

Diagnosi di laboratorio della gravidanza

A. Fortunato

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

Riassunto

Premesse. L'introduzione dei metodi immunometrici per la determinazione della gonadotropina corionica umana (hCG) ha dato una svolta decisiva, all'inizio degli anni ottanta, al ruolo del Laboratorio nella diagnosi della gravidanza. La sensibilità di tali metodi, applicati non solo alle determinazioni su sangue ma anche ai metodi rapidi per la ricerca dell'hCG nelle urine, ha evidenziato da un lato la possibilità di rilevare precocemente lo stato di gravidanza e riscontrare la produzione di hCG anche in altre situazioni fisio-patologiche, e dall'altro lato la loro suscettibilità, soprattutto nei campioni di urina, alle sostanze interferenti.

Metodi. Sono stati considerati gli aspetti analitici ed interpretativi della determinazione dell'hCG, legati alla eterogeneità dell'analita ed alla necessità di standardizzazione dei metodi. Per valutare le prestazioni di alcuni metodi rapidi per la diagnosi di gravidanza sono riportati i risultati ottenuti con sei differenti sistemi commerciali in campioni di urine con concentrazioni di hCG comprese tra 0 e 2000 UI/L per un numero complessivo di 500 determinazioni.

Risultati. L'eterogeneità molecolare dell'hCG è dovuta sia alle possibili varianti strutturali che di contenuto di carboidrati, ne conseguono numerosi problemi dovuti all'uso di una nomenclatura non correttamente codificata per l'identificazione delle singole varianti, alla mancanza di standard purificati per calibrazioni accurate ed alla diversa capacità degli immunodosaggi disponibili di riconoscere le singole varianti. Nel confronto dei metodi rapidi per la diagnosi di gravidanza su urine si evidenzia che per tutti i campioni, con concentrazioni di hCG comprese tra 15 e 70 UI/L, almeno uno dei metodi utilizzati fornisce una interpretazione discordante.

Conclusioni. Il problema della standardizzazione della determinazione dell'hCG è stato di recente argomento di importanti dibattiti in quanto sugli stessi campioni, analizzati con metodi differenti, si ottengono risultati discordanti. Anche i risultati dei metodi rapidi su urina non sempre sono di facile interpretazione, anche se eseguiti da personale addestrato, e spesso la sensibilità dichiarata dal produttore è migliore rispetto a quella riscontrata nel nostro studio.

Summary

The Laboratory role in pregnancy diagnosis

Background. At the beginning of eighties human chorionic gonadotropin (hCG) immunoassays availability significantly improved the laboratory role in pregnancy diagnosis. Increased methods sensitivity of blood tests and urine point of care or home pregnancy tests enables not only early pregnancy detection and demonstration of hCG secretion in other physiopathology conditions but also the oversensitiveness to interference mainly for urine samples.

Methods. Analytical and interpretative aspects of hCG detection related to the molecular heterogeneity and the need of methods standardization are discussed. To evaluate the performances of six different commercial pregnancy tests we report results obtained in urine samples with hCG concentration between 0 and 2000 IU/L for a total of 500 assays.

Results. hCG molecular heterogeneity is due both to structure variants and carbohydrate content, the consequence is the use of nonstandard nomenclature for hCG variants, absence of purified standards to achieve

ve accurate calibration and discrepant characterizations of hCG variants that are recognized by different hCG immunoassays. Our data for the pregnancy test methods comparison demonstrate that all samples, with hCG concentration between 15 and 70 IU/L, showed at least one disagreeing clinical result.

Conclusions. With different immunoassays giving different results for the same specimens, hCG measure-

ment standardization is an important problem and recently it has been a topic of great discussion. Also results obtained with urine quick tests aren't always easy to interpret, also if tests are performed by skilled technicians, and often manufacturer declared sensitivity is better than that demonstrated in our study.

key-words. hCG, pregnancy, early diagnosis

Introduzione

La gonadotropina corionica umana (hCG) è stata descritta inizialmente da Hirose nel 1920¹ nel corso di studi sulla struttura del corpo luteo nel coniglio e, da quel momento, la sua determinazione è stata accettata universalmente come strumento per la diagnosi ed il monitoraggio della gravidanza; inoltre è sicuramente riconosciuta come indicatore del coriocarcinoma², aumentando la sua importanza come marcatore tumorale in varie patologie e, più recentemente, è usata come indicatore di malformazioni fetali.

