant women with <12 weeks of gestational age. Mazous *et al* included pregnancies between 5 and 8 weeks according to the last menstrual period. A analysis of this subgroup, symptomatic women with gestational age between 5 and 8 weeks, revealed that the performance of the test did not change much (Table 3). Reading the test could be an issue, since it compares the intensity of the lines in the cassette to a standard card provided in each kit. The design of this point of care test is simple, and it is easy to read. The end result lies into two categories: normal, when intensity of line A≤B, or abnormal, when intensity of line A>B. These results are straightforward when the intensity of the line is ≥3. The high Kappa index ($\kappa=0.89$) found in our study reflects this agreement among readers. This result is in accordance with Mazous *et al*.⁷ Probably the main reason for these discrepancies could be related to the study design. We used a

prospective study design with an adequate sample size, while Mazous *et al* used a retrospective one.⁷ The latter has more sources of bias and confounding factors.

The manufacturer states that if a normal result is found in ectopic pregnancy, which was the cases in 63 subjects, the probable cause for such false negative could be related to high levels of hCG in ectopic pregnancy. This is was not the case in at least one of our samples. The test gave a normal result: A=7 , B=7 , i.e., hCG between 1000 and 5000 mUI/mL. A blood hCG took 8 weeks before reveled a plasma level of 577 mUI/mL. The Inxscreen® result was within the normality, but if we consider the growth of hCG overtime, we would expected a higher level of hCG in a normal pregnancy. This would be a case of highly suspected ectopic pregnancy despite of normal test. Of note, clear diagnosis of ectopic pregnancy, i.e., gestational sac or fetal heartbeat outside the uterus, was made by ultrasound in 10 subjects and only 4 tests were abnormal. Lastly, another possible explanation could be related to rationale of the test. Inxscreen® is based in the hCGRP:i-hCG ratio; this ratio is significantly decreased in ectopic pregnancies and miscarriages. Borrelli *et al* analyzed the serum and urine levels of the intact hCG and the hCG fragments in first trimester pregnancy of women who presented at an outpatient emergency department. They found that urine hCG variants had less significant performance compared to those of serum in distinguishing ectopic pregnancy from viable pregnancy.¹³ An alternative use of Inxscreen® could be related to hCG levels at urine. Inxscreen® provides different levels of hCG in urine, < 200 mUI/ml, 200 to 1000, 1000 to 5000, 5000 to 10000 and >10000 mUI/mL. Physicians could benefit from this information to order ultrasound, or to evaluate the rising or fall of hCG compared to previous plasma values.

The strengths of the study were the sample size, the low index of dropout and a real scenario with a prospective follow-up. One of the limitations of this study was that we did not correlate the hCG levels of all cases of ectopic pregnancy to the levels found by Inxscreen®. Indeed, this could be a clinical applicability of the test to identify the discriminatory zone and the use of vaginal ultrasound.³

In conclusion, in this setting, Inexscreen® has a specificity of 82%, a value in range of what is published in the literature, but it has 13% of sensitivity. The test is not adequate to rule in or to rule out an abnormal pregnancy in the first trimester in our setting. Further prospective studies are necessary to confirm our results.

References

1. Matteson KA, Weitzen SH, Lafontaine D, Phipps MG. Accessing care: use of a specialized women's emergency care facility for nonemergent problems. *J Womens Health (Larchmt)* 2008;17:269-77.
2. Lee AS, Cohen SL, Anderson JR, Chanmugam A, Bienstock JL. The effect of gynecologic algorithm pathways on emergency department visit times. *J Emerg Med* 2013;44:217-24.
3. Barnhart KT, Simhan H, Kamelle SA. Diagnostic accuracy of ultrasound above and below the beta-hCG discriminatory zone. *Obstet Gynecol* 1999;94:583-7.
4. Daponte A, Deligeoroglou E, Garas A, Pournaras S, Hadjichristodoulou C, Messinis IE. Activin a and follistatin as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *Dis Markers* 2013;35:497-503.
5. Senapati S, Barnhart KT. Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril* 2013;99:1107-16.
6. Rausch ME, Barnhart KT. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55:418-23.

