48

GIUSEPPE BANFI
ERMINIA CASARI
MICHELANGELO MURONE
PIERANGELO BONINI

La coriogonadotropina umana

Laboratorio Analisi
Istituto Scientifico San Raffaele,
Via Olgettina, 60
20132 Milano

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 80.80.51

Editoriale

Per parlare della gonadotropina corionica umana sia nei suoi aspetti biochimici e clinici generali sia come marker tumorale ed illustrare le problematiche che sorgono con le varie metodologie di dosaggio che possono comportare l'uso di tecniche isotopiche o non-isotopiche, abbiamo invitato l'équipe del Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche diretta dal Professor Pierangelo Bonini.
Il dottor Giuseppe Banfi laureatosi in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Pavia e specializzato in Igiene e Medicina Preventiva presso l'Università di Milano nel 1988, è assistente presso il Laboratorio di Analisi dell'Istituto Scientifico S.Raffaele, responsabile del Settore di Immunochimica ed autore di numerose pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali nel campo dell'ematologia, in particolare della automazione delle conte cellulari, e dell'ormonologia. Il dottor Banfi è membro della SIBioc dal 1986, ha partecipato ai lavori della Commissione Proteine e della Commissione 14 (Immunometria) diretta dal Prof. Pazzagli, oltre che dell'AACC dal 1987.
La dottoressa Erminia Casari, laureata in Scienze Biologiche presso l'Università di Milano con una tesi sperimentale proprio su questo tema, dispone attualmente di una Borsa di Studio per la certificazione di sieri di controllo per dosaggi chimico-clinici. Le pubblicazioni e le partecipazioni ai congressi hanno riguardato l'ormonologia e, in particolare, lo studio del dosaggio dell'hCG.
Il dottor Michelangelo Murone dopo essersi laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Bologna, ha conseguito la specializzazione in Igiene e Sanità Pubblica presso la stessa Università. Ha lavorato in qualità di Aiuto prima a Macerata e quindi presso l'Ospedale di Aosta dove ha iniziato la collaborazione con il Professor Bonini che ha seguito a Milano presso il Laboratorio Analisi dell'Istituto San Raffaele. Attualmente ricopre anche il compito di Professore a contratto presso la Scuola di Specializzazione di Endocrinologia e Malattie del Ricambio.
Il Professor Pierangelo Bonini, caposcuola di questo gruppo, è specialista in Cardiologia ed in Anatomia, Istopatologia e Tecniche di Laboratorio quindi in Igiene e Medicina Preventiva; è Libero Docente in Chimica e Microscopia Clinica. Dopo aver diretto il Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Regionale di Aosta è passato a dirigere quello dell'Ospedale San Raffaele di Milano. Il Professor Bonini ha una ricca ed intensa attività didattica ed attualmente è Professore a contratto presso la Scuola di Specializzazione in Biochimica e Chimica Clinica dell'Università di Milano. E', inoltre, membro attivo delle più importanti associazioni scientifiche nazionali ed internazionali operanti nel settore della Medicina di laboratorio ed in particolare della biochimica clinica, fa parte dello staff editoriale del Journal of Automatic Chemistry, del Giornale Italiano di Chimica Clinica e del Ligand quarterly edizione italiana. Fa parte ancora del Comitato Scientifico del MAC, mostra Internazionale delle apparecchiature scientifiche e dell'ATB, edizione europea dell'Oak Ridge Conference. Il Professor Bonini è autore di oltre 130 pubblicazioni scientifiche comparse su riviste di importanza nazionale ed internazionale.

Sergio Rassu

Generalità

La coriogonadotropina umana (hCG) è una glicoproteina con attività ormonale, tipicamente legata allo stato di gravidanza. La glicoproteina risulta composta da due catene diverse, le subunità α e β, unite da legami non covalenti. L'attività biologica dell'hCG è presente solo con la combinazione delle due subunità, di cui l'α ha peso molecolare di 14.900 daltons, con una sequenza di 92 amminoacidi simile a quella delle subunità α degli ormoni luteotropina (LH), follitropina (FSH) e tireotropina (TSH). La subunità β ha peso molecolare 23.000 , è costituita da 145 amminoacidi e conferisce la specificità all'ormone, per quanto esista una certa omologia con LH, FSH e TSH. In particolare, vi è una omologia dell'80% degli amminoacidi tra hCG e LH; l'hCG presenta però un peptide carbossiterminale di 24 amminoacidi assolutamente caratteristico (39). L'esistenza di un grado relativo di omologia tra le subunità degli ormoni glicoproteici ha condotto ad ipotizzare che i geni per le subunità α e β presentassero un'origine comune (29). Esistono almeno sei geni che codificano per la catena β, ma solo tre vengono trascritti (98). Le subunità α presentano due oligosaccaridi uniti a molecole di asparagina, mentre le β ne presentano uno (73). La subunità β presenta altri quattro oligosaccaridi legati a residui di serina lungo la porzione carbossiterminale di 24 amminoacidi caratteristica dell'ormone. L'hCG è prodotta dalle cellule del sinciziotrofoblasto, a livello del reticolo endoplasmatico granuloso, con l'intervento di RNA messaggeri differenti per le subunità α e β. Il fattore limitante per la formazione di molecole complete sembra essere la produzione di subunità β. In effetti, la liberazione di subunità libere si manifesta nella normale gravidanza, in cui si assiste, nel terzo trimestre, al raddoppio del rapporto α / β, e in tumori in cui si riscontrano con facilità catene β libere (83). La sintesi di hCG potrebbe essere regolata dalla luliberina (LHRH), ormone ipotalamico che è in grado di far liberare dall'ipofisi FSH e LH, con meccanismo AMPciclico-mediato. L'attività biologica dell'hCG è rappresentata dal mantenimento della funzione del corpo luteo durante le prime settimane di gravidanza, stimolando la produzione di progesterone attraverso l'attivazione dell'AMPciclico, fino alla formazione della placenta, che ne vicaria le attività. L'hCG promuove anche la steroidogenesi fetale con la sintesi di deidroepiandrosterone solfato e progesterone e la liberazione di testosterone da parte del testicolo fetale, tramite la stimolazione della 22-27 desmolasi e della 17-20 desmolasi. E' probabile che l'hCG possa costituire anche il fattore che inizia la produzione steroidea dell'unità fetoplacentare (2).