L'hCG è prodotta principalmente dalle cellule trofoblastiche della placenta ma può essere sintetizzata in tessuti non trofoblastici come cellule ipofisarie normali o cellule neoplastiche; appartiene alla famiglia degli ormoni glicoproteici, della quale fanno parte anche l'ormone luteinizzante (LH), l'ormone follicolo stimolante (FSH) e la tireotropina (TSH); queste quattro molecole sono degli eterodimeri ed hanno in comune la subunità α ma differiscono per la subunità β , che conferisce la specificità immunologica e funzionale. La subunità β dell'hCG presenta una notevole omologia con quella dell'LH, ma nell'estremità carbossi-terminale presenta un prolungamento di trentadue aminoacidi.

È stata descritta la struttura cristallina dell'hCG³: entrambe le subunità hanno una topologia simile, con tre ponti disolfuro che formano un residuo di cistina; tale struttura si trova anche in alcuni fattori di crescita, quale il fattore di crescita mutante- β (TGF- β) ed il fattore di crescita α derivante dalle piastrine (PDGF- β). Per stabilizzare l'eterodimero, una parte della catena β avvolge la catena α e forma, con legami covalenti, una specie di cintura di sicurezza. Questa struttura tridimensionale (Fig. 1) sembra fondamentale non solo per mantenere l'associazione delle subunità α e β , ma anche per il legame della glicoproteina con i relativi recettori. La conoscenza approfondita della struttura molecolare, che consente di identificare correttamente le differenti regioni sulla superficie della proteina, dovrebbe facilitare la mappatura degli epitopi e consentire, nel futuro, la messa a punto di metodi sempre migliori per la determinazione dell'hCG⁴.

L'hCG e la diagnosi di gravidanza

La possibilità di accertare lo stato di gravidanza senza dover attendere il suo procedere fino alla comparsa

dei primi segni clinici sicuri, cioè fino al 2° o 3° mese, è un problema molto sentito dai medici pratici fin dai tempi più remoti.

La ricerca di "segni", che siano di aiuto nella non facile diagnosi precoce di gravidanza, ottenuti attraverso esami di laboratorio su campioni di siero o di urina della donna, porta, nel corso dei secoli, alla realizzazione di molteplici "esami", frutto dapprima della fantasia e dell'acuto spirito di osservazione e quindi della ricerca nel campo della sierologia e della biochimica⁵. Che l'urina delle gravide contenesse un "quid" che non è presente nelle urine delle donne in condizioni normali o in quelle dei maschi era stato osservato già dagli antichi egizi. Nel famoso papiro di Ebers (circa 1400 a.C.) si trovano, infatti, degli originali quanto semplici test di gravidanza⁵⁻⁷.

La diagnosi biochimica ed il monitoraggio della gravidanza, con la misura della concentrazione dell'hCG, ha subito un'evoluzione metodologica molto importante: mentre negli anni '80 la concentrazione misurabile con il test immunologico di gravidanza su urine era di circa 3000 UI/L, i metodi oggi disponibili permettono di rilevare concentrazioni di hCG pari a 20-30 UI/L su urine e di 1 UI/L nel sangue.

L'elevata sensibilità di questi nuovi metodi, se da un lato ha consentito di rilevare precocemente lo stato di gravidanza, dall'altro ha determinato delle difficoltà di interpretazione dei livelli di hCG al di sotto di 15 mUI/L.

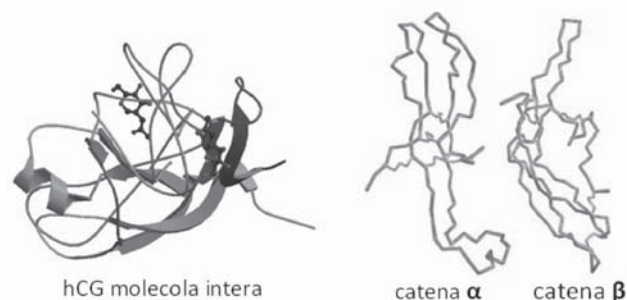


Figura 1. Struttura tridimensionale della molecola di hCG, con massa molecolare di 36,7 kDa, e delle singole subunità α e β . La subunità α è costituita da 92 aminoacidi, quella β da 145 aminoacidi ed è codificata da 6 geni, con elevato grado di omologia, localizzati sul cromosoma 19q13.3, contiguo al gene che codifica la catena β dell'LH.