7. Mazouz S, Lee JK, Fernandez H. Evaluation of a urinary test as a diagnostic tool of a nonprogressive pregnancy. *Fertil Steril* 2011;95:783-6.
8. 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;14:2855-62.
9. Malhotra RK, Indrayan A. A simple nomogram for sample size for estimating sensitivity and specificity of medical tests. *Indian J Ophthalmol* 2010;58:519-22.
10. Grimes DA, Schulz KF. Uses and abuses of screening tests. *Lancet* 2002;359:881-4.
11. Alkatout I, Honemeyer U, Strauss A et al. Clinical diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2013;68:571-81.
12. Tunde-Byass M, Cheung VY. The value of the early pregnancy assessment clinic in the management of early pregnancy complications. *J Obstet Gynaecol Can* 2009;31:841-4.
13. Borrelli PT, Butler SA, Docherty SM, Staite EM, Borrelli AL, Iles RK. Human chorionic gonadotropin isoforms in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Clin Chem* 2003;49:2045-9.

Table 1. Characteristics of the sample.

Characteristics	Viable pregnancy n=450	Ectopic Pregnancy n=73	Miscarriage n=280
Age –mean(SD)	26.7(6.5)	28(6.7)	28.3(7.8)
Ethnicity-n(%)			
White	315(70)	44(60)	182 (65)
Black	131(29)	29(40)	88 (31)
Native-Brazilian	3(0.7)		4 (1.7)
Asian	1(0.3)		4 (1.7)
			2 (0.6)
Gestational age – mean (SD)	8.1(2.1)	6.5(2)	7.9(2.1)
Risk Factors (no/yes)			
Hx Ectopic Pregnancy	425/25	59/14	269/11
Hx Tubal surgery	429/21	64/9	257/13
Smoking	334/116	47/26	214/66
Hx PID ^a	414/36	58/15	258/22
Hx ≥ 3 miscarriages	425/25	70/3	271/9
Hx Infertility ^b	405/45	52/21	228/52
> 5 sexual partners	338/112	48/25	197/83
Hx Intrauterine dispositive	408/42	66/7	261/19

Signs and symptoms – n(%)

Asymptomatic	71(16)	5(7)	49(18)
Pelvic pain	163(36)	8(11)	31(11)
Vaginal bleeding	75(17)	14(19)	54(19)
Pelvic pain + bleeding	141(31)	46(63)	146(52)

^a Hx PID= History of Pelvic Inflammatory Disease.

^b Hx Infertility: History of infertility, defined as failure to achieve a clinical pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse.

Table 2. Performance of Inexscreen® test compared to Vaginal Ultrasound, or surgery/pathology in 803 women. Numbers are % (95% confidence interval), except for likelihood ratios.

Parameter	Total	Ectopic pregnancy	Miscarriage
Pre-test probability	44	9	35
Sensitivity	13 (10 to 17)	14 (6 to 23)	13 (9 to 18)
Specificity	82 (78 to 85)	82 (78 to 85)	82 (78 to 85)
PPV	37 (28 to 46)	11 (5 to 19)	31 (23 to 40)
NPV	55 (50 to 58)	85 (81 to 88)	60 (56 to 64)
Accuracy	52	72	56
LR+	0.74 (0.53 to 1.03)	0.76 (0.41 to 1.4)	0.73 (0.51 to 1.05)
LR -	1.06 (1 to 1.12)	1.05 (0.95 to 1.16)	1.06 (0.99 to 1.13)
PPT +	37	11	31
PPT -	45	15	40

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

LR+: positive likelihood ratio

LR-: negative likelihood ratio

PPT+: post test probability if test is positive

PPT-: post test probability if test is negative

Table 3. Performance of Inexscreen® test compared to Vaginal Ultrasound, or surgery/pathology in 403 symptomatic women with gestational age between 5 and 8 weeks. Numbers are % (95% confidence interval), except for likelihood ratios.