Significato clinico

Comparsa nella gravidanza

Il significato clinico dell'hCG risiede essenzialmente nella diagnosi di gravidanza. La presenza dell'ormone nel sangue può essere evidenziata in un periodo compreso tra 6 e 18 giorni dall'ovulazione e sembra esser correlata con l'impianto dell'uovo fecondato presso l'utero e la costituzione di una circolazione sanguigna mista. Normalmente, lo zigote, derivato dalla penetrazione dello spermatozoo attraverso la zona pellucida nell'uovo e dall'unione dei due gameti, va incontro a rapide e successive divisioni che conducono allo stadio di morula. Nel frattempo, vi è uno spostamento dello zigote dalla tuba verso la cavità uterina, che viene raggiunta dopo circa quattro giorni dall'avvenuta fecondazione dell'uovo. La blastocisti, costituita da un involucro cellulare rivestente una cavità contenente fluido, si impianta sulla parete posteriore dell'utero erodendo l'endometrio grazie all'azione proteolitica di enzimi prodotti da alcune cellule superficiali che costituiranno, dopo pochi giorni, un singolo strato specializzato (pretrofoblasto). In seguito, la differenziazione di tali cellule avanza, con la formazione del trofoblasto e di una vera e propria unità funzionale con l'utero (sincizio). Il sinciziotrofoblasto penetra più profondamente nell'endometrio e stabilisce un contatto ed una continuità tra il circolo materno (sinusoidi) e le lacune, cavità che si formano all'interno dello strato cellulare per la confluenza di vacuoli intracellulari. Lo stabilirsi di una circolazione fetale avviene nella seconda settimana dalla fecondazione. La fusione delle cellule trofoblastiche con il connettivo uterino dà origine al corion che assume le capacità produttive endocrine del trofoblasto. Dal corion si sviluppa, infine, la struttura della placenta che, circa alla fine del secondo mese di gravidanza, sostituisce nelle sue funzioni il trofoblasto. Autori belgi hanno dimostrato la presenza di hCG nel siero dopo 9 giorni dalla fertilizzazione in vitro (21), con la conferma dei dati di Armstrong (4) che evidenziò hCG nelle urine di due donne 9 giorni dopo inseminazione artificiale. In caso di fertilizzazione in vitro e trasferimento dell'embrione (FIVET) Englert (27) notò la presenza di hCG nel siero materno 12 giorni dopo lo stimolo all'ovulazione. Il ritardo dell'incremento dell'hCG nelle gravidanze dovute a FIVET dovrebbe esser imputato allo stress dell'ovocita nella fase "in vitro". In una serie di 19 gravidanze normali (53) aumenti sierici significativi di hCG si ritrovarono dopo 8 giorni dal picco di LH in una donna, dopo 9 giorni in 3, dopo 10 in 10, dopo 11 in 5. In una serie di 121 FIVET, di cui 17 con successo e impianto della blastocisti, nell'80% di queste si aveva evidenza dell'impianto tra 12 e 13 giorni, utilizzando un metodo radiommunologico su urine (54). Walker et al (104) confermano una media di 11 giorni (deviazione standard di 1.3 giorni) per la comparsa di hCG nelle urine, in caso di gravidanza normale (Tab. 1).

Riferimento bibliografico	Giorno	Tipo di gravidanza
Collette et al. (7)	9	dopo fertilizzazione in vitro
Amstrong (8)	9	dopo inseminazione artificiale
Englert (9)	12	FIVET
Lenton (10)	10	gravidanza normale
Walker (11)	11	gravidanza normale

Tabella 1. Giorno di comparsa dell'hCG nel siero secondo varie ricerche.

Il loro studio è stato condotto su campioni di urina raccolti quotidianamente da 38 donne volontarie che desideravano una gravidanza. Lo scopo del lavoro risiedeva nella definizione della frequenza delle cosiddette "gravidanze biochimiche", con la presenza di hCG nei materiali biologici ma senza evidenze clinicamente rilevabili. Su 25 donne andate incontro a concepimento, la più rapida comparsa di hCG è stata notata dopo 8 giorni dall'ovulazione, stabilita come il giorno del primo incremento dell'LH (3 volte la media dei precedenti 3 giorni) durante la fase del picco dell'LH, allorchè tale incremento fosse seguito da almeno un raddoppio del pregnandiolo urinario entro 72 ore. Al contrario, in 50 donne che non avevano concepito, non si avevano mai valori di hCG >20 U/L dopo 7 o più giorni dall'ovulazione. Lo studio di Walker et al. mette in evidenza la fondamentale importanza dell'esatta definizione delle date di ovulazione per valutare i tempi di comparsa dell'hCG dopo l'avvenuto concepimento. Inoltre, gli Autori sottolineano anche l'importanza della specificità degli antisieri usati nei sistemi di dosaggio dell'hCG. Utilizzando infatti un antisiero meno specifico e quindi più soggetto ad interferenze, in particolare da parte dell'LH, 7 delle 50 donne che sicuramente non avevano concepito potevano esser classificate come se fossero all'inizio di una gravidanza con valori >50 U/L in un caso e >20 U/L negli altri. La conclusione, pertanto, è che il fenomeno della cosiddetta "gravidanza biochimica" è in realtà sovrastimato e legato all'utilizzo di metodi analitici e clinici inaccurati. Durante la gravidanza i livelli di hCG aumentano esponenzialmente, raggiungendo un picco dopo 8-10 settimane dall'ultima mestruazione. A partire dalla 10ª-14ª settimana i valori di hCG si riducono notevolmente e dalla 15ª alla 23ª con minor rapidità, fino a raggiungere livelli inferiori a quelli riscontrabili all'inizio della gravidanza (Fig. 1).
Si può calcolare che il periodo necessario per avere un raddoppiamento del valore di hCG sia di 14 giorni durante il primo mese di gravidanza e di 2-2.7 nel secondo. La concentrazione di hCG nel siero può anche esser utilizzata per la datazione della gravidanza, associata ad altri elementi di cui il più importante, ma meno accurato, è la data delle ultime mestruazioni. Il calcolo della durata della gravidanza, in base al livello dell'ormone può risultare molto accurato, come dimostrato da Lagrew (51) con differenze tra metodo chimico e metodo tradizionale basato sulla data delle ultime mestruazioni di 3 giorni, in media. Bandi et al (8) propongono un preciso algoritmo per l'utilizzo clinico dei valori di hCG. I livelli dell'ormone che risultano significativi clinicamente