Considerazioni diverse vanno fatte per i metodi per la determinazione di hCG nel siero rispetto a quelli utilizzati per le urine: i primi sono usati per le misure quantitative, mentre i secondi per la valutazione qualitativa del risultato. La differente matrice biologica su cui viene effettuata la determinazione implica problemi tecnico-analitici diversi.

La misura quantitativa dell'hCG nel sangue

Per quanto riguarda la determinazione della concentrazione ematica di hCG i vari metodi disponibili, seppure egualmente sensibili, si differenziano per la capacità di rilevare forme diverse di analita circolanti⁸⁻¹¹ e per la diversa sensibilità verso potenziali fattori interferenti.

I principali fattori che causano interferenza nella determinazione dell'hCG sono la presenza nel campione di siero della paziente di anticorpi umani anti-animale analita specifici o di anticorpi eterofili specie specifici. È stata stimata la presenza di questi tipi di anticorpi nel 5% della popolazione. Nessuno dei metodi commerciali disponibili risulta completamente indenne da questi potenziali interferenti¹².

Il riscontro di bassi livelli di hCG nel siero, senza significative variazioni di concentrazione nel tempo, può derivare da tre differenti situazioni¹³⁻¹⁸:

- interferenza di anticorpi che determinano un livello di hCG falsamente positivo per la misura su siero;
- patologia trofoblastica gestazionale quiescente;
- produzione ipofisaria di hCG.

L'interpretazione delle concentrazioni di hCG misurate non può prescindere dalla conoscenza delle isoforme riconosciute dagli anticorpi utilizzati nel dosaggio immunometrico. Le molecole correlate con l'hCG (Tab. I) sono presenti nei liquidi biologici nella forma di eterodimero sia intatto sia modificato (per esempio la forma *nicked* hCG), o come subunità libere (α e β), o ancora come prodotti di degradazione (per esempio

frammento β -core: β hCGcf)¹⁹⁻²². Il β hCGcf talvolta è utilizzato, ma in maniera fuorviante, per indicare il peptide gonadotropo urinario (UGP); tuttavia la denominazione UGP può essere utilizzata per indicare una porzione di molecola più diffusa del β hCGcf, che ha una struttura chimica ben definita⁹.

Il monitoraggio delle variazioni di concentrazione dell'hCG nel tempo contribuisce ad una corretta interpretazione clinica del dato di laboratorio²³. Si deve tenere presente che la concentrazione della forma biologicamente attiva dell'hCG cresce in modo esponenziale nel corso del primo trimestre della gravidanza: raddoppia ogni 48 ore sino a raggiungere un picco attorno alla decima settimana di gestazione. Le concentrazioni successivamente diminuiscono dalla decima alla sedicesima settimana, fino ad un valore pari ad un quinto rispetto alla concentrazione massima raggiunta e rimanendo approssimativamente a questo livello sino al termine della gravidanza. L'emivita della forma biologicamente attiva è di circa 40 ore.

L'intervallo di tempo corretto per la ripetizione della determinazione della hCG su siero, per verificare se la concentrazione aumenta, diminuisce oppure rimane invariata, è di 48-72 ore.

Esame qualitativo su urine

La diagnosi immunologica di gravidanza è l'esame di laboratorio da più tempo utilizzato come *point of care*, come *home test*, o come *self testing* sul cui risultato vengono assunte decisioni terapeutiche e comportamentali rilevanti, ma che più volte si è dimostrato fonte di errori, per la presenza di interferenze di varia natura che portano a risultati spesso falsamente positivi.

I prodotti reperibili in commercio, e normalmente utilizzati direttamente dal paziente, non differiscono da quelli in uso nei laboratori clinici. Tutti questi metodi hanno una sensibilità dichiarata di 25-50 mIU/L, ma le prestazioni reali differiscono in base alla capacità tec-

Tabella I: Principali isoforme della gonadotropina corionica umana (hCG) circolanti e molecole correlate con relativa nomenclatura IFCC.