Parameter	Total	Ectopic pregnancy	Miscarriage
Pre-test probability	45	13	33
Sensitivity	16 (11 to 22)	13 (6 to 25)	17 (9 to 18)
Specificity	81 (75 to 86)	81 (75 to 86)	81 (75 to 86)
PPV	42 (30 to 54)	15 (6 to 27)	36 (23 to 40)
NPV	53 (47 to 59)	80 (74 to 85)	62 (56 to 64)
Accuracy	51	68	57
LR+	0.86 (0.6 to 1.3)	0.72 (0.3 to 1.5)	0.92 (0.6 to 1.4)
LR -	1.03 (0.9 to 1.1)	1.07 (0.94 to 1.2)	1.02 (0.9 to 1.1)
PPT +	42	10	31.2
PPT -	47	14	33.4

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

LR+: positive likelihood ratio

LR-: negative likelihood ratio

PPT+: post test probability if test is positive

PPT-: post test probability if test is negative

Figure legends

Figure 1. Flow chart of the study. Ect Preg= ectopic pregnancy

ARTIGO EM PORTUGUÊS

A sensibilidade e a especificidade de teste de triagem urinário usado em um cenário de emergência para detectar gravidezes anormais no primeiro trimestre

João L. G. Teixeira, Licenciatura; Paola Rabaioli, Licenciatura; Ricardo F. Savaris, MD, PhD

OBJETIVO: Avaliar o desempenho de um teste urinário para triagem de Gravidezes anormais no primeiro trimestre em mulheres em sala de emergência.

FORMA DE ESTUDO: Nesta coorte observacional, prospectiva, as mulheres com primeiro trimestre da gravidez confirmada (idade gestacional <12 semanas) forneciam uma amostra de urina para diagnosticar a viabilidade da gestação. Viabilidade de gravidez e testes de localização foram confirmadas por ultrassom e / ou laparoscopia.

RESULTADOS: De 815 pacientes elegíveis para o estudo, 12 foram excluídas por não ter uma gravidez confirmada (n ¼ 6) ou foram perdidos para follow-up (n ¼ 6). Um total de 803 pacientes foram submetidas a testes e completaram o seguimento. A

probabilidade pré-teste de uma gravidez anormal foi de 44%(9% para a gravidez ectópica e 35% para aborto).

O ensaio teve os seguintes parâmetros para identificar uma gravidez anormal no primeiro trimestre:

(sensibilidade, 13%; 95% intervalo de confiança [IC], 10 e 17; especificidade, 82%; 95% CI, 78 e 86; valor preditivo positivo, 36; 95% CI, 28 e 46; valor preditivo negativo, 54; 95% CI, 50 e 58; exatidão, 47%; razão de verossimilhança positiva, 0,74; 95% CI, 0.53 e 1.03; verossimilhança negativa proporção, 1,06; 95% CI, 1 e 1.12). A reprodutibilidade do teste no nosso estudo foi alta (índice de kappa entre os leitores, 0,89; 95% CI, 0.77 e 1).

CONCLUSÃO: Em nosso cenário de emergência, o teste comercial não foi adequado para confirmar ou excluir uma gravidez anormal no primeiro trimestre.

PALAVRAS-CHAVE: gravidez anormal, primeiro trimestre, Inexscreen, gravidez, teste de triagem, sensibilidade, especificidade