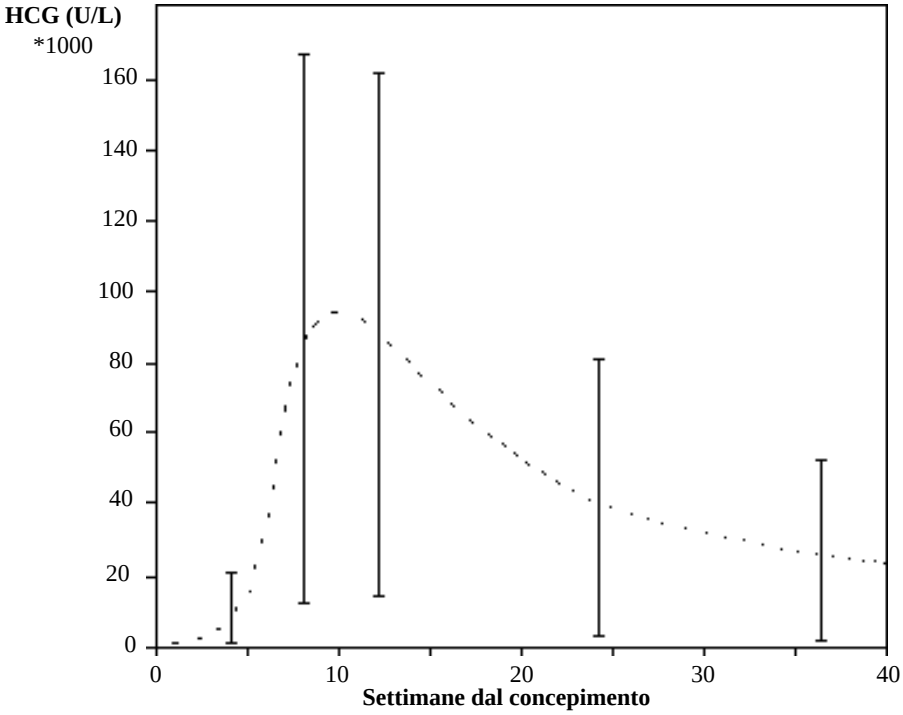


Figura 1. Curva dell'andamento della concentrazione dell'hCG nel siero durante una normale gravidanza.

possono esser distinti per sospetto di gravidanza (5 U/L), per conferma di gravidanza (25 U/L), per diagnosi di gravidanza ectopica in associazione con l'ecografia (6.000-6.500 U/L), per diagnosi di mola vescicolare in associazione con l'ecografia (85.000 U/L). Inoltre, la concentrazione di 25.000 U/L può esser usata per migliorare l'accuratezza del rilievo ecografico di gravidanza molare. I livelli decisionali proposti dagli Autori sono riferiti ad un metodo immunoenzimatico semiquantitativo, ma potrebbe esser verificato con altri metodi che rispettano alcune condizioni, ovvero:
a) assenza di falsi positivi ai limiti di sensibilità; b) possibilità di incrementare la sensibilità fino a 5 U/L aumentando il volume dei campioni; c) possibilità di usare una soluzione non costosa (fisiologica) per diluire i campioni e portare i limiti di sensibilità al di sotto delle 25 U/L. L'algoritmo prevede diverse condizioni:
- *Sospetta gravidanza.* Basse concentrazioni di hCG (<25 U/L) possono esser presenti in gravidanze precoci o anomale: si devono utilizzare metodi con elevata sensibilità per confermare o meno l'avvenuto concepimento. Se vi è negatività con tali metodi sensibili si può escludere la presenza di tessuto trofoblastico. La positività, al contrario, con un metodo sensibile non potrebbe esser usata, secondo gli Autori, come un indicatore preciso di gravidanza, dato che concentrazioni di hCG tra 5 e 25 U/L possono esser

trovate in soggetti non in gravidanza. Una normale gravidanza può esser confermata solo se la concentrazione di hCG risulta superiore a 25 U/L.
- *Conferma di gravidanza.* La conferma di gravidanza viene conferita da hCG> 25 U/L, come detto, in unione con i sintomi clinici. Un risultato negativo con un metodo che presenta sensibilità pari a 25 U/L deve esser confermato da un successivo esame 48 o 72 ore dopo. Se la negatività permane, la gravidanza può esser esclusa, se vi è positività con metodi maggiormente sensibili (5 U/L), si è di fronte ad una gravidanza iniziale o anomala. Anche in tal caso è consigliabile la ripetizione dell'esame dopo 48 o 72 ore.
- *Monitoraggio di gravidanza.* Se vi è hCG >25 U/L, si deve seguire la curva di concentrazione dell'ormone per almeno 8 settimane per dimostrare un regolare incremento di almeno il 66% ogni due giorni.
- *Valutazione di gravidanza anomala.* Posto il sospetto clinico di una gravidanza ectopica, la massima accuratezza diagnostica è raggiunta con l'uso contemporaneo di ecografia e hCG sierica. La linea di demarcazione per l'hCG è posta a 6.000-6.500 U/L nel primo trimestre, concentrazione che si rileva tipicamente in una regolare gravidanza allorché il sacco gestazionale è visibile ecograficamente. Solo nel 10% delle gravidanze ectopiche si hanno valori di hCG> 6.500 U/L al momento della loro scoperta.
- *Valutazione di degenerazione molare di gravidanza.* Dato che esiste una sovrapposizione tra le concentrazioni di hCG di gravidanze regolari e mole idatiformi (vedi più avanti), le determinazioni di hCG su siero e urine sono da sole insufficienti, specialmente durante il periodo compreso tra la fine del primo trimestre e l'inizio del secondo. Peraltro, la diagnosi solamente ecografica è altrettanto difficoltosa nel primo trimestre, dato che le vescicole molari risultano di dimensioni molto ridotte, ai limiti di risoluzione della metodica ad immagini. L'unione dei due metodi migliora la possibilità di diagnosi: valori di hCG oltre 83.000 U/L, in assenza di pulsazioni cardiache fetali, fanno sospettare una malattia proliferativa del trofoblasto.