ISOFORMA	Nomenclatura IFCC	Peso molecolare approssimato (kDa)
molecola intatta hCG	hCG	36,7
"nicked" hCG	hCGn	36,7
subunità β hCG libera	hCG β	22,2
subunità β "nicked" hCG	hCG β n	22,2
frammento β core hCG	hCG β cf	12,0
peptide C-terminale di hCG β	hCG β CTP	—
subunità α hCG libera	hCG α	14,5
subunità α hCG mutante	—	—
subunità α hCG grande	—	16,0
eterogeneità N-terminale	—	variabile
eterogeneità della parte carboidratica	—	variabile

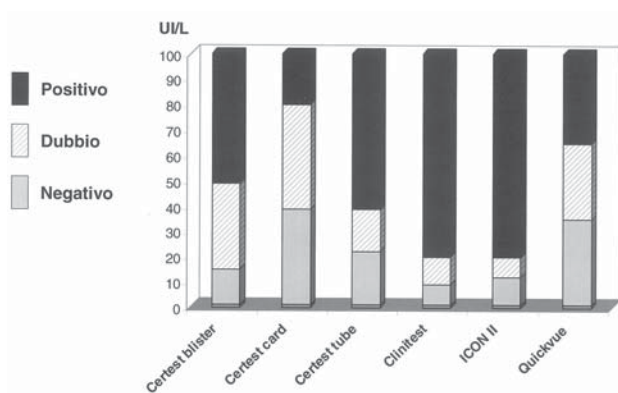


Figura 2. Relazione tra concentrazione di hCG in campioni di urina e l'interpretazione del risultato fornito da almeno tre tecnici di laboratorio. La sensibilità dichiarata da tutti i produttori è di 25 UI/L.

nica di chi esegue la prova soprattutto per bassi livelli di concentrazione dove l'esperienza può modificare la modalità di interpretazione del risultato. Infatti, i risultati falsamente positivi che spesso si riscontrano con l'uso di questi metodi, oltre che alla presenza di sostanze chimiche che mimano la presenza della hCG, sono dovuti ad un'errata interpretazione del dispositivo ed al non rispetto dei corretti tempi di esecuzione.

Materiali e Metodi

Per valutare la praticabilità e la standardizzazione di alcuni metodi per la diagnosi biochimica di gravidanza è stata eseguita, da personale di laboratorio, la ricerca qualitativa dell'hCG con differenti metodi commerciali. I metodi confrontati differiscono tra loro per il tipo di supporto di reazione adottato (striscia reattiva, tampone assorbente, ecc.) ma tutti sono commercializzati sia come test rapido per laboratorio sia come prodotto da banco da utilizzare come *home test*. I campioni di urine analizzati sono stati ottenuti da donne non in gravidanza in età fertile, da maschi, da donne in menopausa e da donne in gravidanza con concentrazioni di hCG comprese tra 0 e 2000 mUI/L e campioni di urina con elevata concentrazione di emoglobina. Complessivamente sono state eseguite 500 determinazioni.

I sistemi utilizzati nella valutazione sono stati: Certest hCG blister test, Certest hCG card e Certest hCG tube test (Certest Biotec, Zaragoza Spagna), Clinitest hCG (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown USA), ICON II hCG (Beckman Coulter, Fullerton USA) e Quickvue one-step hCG urine test (Quidel Corporation, San Diego USA). La sensibilità dichiarata da tutti i produttori è di 25 UI/L. L'interpretazione dell'esito delle misure è stato effettuato da almeno tre tecnici di laboratorio. Per ogni campione la determinazione con tutti i sistemi è stata effettuata contemporaneamente, senza necessità di conservare il campione stesso, ed è stata determinata la concentrazione di hCG

con metodo immunochemioluminescente (Liaison, DiaSorin Saluggia VC).

Risultati

Nella Figura 2 è riportata la distribuzione dei campioni con concentrazione di hCG inferiore a 100 UI/L e la relativa interpretazione del risultato, la definizione di risultato "dubbio" è stata adottata quando non vi era concordanza nell'interpretazione del risultato. In tutti i campioni con concentrazioni di hCG comprese tra 15 e 70 UI/L, almeno uno dei metodi utilizzati porta ad un risultato contrastante con gli altri sistemi di confronto e non si può definire una chiara interpretazione del risultato.