ANEXOS

- Nosso artigo teve uma citação em formato Editorial, publicado pelo Dr. Kurt Barnhart na revista internacional “American Journal of Obstetrics & Gynecology”.
- Parte do texto destaca nosso estudo. “Mais uma vez, gostaria de elogiar os autores pela condução e publicação de um estudo de validação de fase IV de alta qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Creanga AA, Syverson C, Seed K, Callaghan WM. Pregnancy-Related Mortality in the United States, 2011-2013. *Obstetrics and gynecology*. 2017. Epub 2017/07/12.
2. Crochet JR, Bastian LA, Chireau MV. Does this woman have an ectopic pregnancy?: the rational clinical examination systematic review. *Jama*. 2013;309(16):1722-9. Epub 2013/04/25.
3. Seow KM, Wang PH, Huang LW, Hwang JL. Transvaginal sono-guided aspiration of gestational sac concurrent with a local methotrexate injection for the treatment of unruptured cesarean scar pregnancy. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013;288(2):361-6. Epub 2013/02/28.
4. Eaton JL, Zhang X, Kazer RR. First-trimester bleeding and twin pregnancy outcomes after in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2016;106(1):140-3. Epub 2016/04/10.
5. Rana P, Kazmi I, Singh R, Afzal M, Al-Abbasi FA, Aseeri A, et al. Ectopic pregnancy: a review. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013;288(4):747-57. Epub 2013/06/25.
6. Aaboud M, Aad G, Abbott B, Abdallah J, Abdinov O, Abeloos B, et al. A measurement of the calorimeter response to single hadrons and determination of the jet energy scale uncertainty using LHC Run-1 pp-collision data with the ATLAS detector. *The European physical journal C, Particles and fields*. 2017;77(1):26. Epub 2017/03/07.
7. Kharazmi E, Dossus L, Rohrmann S, Kaaks R. Pregnancy loss and risk of cardiovascular disease: a prospective population-based cohort study (EPIC-Heidelberg). *Heart*. 2011;97(1):49-54. Epub 2010/12/03.
8. Barnhart KT. Novel diagnostic tests of ectopic pregnancy, if at first you don't succeed. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015;212(1):4-6. Epub 2014/12/23.
9. Mazouz S, Lee JK, Fernandez H. Evaluation of a urinary test as a diagnostic tool of a nonprogressive pregnancy. *Fertility and sterility*. 2011;95(2):783-6. Epub 2010/09/21.
10. Li C, Zhao WH, Zhu Q, Cao SJ, Ping H, Xi X, et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a multi-center case-control study. *BMC pregnancy and childbirth*. 2015;15:187. Epub 2015/08/25.
11. Belics Z, Gerecz B, Csakany MG. [Early diagnosis of ectopic pregnancy]. *Orvosi hetilap*. 2014;155(29):1158-66. Epub 2014/07/14. A mehen kivuli fogamzas korai diagnosztikaja.
12. Bouyer J. [Epidemiology of ectopic pregnancy: incidence, risk factors and outcomes]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*. 2003;32(7 Suppl):S8-17. Epub 2003/12/31. Epidemiologie de la grossesse extra-uterine: incidence, facteurs de risque et conséquences.