Metabolismo dell'hCG

Il tempo di emivita dell'hCG sembra esser distinto per una sua componente che scompare entro sei ore e per un'altra che scompare tra 12 e 38 ore (6,34,80,99). Tale tempo viene ridotto dalla rimozione dell'acido sialico o dalla divisione in subunità. Infatti, la vita media della molecola intera è 100 volte superiore a quella della singola subunità β: ciò comporta, in pratica, che la specie molecolare più rappresentata nel sangue periferico sia la prima, posto che hCG intera e βhCG vengano escrete in quantità equimolecolari (86,106,107). Alla fine della gravidanza la scomparsa dell'ormone avviene in un periodo compreso tra una e tre settimane (68), mentre occorrono da sei a venti settimane per assistere ad una sua riduzione dopo l'emissione di una mola vescicolare (110). Dopo un aborto, si ha completa scomparsa dell'hCG entro due mesi,ma, in genere, sono sufficienti 15 giorni (58,59). La clearance dell'hCG è prevalentemente renale e vi è una stretta correlazione tra le concentrazioni in siero ed urine, a prescindere dal

volume e dal tempo di raccolta come dimostrato da vari studi, in particolare da McCready et al (63). Esiste anche una stretta correlazione tra le concentrazioni di hCG nel siero materno e nel liquido amniotico (20,49,50). Nell'amnios la concentrazione dell'hCG ha un andamento simile, nel tempo, a quello riscontrato nel siero con un rapporto tra liquido amniotico e siero di 1.3 alla decima settimana, che poi si riduce per effetto, soprattutto, di una diluizione dovuta all'aumento di volume del liquido amniotico (74). L'hCG oltrepassa, in una certa misura, la barriera ematoencefalica con una proporzionalità tra valori riscontrabili nel liquor e nel siero dello stesso soggetto. Su 26 donne sottoposte ad anestesia spinale per partorire, è stato calcolato un rapporto tra siero e liquor di 289 (71). La valutazione dell'hCG liquorale può esser richiesta per scoprire o monitorare metastasi al sistema nervoso centrale di coriocarcinoma, sospettabili se esiste un rapporto siero / liquor inferiore a 30.

Incrementi dell'hCG

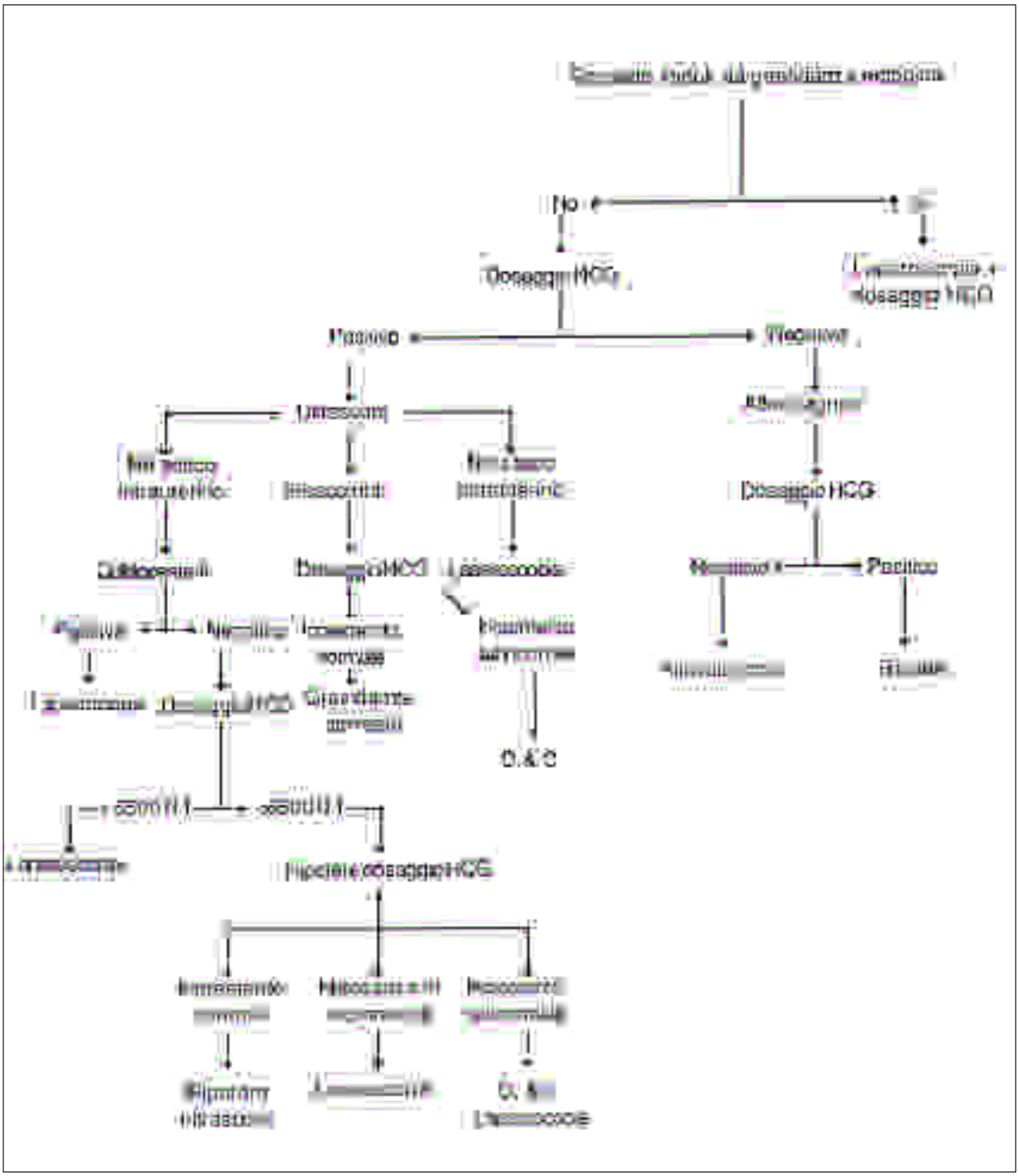
Si assiste ad aumenti di hCG nella preeclampsia (88), così come alcuni Autori ritengono l'incremento dell'ormone responsabile della nausea e del vomito riscontrabili nel primo trimestre di gravidanza (45). Altra azione imputata all'hCG, ma molto discussa, è la possibile induzione dell'immunosoppressione, con un importante effetto nell'impedimento, in associazione con altri fattori, del rigetto del prodotto del concepimento per reazione del sistema immunitario materno. Altra causa di aumento dell'hCG è la presenza di più prodotti del concepimento (46,78). In donne con una gravidanza gemellare si riscontrava la presenza di livelli di hCG di circa il doppio del normale (44), con una crescita della concentrazione molto più rapida. Altri Autori (16) non hanno però confermato tali risultati: i livelli di hCG non si presentavano più elevati in donne con gravidanze multiple rispetto a quelle con gravidanza gemellare, e, in queste, solo nel 60% dei casi si avevano risultati superiori alle normali gravidanze.