Discussione

L'esecuzione della prova immunologica di gravidanza su urine, eseguita correttamente, permette di confermare un eventuale stato di gravidanza se la distanza della prova dal giorno del probabile concepimento è di almeno 15-20 giorni. In caso di gravidanza, la concentrazione di hCG risulta sufficientemente elevata e quindi facilmente rilevabile anche con i metodi qualitativi.

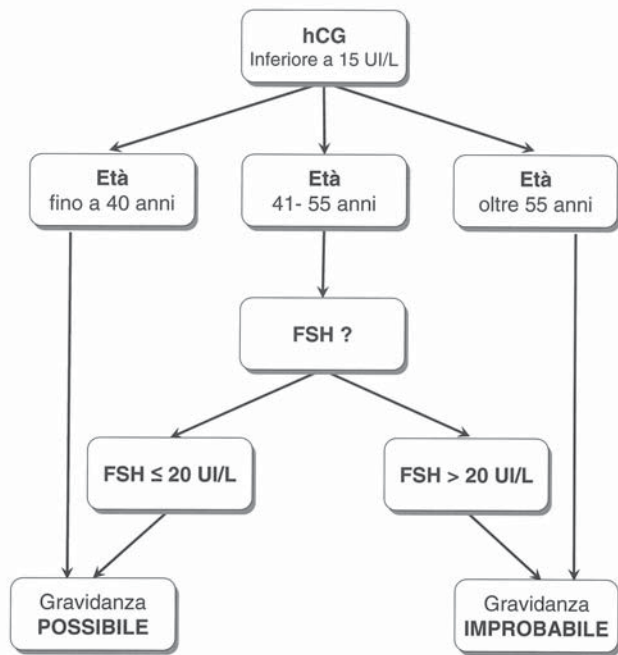
Nel caso in cui le informazioni anamnestiche non siano sufficienti per determinare la data dell'eventuale concepimento, ovvero non sia trascorso da tale data un periodo di tempo sufficiente per poter eseguire una prova su urine, è necessario ricorrere alla determinazione dell'hCG su sangue. L'interpretazione della concentrazione misurata su sangue risulta definitiva se inferiore alla sensibilità del metodo: una concentrazione di hCG non determinabile esclude, di fatto, lo stato di gravidanza.

L'estrema sensibilità dei metodi per le determinazioni quantitative consente di rilevare, oltre all'hCG prodotto da tessuti non trofoblastici, anche le cosiddette gravidanze chimiche: si tratta in pratica di aborti precoci (entro la quarta settimana) che si evidenziano solo con la determinazione dell'hCG nel sangue, che diversamente non sarebbero riconosciuti.

Il significato da attribuire alle concentrazioni di hCG fino a 15 mUI/L non è univoco o definitivo. In queste situazioni l'eventuale stato di gravidanza è evidenziabile eseguendo una seconda determinazione dopo 48 ore: in caso di gravidanza entro la decima settimana di gestazione la concentrazione raddoppia.

La determinazione dell'ormone follicolo stimolante (FSH) e la valutazione dell'età della paziente contribuiscono a dirimere i casi dubbi (Fig. 3). In donne con età inferiore a 55 anni e FSH inferiore a 20 UI/L la gravidanza è uno stato possibile con un valore di hCG 15 mUI/L, mentre è improbabile la diagnosi di gravidanza se l'età è superiore a 55 anni e l'FSH superiore a 20 UI/L²⁴.

Le concentrazioni di hCG superiori a 15 mUI/L, in assenza di problemi di interferenze, sono da conside-



Modificato da McCudden CR, et al. Clin Chem 2008;54:1 209-214

Figura 3. Percorso diagnostico per la valutazione di basse concentrazioni di hCG.

rarsi compatibili con lo stato di gravidanza.

Il riscontro di concentrazioni elevate di hCG, non plausibili con il quadro clinico, debbono essere segnalate al laboratorio per l'esclusione della presenza di sostanze interferenti.

In conclusione, la valutazione delle concentrazioni ematiche di hCG e delle altre gonadotropine consentono di dare importanti indicazioni nella diagnosi di gravidanza, mentre l'uso dei metodi qualitativi che consentono di rilevare, con ragionevole sicurezza, solo concentrazioni elevate di hCG nelle urine è limitato alla conferma dello stato di gravidanza, atteso dalle informazioni anamnestiche, ed è indicato come "home test".