13. Zee J, Sammel MD, Chung K, Takacs P, Bourne T, Barnhart KT. Ectopic pregnancy prediction in women with a pregnancy of unknown location: data beyond 48 h are necessary. *Hum Reprod.* 2014;29(3):441-7. Epub 2013/12/20.
14. Alkemade HA, de Jongh GJ, Arnold WP, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. Levels of skin-derived antileukoproteinase (SKALP)/elafin in serum correlate with disease activity during treatment of severe psoriasis with cyclosporin A. *The Journal of investigative dermatology.* 1995;104(2):189-93. Epub 1995/02/01.
15. Li C, Meng CX, Zhao WH, Lu HQ, Shi W, Zhang J. Risk factors for ectopic pregnancy in women with planned pregnancy: a case-control study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology.* 2014;181:176-82. Epub 2014/08/26.
16. Shaw JL, Diamandis EP, Horne AW, Barnhart K, Bourne T, Messinis IE. Ectopic pregnancy. *Clinical chemistry.* 2012;58(9):1278-85. Epub 2012/03/06.
17. de Castro MB, Freitas Vilela AA, Oliveira AS, Cabral M, Souza RA, Kac G, et al. Sociodemographic characteristics determine dietary pattern adherence during pregnancy. *Public health nutrition.* 2015:1-7. Epub 2015/09/25.
18. Al-Turki HA. Ectopic pregnancy. Prevalence and risk factors in women attending a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Saudi medical journal.* 2012;33(8):875-8. Epub 2012/08/14.
19. Kumar V, Gupta J. Tubal ectopic pregnancy. *BMJ clinical evidence.* 2015;2015. Epub 2015/11/17.
20. Vichnin M. Ectopic pregnancy in adolescents. *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2008;20(5):475-8. Epub 2008/09/18.
21. Wirth N, Abou-Hamdan K, Spinosa A, Bohadana A, Martinet Y. [Passive smoking]. *Revue de pneumologie clinique.* 2005;61(1 Pt 1):7-15. Epub 2005/03/18. Le tabagisme passif.
22. Risk factor for ectopic pregnancy. *Canadian family physician Medecin de famille canadien.* 1999;45:300, 9-10. Epub 1999/03/05.
23. Li Z, Sullivan EA, Chapman M, Farquhar C, Wang YA. Risk of ectopic pregnancy lowest with transfer of single frozen blastocyst. *Hum Reprod.* 2015;30(9):2048-54. Epub 2015/07/24.
24. Menon S, Timms P, Allan JA, Alexander K, Rombauts L, Horner P, et al. Human and Pathogen Factors Associated with Chlamydia trachomatis-Related Infertility in Women. *Clinical microbiology reviews.* 2015;28(4):969-85. Epub 2015/08/28.
25. Brito LR, Guedes Neto Ede P, Furich DG, Savaris RF. MUC1 (VPM654 and EPR1023) Expression in Mucosa of Fallopian Tubes With Ectopic Pregnancy is Altered. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM.* 2016;24(8):569-74. Epub 2015/10/09.

26. Soundravally R, Krishna Latha T, Soundara Raghavan S, Ananthanarayanan PH, Srilatha K. Diagnostic significance of total creatine kinase and its isoform in tubal ectopic pregnancy. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2013;39(12):1587-91. Epub 2013/07/24.
27. Cartwright J, Duncan WC, Critchley HO, Horne AW. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reproduction*. 2009;138(1):9-22. Epub 2009/03/27.
28. Daponte A, Pournaras S, Zintzaras E, Kallitsaris A, Lialios G, Maniatis AN, et al. The value of a single combined measurement of VEGF, glycodelin, progesterone, PAPP-A, HPL and LIF for differentiating between ectopic and abnormal intrauterine pregnancy. *Hum Reprod*. 2005;20(11):3163-6. Epub 2005/08/02.
29. Kuscu E, Vicdan K, Turhan NO, Oguz S, Zorlu G, Gokmen O. The hormonal profile in ectopic pregnancies. *Materia medica Polona Polish journal of medicine and pharmacy*. 1993;25(3-4):149-52. Epub 1993/07/01.
30. Mueller MD, Raio L, Spoerri S, Ghezzi F, Dreher E, Bersinger NA. Novel placental and nonplacental serum markers in ectopic versus normal intrauterine pregnancy. *Fertility and sterility*. 2004;81(4):1106-11. Epub 2004/04/07.
31. Shahinian JH, Fuellgraf H, Tholen S, Mastroianni J, Knopf JD, Kuehs M, et al. Pregnancy Specific beta-1 Glycoprotein 1 is Expressed in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and its Subcellular Localization Correlates with Overall Survival. *Journal of Cancer*. 2016;7(14):2018-27. Epub 2016/11/24.
32. Rajtar-Ciosek A, Wyroba J, Kacalska-Jansen O, Zmaczynski A, Figula J, Babczyk D, et al. Markers of implantation in ectopic and high-risk early eutopic pregnancies. *Folia medica Cracoviensia*. 2016;56(3):41-50. Epub 2016/01/01.
33. Petraglia F, Sawchenko P, Lim AT, Rivier J, Vale W. Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science*. 1987;237(4811):187-9. Epub 1987/07/10.
34. Florio P, Severi FM, Bocchi C, Luisi S, Mazzini M, Danero S, et al. Single serum activin a testing to predict ectopic pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(5):1748-53. Epub 2007/03/08.
35. Mantzavinos T, Phocas I, Chrelias H, Sarandakou A, Zourlas PA. Serum levels of steroid and placental protein hormones in ectopic pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1991;39(2):117-22. Epub 1991/04/16.
36. Witt BR, Wolf GC, Wainwright CJ, Johnston PD, Thorneycroft IH. Relaxin, CA-125, progesterone, estradiol, Schwangerschaft protein, and human chorionic gonadotropin as predictors of outcome in threatened and nonthreatened pregnancies. *Fertility and sterility*. 1990;53(6):1029-36. Epub 1990/06/01.