Aborto spontaneo

La valutazione dell'hCG è utile nella diagnosi di sospetto aborto spontaneo che risulta essere la più frequente complicanza della gravidanza (11,40,89), specie in associazione con i metodi ecografici. La sua drastica riduzione è un valido indice di avvenuto aborto.

Gravidanza ectopica

La gravidanza ectopica si determina per un impianto dell'uovo fecondato in sede extrauterina, nella massima parte dei casi presso le tube, più raramente nel segmento interstiziale, cervice, ovaio o cavità peritoneali. La diagnosi precoce di una gravidanza extrauterina è fondamentale, dato che tale condizione può essere letale per la paziente o comunque comprometterne la fertilità. In presenza di dolori acuti addominali, con perdite vaginali di sangue, si deve sospettare la gravidanza ectopica ed effettuare il dosaggio dell'hCG. La frequenza di gravidanza ectopica è quasi triplicata negli USA negli ultimi 10 anni, con 53.000 casi nel 1981 (61), con una contemporanea riduzione delle morti grazie alla possibilità di diagnosi precoce. Tale diagnosi si basa innanzitutto sui sintomi clinici, che però non sono sempre evidenti, ed anzi si manifestano, secondo alcuni Autori, solo in una piccola quota di casi (92) e, oltretutto, sono simili a quelli di altre comuni patologie ginecologiche (endometriti, torsione di cisti ovarica, aborto spontaneo...). E' evidente quindi che risultano importanti alcune indagini strumentali ed analitiche quali l'ecografia e il dosaggio dell'hCG nel siero, che si deve ritenere l'esame di scelta (Tab. 2).
Nel caso in cui tale valutazione non sia disponibile, si può ricorrere a tecniche invasive come la culdocentesi (procedura rapida per evidenziare eventuale sanguinamento intraperitoneale) o la laparoscopia (indicata in presenza di ecografia pelvica negativa e hCG sierica >6500 U/L o in presenza di sospetto clinico di gravidanza ectopica e culdocentesi negativa). In presenza di una gravidanza ectopica, la concentrazione iniziale di hCG può notevolmente variare da livelli bassissimi fino a valori vicini a 200.000 U/L (16,84,18). Sembra, inoltre, che i valori di hCG siano più elevati in caso di rottura di tuba, per l'erosione provocata dall'impianto. Solamente in rari casi (<1%) l'analita non e' misurabile, pur usando metodi molto sensibili (90,95), a causa di una ridotta produzione, completamente risolta dalla clearance renale. In caso di sospetto clinico di gravidanza ectopica, si può eseguire un test qualitativo che può confermare la diagnosi. Se possibile, si esegue un test quantitativo rapido e sensibile che offre la sicurezza della diagnosi, con valori di hCG ridotti rispetto alla durata presumibile della gravidanza. Se la paziente non presenta problemi emodinamici, è preferibile agire fin dal principio con metodi quantitativi, possibilmente con prelievi seriati onde seguire la discesa dell'ormone. Le Maistre et al (52) hanno proposto l'utilizzo di una metodica qualitativa su urine per lo screening e la diagnosi di gravidanza ectopica ottenendo buoni risultati (98.6% di specificità). La casistica dello studio di screening comprendeva 3790 donne con storia clinica o sintomi compatibili con l'esistenza di gravidanza ectopica. Tali casi sono stati raccolti durante un periodo di 18 mesi. Veniva effettuato routinariamente un test qualitativo su urine e, se necessario, si procedeva poi a test quantitativo su siero, ecografia o culdocentesi. Sono state identificate gravidanze ectopiche in 142 donne (3.7% del totale dei casi) con età media di 28.3 anni, di cui 51 (36%) al primo concepimento. Risultano interessanti alcuni dati epidemiologici derivati da tale studio: il 65% delle gravidanze ectopiche era localizzato a destra e il 26% aveva determinato rottura di tuba ed emorragia intraaddominale, mentre l'età gestazionale