Bibliografia

- Hirose T. Exogenous stimulation of corpus luteum formation in the rabbit; influence of extracts of human placenta, deciduas, fetus, hydatid mole and corpus luteum on the rabbit gonad. J Jpn Gynecol Soc 1920; 16:1055.
- Bagshawe KD. Recent observations related to the chemotherapy and immunology of gestational choriocarcinoma. Adv Cancer Res 1973; 18:231-63.
- Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature 1994; 369:455-61.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N, et al. Immunochemical mapping of gonadotropins. Mol Cell Endocrinol 1996; 125:33-43.
- Dall'Olivo G, Fortunato A. La diagnosi precoce di gravi-

danza prima dei metodi immunologici. Lo "stato dell'arte" nei primi decenni del Novecento. Ligand Assay 2000; 8:66-9.

- Cuboni E. Reazioni biologiche di gravidanza. Milano: Opera Medica Wasserman; 1935.
- Cuboni E. La diagnosi di gravidanza mediante la ricerca degli ormoni sessuali nell'urina. Lo Sperimentale 1932; 86:259-302.
- Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. Clin Chem 1997; 43:2233-43.
- Sturgeon CM, McAllister EJ. Analysis of hCG: clinical applications and assay requirements. Ann Clin Biochem 1998; 35:460-91.
- Gronowski AM, Grenache DG. Characterization of the hCG variants recognized by different hCG immunoassays: an important step toward standardization of hCG measurements. Clin Chem 2009; 55:1447-9.
- Sturgeon CM, Berger P, Bidart JM, Birken S, Burns C, Norman RJ, et al. Differences in recognition of the 1st WHO International Reference Reagents for hCG-related isoforms by diagnostic immunoassays for human chorionic gonadotropin. Clin Chem 2009; 55:1484-91.
- Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin Chem 1999; 45:942-56.
- Cole LA. "Background" human chorionic gonadotropin in healthy, nonpregnant women. Clin Chem 2005; 51: 1765-6.
- Snyder JA, Haymond S, Parvin CA, Gronowski AM, Grenache DG. Diagnostic considerations in the measurement of human chorionic gonadotropin in aging women. Clin Chem 2005; 51:1830-5.
- Stenman UH, Alfthan H, Ranta T, Vartiainen E, Jalkanen J, Seppala M. Serum levels of human chorionic gonadotropin in nonpregnant women and men are modulated by gonadotropin-releasing hormone and sex steroids. J Clin Endocrinol Metab 1987; 64:730-6.
- Chen HC, Hodgen GD, Matsuura S, Lin LJ, Gross E, Reichert LE Jr, et al. Evidence for a gonadotropin from nonpregnant subjects that has physical, immunological, and biological similarities to human chorionic gonadotropin. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 23:2885-9.
- McCudden CR, Willis MS, David G, Grenache DG. Persistent low concentration of human chorionic gonadotropin in a nonpregnant woman. Clin Chem 2008; 54: 209-14.
- Alfthan H, Haglund C, Dabek J, Stenman UH. Concentration of human chorionic gonadotropin, its β subunit, and the core fragment of the β -subunit in serum or urine of men and non-pregnant women. Clin Chem 1992; 38:1981-7.
- Whittington JD, Fantz CR, Gronowski AM, McCudden C, Mullins R, Sokoll L, et al. The analytical specificity of human chorionic gonadotropin assays determined using WHO International Reference Reagents. Clin Chim Acta 2010; 411:81-5.
- Birken S, Kovalevskaya G, O'Connor J. Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms. Mol Cell Endocrinol 1996; 125:121-31.
- Stenman UH, Bidart JM, Birken S, Mann K, Nisula B, O'Connor J. Standardization of protein immunoprocures. Choriogonadotropin. (GC). Scand J Clin Lab Invest Suppl 1993; 216:42-78.
- Gambino R. Human chorionic gonadotropin: multiple

- degradation products confound assays. *Lab Medica Int* 1996; July/August:18-9.
23. Pittaway DE, Wentz AC. Evaluation of early pregnancy by serial chorionic gonadotropin determinations: a comparison of methods by receiver operating characteristic curve analysis. *Fertil Steril* 1985; 43:529-33.
24. McCudden CR, Willis MS, David G, Grenache DG. Persistent low concentration of human chorionic gonadotropin in a nonpregnant woman. *Clin Chem* 2008; 54: 209-14.