37. Dhiman P, Senthilkumar GP, Rajendiran S, Sivaraman K, Soundararaghavan S, Kulandhasamy M. Serum activin B concentration as predictive biomarker for ectopic pregnancy. *Clinical biochemistry*. 2016. Epub 2016/03/13.
38. Matthews CP, Coulson PB, Wild RA. Serum progesterone levels as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 1986;68(3):390-4. Epub 1986/09/01.
39. Buck RH, Joubert SM, Norman RJ. Serum progesterone in the diagnosis of ectopic pregnancy: a valuable diagnostic test? *Fertility and sterility*. 1988;50(5):752-5. Epub 1988/11/01.
40. Illingworth PJ, Groome NP, Duncan WC, Grant V, Tovanabutra S, Baird DT, et al. Measurement of circulating inhibin forms during the establishment of pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(4):1471-5. Epub 1996/04/01.
41. Treetampinich C, O'Connor AE, MacLachlan V, Groome NP, de Kretser DM. Maternal serum inhibin A concentrations in early pregnancy after IVF and embryo transfer reflect the corpus luteum contribution and pregnancy outcome. *Hum Reprod*. 2000;15(9):2028-32. Epub 2000/09/01.
42. D'Antona D, Mamers PM, Lowe PJ, Balazs N, Groome NP, Wallace EM. Evaluation of serum inhibin A as a surveillance marker after conservative management of tubal pregnancy. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2305-7. Epub 1998/10/02.
43. Segal S, Gor H, Correa N, Mercado R, Veenstra K, Rivnay B. Inhibin A: marker for diagnosis of ectopic and early abnormal pregnancies. *Reproductive biomedicine online*. 2008;17(6):789-94. Epub 2008/12/17.
44. Guillaume J, Benjamin F, Sicuranza BJ, Deutsch S, Seltzer VL, Tores W. Serum estradiol as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 1990;76(6):1126-9. Epub 1990/12/01.
45. Jones EA, Clement-Jones M, James OF, Wilson DI. Differences between human and mouse alpha-fetoprotein expression during early development. *Journal of anatomy*. 2001;198(Pt 5):555-9. Epub 2001/06/30.
46. Grosskinsky CM, Hage ML, Tyrey L, Christakos AC, Hughes CL. hCG, progesterone, alpha-fetoprotein, and estradiol in the identification of ectopic pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 1993;81(5 (Pt 1)):705-9. Epub 1993/05/01.
47. Canney PA, Moore M, Wilkinson PM, James RD. Ovarian cancer antigen CA125: a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *British journal of cancer*. 1984;50(6):765-9. Epub 1984/12/01.
48. Halila H, Stenman UH, Seppala M. Ovarian cancer antigen CA 125 levels in pelvic inflammatory disease and pregnancy. *Cancer*. 1986;57(7):1327-9. Epub 1986/04/01.