No
Dosaggio HCG
Dosaggio HCG
Positivo
Dosaggio HCG
Positivo
D.&C

risultava compresa, nei 21 casi in cui il materiale tissutale fetale era sufficiente per un'adeguata ricerca anatomica, tra 36 e 64 giorni. La sensibilità clinica del metodo qualitativo usato si presentava molto elevata. I due casi risultati negativi presentavano valori di 8 e 20 U/L con metodica RIA o EIA, al di sotto dei limiti di sensibilità della metodica utilizzata in routine. La sensibilità clinica dei metodi quantitativi era del 100%, con valori che variavano da 8 a 77.166 U/L. La sensibilità clinica dell'ecografia era decisamente più bassa (46%): solo in 9 casi era possibile evidenziare un sacco gestazionale con battito fetale cardiaco. In 60 casi (48%) non si visualizzavano masse annessiali o intrauterine e in 5 (4%) il rilievo ecografico era di cisti ovarica. La culdocentesi risultava maggiormente sensibile rispetto all'ecografia con la diagnosi del 77% dei casi. E' certamente improponibile comparare le sensibilità cliniche delle tecniche strumentali e della determinazione dell'hCG, dato che le prime possono effettivamente fornire la diagnosi di gravidanza ectopica mentre la presenza dell'ormone indica esclusivamente gravidanza in atto: è fondamentale, ai fini dell'accertamento definitivo di gravidanza ectopica, utilizzare entrambe le metodiche. In tal senso, una metodica qualitativa dotata di buona sensibilità può agevolmente sostituire una quantitativa, con la riduzione di costi e tempi e con la possibilità di effettuare l'analisi in regime d'urgenza, seguita eventualmente dalla conferma con altra metodica. Daae (23) non è invece dell'avviso degli Autori della ricerca descritta e dichiara una netta preferenza per la valutazione dell'hCG su siero piuttosto che su urine nel caso di sospetta gravidanza ectopica. In alcune pazienti, in cui la produzione di hCG è bassa, la quota sierica può essere facilmente superiore a quella urinaria. In effetti, in 10 pazienti con gravidanza ectopica, i valori sierici risultavano più elevati in 7 casi, indicando quindi nel test quantitativo su siero l'analisi di prima scelta per una diagnosi precoce di gravidanza extrauterina. L'effettuazione di tale analisi può avvalersi di nuove metodiche semplici e veloci, utilizzabili anche direttamente al di fuori del laboratorio (bedside assays). Si valuta che la soglia di 6500 U/L possa essere utilmente applicata per discriminare gravidanze patologiche da gravidanze normali, in presenza di rilievo ecografico di sacco gestazionale, benche' alcune ricerche raccomandino livelli di 3.600 U/L. Se il livello di hCG è <6000 U/L e viene rilevato ecograficamente un sacco gestazionale, vi è la probabilità del 65% di una patologia della gravidanza. Altro approccio al monitoraggio di gravidanze ectopiche è la valutazione seriale dell'hCG (circa ogni due giorni) che presenta, in tal caso, incrementi in 48 ore inferiori al 66%, come invece avviene in gravidanze fisiologiche (8). Anche l'analisi immunoistochimica può avere un certo ruolo nella diagnosi e, in particolare, nella diagnosi differenziale della gravidanza ectopica. Autori tedeschi (72) hanno utilizzato alcuni markers (hCG, CA125, CA19.9, CEA) su materiale intrauterino fresco o fissato. Come materiale di riferimento è stato utilizzato tessuto proveniente da gravidanze interrotte precocemente per motivi psichiatrici. In tutti i 15 casi investigati si è avuto il riconoscimento del tessuto ectopico con tutti i markers, ma con particolare evidenza per l'hCG. Tale approccio può essere importante come test di conferma in casi dubbi.

hCG come marker tumorale

La valutazione dell'hCG risulta fondamentale per la scoperta ed il follow-up delle malattie tumorali del trofoblasto (19,33,65,67,70). L'utilizzo di tecniche sempre più sensibili ha facilitato, negli ultimi anni, tale applicazione, in particolare con il controllo del decremento dei livelli dell'analita dopo intervento chirurgico e / o chemioterapia.

Mola idatiforme

Tale patologia si presenta, nelle nostre regioni, ogni 3.000 gravidanze (81). Nelle donne con degenerazione molare dell'uovo impiantato si presentano livelli di hCG generalmente superiori a quelli di una normale gestazione. E' soprattutto importante, per poter diagnosticare una mola vescicolare, effettuare una serie di misure dell'analita durante un periodo di diverse settimane in associazione con l'ecografia (85). E' particolarmente seguito il criterio dell'assenza di movimenti fetali con valori di hCG >82.000. La massima importanza della misurazione dell'hCG è, comunque, nel follow-up, dopo l'eliminazione della mola. In generale, si assiste ad un'imponente riduzione dei livelli dell'ormone che non risulta più identificabile dopo tre settimane, anche se vi sono, in taluni casi, residui fino a 12 settimane (91). Se la caduta dell'hCG non è repentina e non si giunge alla sua scomparsa, si procede alla chemioterapia per eliminare i residui di trofoblasto. I protocolli usati in questi casi sono diversi: in genere, si applica una terapia farmacologica se i livelli di hCG raggiungono un plateau o risalgono. Il dosaggio dell'hCG va eseguito ogni settimana per il monitoraggio dell'avvenuta evacuazione completa della mola, finché non si abbiano tre risultati negativi consecutivi e, in seguito, si misura l'ormone ogni mese per un periodo di 6-12 mesi (22,43,47).

Mola invasiva - Coriocarcinoma

L'hCG rappresenta un marker ottimale per effettuare la stadiazione e il follow-up dei tumori maligni del trofoblasto (Fig. 2).
Il coriocarcinoma è un tumore fortemente anaplastico che metastatizza con notevole facilità ai polmoni ed al sistema nervoso centrale, ma che presenta un'ottima risposta

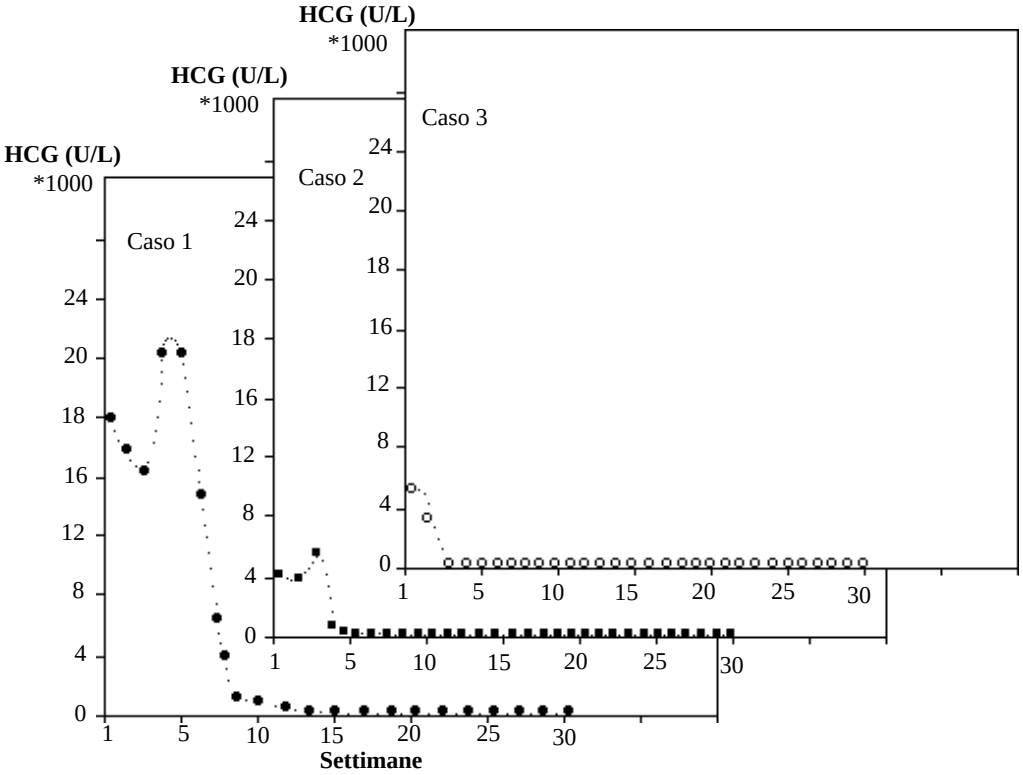


Figura 2. Curve dell'andamento della concentrazione dell'hCG nel siero in tre casi di mola vescicolare.

alla chemioterapia, in virtù proprio della sua estrema atipia e sdifferenziazione. La stadiazione si può determinare sul livello iniziale, dato che la mortalità è più elevata per livelli di circa 1 milione di unità per litro rispetto a livelli di qualche decina di migliaia di U/L (7). Dopo il trattamento iniziale, è importante seguire l'andamento dell'hCG nel tempo, con determinazioni settimanali (24). Allorché non si riscontri hCG nel siero per tre settimane consecutive, il trattamento viene sospeso. Se, invece, si ha un appiattimento della curva di decremento od un innalzamento dell'hCG, occorre riprendere i cicli di chemioterapia o cambiare l'agente farmacologico usato. Particolare importanza riveste l'utilizzo dell'hCG nel monitoraggio dei casi resistenti o nei casi di metastasi al sistema nervoso centrale, in cui è necessaria la valutazione dell'hCG su liquor. Un rapporto siero/liquor <60 indica la seria possibilità della presenza di metastasi a livello del sistema nervoso centrale.

Tumori testicolari

L'hCG viene utilizzata nella diagnosi, nella stadiazione e nel follow-up dei tumori del testicolo (32), in associazione con l'alfafetoproteina (AFP), in particolare nei tumori non seminomatosi che comprendono carcinomi embrionari, teratocarcinomi, coriocarcinomi e che rappresentano circa il 70% di tutte le neoplasie del testicolo. Tra di essi, il carcinoma embrionario è il più frequente (40% circa), mentre il coriocarcinoma è il più raro (81). I tumori nonseminomatosi presentano una minor sopravvivenza rispetto ai seminomatosi, in relazione alle maggiori difficoltà terapeutiche. In caso di incerta diagnosi, il trattamento imposto è in genere quello dei tumori nonseminomatosi che prevede anche la linfedenectomia retroperitoneale, oltre alla rimozione del testicolo e del tessuto circostante (81). E' da rimarcare il fatto che, ai fini di seguire l'andamento e/o la terapia di un tumore testicolare nonseminomatoso, è opportuno usare reagenti per l'analisi dell'hCG che presentino ridotta interferenza con LH. Infatti nei portatori di tumori testicolari vi sono spesso elevati livelli di gonadotropine ipofisarie: vi è un ridotto controllo retroattivo sulla loro produzione per l'ipogonadismo determinato dalla radiochemioterapia o dalla orchiectomia. In circa il 50% dei soggetti con tali tumori si hanno incrementi dell'hCG e, in una percentuale compresa tra 50 e 90, si verifica l'aumento di hCG e/o AFP (26). Tra questi markers non sempre vi è accordo: è quindi importante dosarli entrambi. L'uso di tali analiti permette di stadiare la neoplasia, dato che la presenza di valori elevati dopo orchiectomia indica stadio II o III. In corso di terapia l'hCG può dare indicazioni sull'eventuale proliferazione del tumore, per quanto non sempre si abbia una precisa correlazione tra valori del marker e massa tumorale, poiché la chemioterapia può indurre il blocco di sintesi e di secrezione dell'hCG ma non avere effetto sulla crescita della neoplasia. Il seminoma è, in genere, negativo per hCG: solo in una quota <10% si hanno valori elevati (>25 U/L): è possibile che tale positività sia legata alla presenza di elementi nonseminomatosi (36).

Tumori non trofoblastici

In vari tipi di tumori che non derivano dal tessuto trofoblastico si può avere un'elevata concentrazione di hCG. In particolare, i carcinomi del pancreas, dell'ovaio e della mammella possono presentare aumenti dell'ormone collegabili alla potenzialità che tutte le cellule avrebbero di produrre la proteina e che si manifesta solo in caso di sdifferenziazione estrema. Per questa ragione si è potuto ipotizzare che il tratto di DNA per la sintesi di hCG abbia origini filogeneticamente molto antiche.

Anticorpi ed immunogenicità

Gli anticorpi (Ab) prodotti verso l'hCG si distinguono in policlonali e monoclonali. Gli anticorpi policlonali possono essere rivolti verso:

a) hCG intera; gli anticorpi crossreagiscono con l'LH e spesso vengono utilizzati proprio per la misura dell'LH, dato che la molecola dell'hCG risulta più immunogenica (101)

b) subunità β; nel 1972 Vaitukaitis et al (100) ottennero antisieri rivolti verso la catena β, con bassa crossreazione con l'LH, utilizzando le subunità isolate e purificate da Morgan (64). Le porzioni della βhCG più potenti immunogenicamente sono risultate essere comprese nei tratti 21-23 e i peptidi contenenti i ponti cistinici 26-110 e / o 23-72 (97). L'acido sialico non presenta particolare importanza, mentre la riduzione dei ponti disolfuro o la loro alchilazione riducono nettamente il legame con l'anticorpo. Sono stati anche prodotti antisieri anti-β altamente specifici usando quale antigene la subunità β unita ad emocianina completamente ridotta e carbossiamidometilata (66).