49. Brumsted JR, Nakajima ST, Badger G, Riddick DH, Gibson M. Serum concentration of CA-125 during the first trimester of normal and abnormal pregnancies. *The Journal of reproductive medicine*. 1990;35(5):499-502. Epub 1990/05/01.
50. Weiss G, O'Byrne EM, Steinetz BG. Relaxin: a product of the human corpus luteum of pregnancy. *Science*. 1976;194(4268):948-9. Epub 1976/11/26.
51. Szlachter BN, Quagliarello J, Jewelewicz R, Osathanondh R, Spellacy WN, Weiss G. Relaxin in normal and pathogenic pregnancies. *Obstetrics and gynecology*. 1982;59(2):167-70. Epub 1982/02/01.
52. Garcia A, Skurnick JH, Goldsmith LT, Emmi A, Weiss G. Human chorionic gonadotropin and relaxin concentrations in early ectopic and normal pregnancies. *Obstetrics and gynecology*. 1990;75(5):779-83. Epub 1990/05/01.
53. Meunier K, Mignot TM, Maria B, Guichard A, Zorn JR, Cedard L. Predictive value of the active renin assay for the diagnosis of ectopic pregnancy. *Fertility and sterility*. 1991;55(2):432-5. Epub 1991/02/01.
54. Rausch ME, Beer L, Sammel MD, Takacs P, Chung K, Shaunik A, et al. A disintegrin and metalloprotease protein-12 as a novel marker for the diagnosis of ectopic pregnancy. *Fertility and sterility*. 2011;95(4):1373-8. Epub 2011/02/01.
55. Birkhahn RH, Gaeta TJ, Suzuki T, Katoh H, Nagai R, Bove J. Serum levels of smooth muscle heavy-chain myosin in patients with ectopic pregnancy. *Annals of emergency medicine*. 2000;36(2):101-7. Epub 2000/08/05.
56. Fernandes da Silva MO, Elito J, Jr., Daher S, Camano L, Fernandes Moron A. Association of serum levels of vascular endothelial growth factor and early ectopic pregnancy. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. 2013;40(4):489-91. Epub 2013/01/01.
57. Soriano D, Hugol D, Quang NT, Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertility and sterility*. 2003;79(4):975-80. Epub 2003/05/17.
58. Rausch ME, Barnhart KT. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2012;55(2):418-23. Epub 2012/04/19.
59. Mulayim N, Palter SF, Selam B, Arici A. Expression and regulation of interleukin-8 in human fallopian tubal cells. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;188(3):651-6. Epub 2003/03/14.
60. Senturk LM, Arici A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol*. 1998;39(2):144-51. Epub 1998/03/20.
61. Bischof P. [Pregnancy proteins]. *Annales d'endocrinologie*. 1987;48(4):289-99. Epub 1987/01/01. Proteines de la grossesse.

62. Haenggi W, Bersinger NA, Altermatt HJ, Birkhaeuser MH. Placental protein 14 (PP14) does not predict endometrial status under hormone replacement therapy. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 1997;11(1):51-7. Epub 1997/02/01.
63. Nylund L, Gustafson O, Lindblom B, Pousette A, Seppala M, Riittinen L, et al. Placental protein 14 in human in-vitro fertilization early pregnancies. *Hum Reprod*. 1992;7(1):128-30. Epub 1992/01/01.
64. Zhao Z, Moley KH, Gronowski AM. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clinical biochemistry*. 2013;46(10-11):953-60. Epub 2013/02/12.
65. Miura K, Higashijima A, Mishima H, Miura S, Kitajima M, Kaneuchi M, et al. Pregnancy-associated microRNAs in plasma as potential molecular markers of ectopic pregnancy. *Fertility and sterility*. 2015;103(5):1202-8 e1. Epub 2015/03/17.
66. Patrelli TS, Gizzo S, Plebani M, Basso D, Capobianco G, Bartolucci C, et al. The trend of VEGF-A and PlGF in pregnant patients: a perspective case-control study on 214 women. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. 2012;39(1):57-64. Epub 2012/06/09.
67. Cederqvist LL, Killackey MA, Abdel-Latif N, Gupta R, Saxena BB. Alpha-fetoprotein and ectopic pregnancy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;286(6373):1247-8. Epub 1983/04/16.
68. Lazar L, Nagy B, Ban Z, Nagy GR, Papp Z. Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clinical chemistry*. 2006;52(8):1599-601. Epub 2006/06/03.