c) peptide carbossiterminale; tale porzione dell'ormone agisce come antigene solo se unito ad una grossa molecola, con la formazione di Ab rivolti verso il peptide legato a tireoglobulina (13) o tossina tetanica (75). E' stato usato anche peptide sintetico (residui 116-145 della catena β) (94) ed asializzato (13). Gli anticorpi monoclonali, ottenuti da ibridomi di cellule immunocompetenti di topo e di cellule mielomatose umane, presentano sicuramente alcuni vantaggi: riconoscimento di un singolo antigene con una sola costante di affinità per esso, mantenimento costante delle caratteristiche delle immunoglobuline prodotte, scomparsa di crossreazione con l'LH. Sono numerosi i gruppi che hanno ottenuto preparazioni di anticorpi monoclonali verso l'hCG e, tra di essi, vi è anche un gruppo italiano (31). Alcune ricerche hanno cercato di evidenziare, grazie ad esperimenti di competizione tra diversi anticorpi, policlonali o monoclonali, gli epitopi della molecola. Norman ne ha definiti sette (28), mentre Berger et al (93) hanno costruito una mappa circostanziata di sette epitopi per la sola catena β e di sei per l'α (Fig 3).

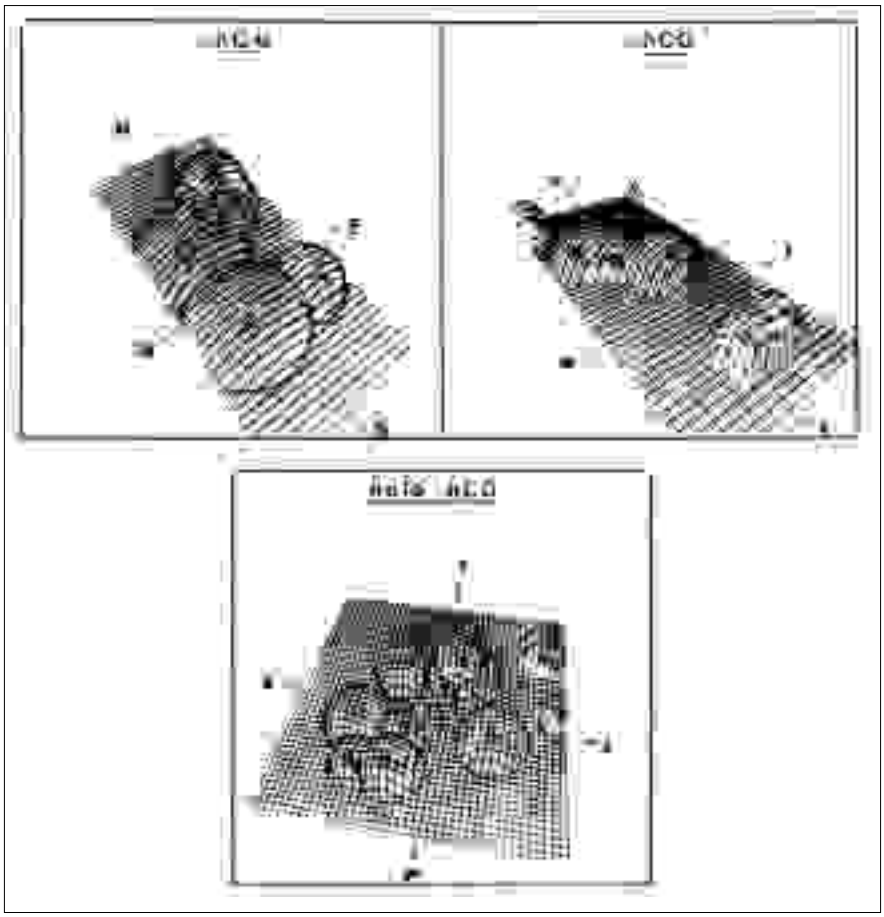


Figura 3. Rappresentazione schematica degli epitopi della molecola dell'hCG (da Berger et al: Antigenic topography of hCG, in:Atti de "International Symposium on hCG", Florence, March 6-7, 1987, riprodotta con il cortese consenso degli Autori e della Clas International)

Metodi di dosaggio

La validità diagnostica dell'hCG è legata alla specificità ed alla sensibilità del metodo utilizzato per il dosaggio. Storicamente, si sono sviluppati per primi dei metodi biologici di cui il più noto è quello denominato di Ashheim e Zondek (5), basato sull'attività gonadotropa dell'hCG, che si manifesta con l'induzione della spermatogenesi nella rana maschio. In seguito, si sono utilizzati metodi immunologici in cui l'hCG viene legata da un anticorpo specifico. Tali metodi si possono distinguere in : a) competitivi, in cui esiste una competizione tra molecole di hCG presenti nel campione da valutare e molecole di hCG aggiunte al sistema in quantità definita. Le molecole possono esser marcate con iodio radioattivo (isotopo 125) oppure essere legate a particelle solide (lattice od eritrociti); b) non competitivi (sandwich), in cui si introduce nel sistema un secondo anticorpo marcato. Si forma pertanto un sandwich tra primo anticorpo, in genere legato ad un supporto solido (polistirene della provetta, pozzetto o sferetta), antigene (hCG) e secondo anticorpo legato a iodio 125 (immunoradiometria, IRMA), enzima (immunoenzimatica, IEMA, chemiluminometria, CLIA), molecola fluorescente (immunofluorimetria, IFMA) (30). Una particolare applicazione del metodo sandwich è stata sfruttata per strisce reattive con supporto solido per diagnosi rapida su urine. I vari metodi utilizzati possono essere sia quantitativi sia qualitativi. Se il metodo è usato quantitativamente, i risultati sono espressi in unita' di attività internazionali per volume, mentre se è usato qualitativamente si deve prendere in considerazione un valore di soglia, al di sopra del quale il risultato viene considerato positivo. Nella diagnosi di gravidanza si possono utilizzare metodi qualitativi su urine con sensibilità piuttosto ridotta mentre la conferma dello stato di gravidanza o la valutazione dell'hCG come marker tumorale prevede l'uso di un metodo quantitativo di elevata specificità e sensibilità su siero (41). I metodi qualitativi "a soglia" possono divenire semiquantitativi allorché la misura è ripetuta con diluizioni successive.

I vantaggi dei metodi qualitativi risiedono in:

1. semplicità di esecuzione
2. tempi brevi di reazione.

Gli svantaggi sono rappresentati da:

1. una risposta piuttosto tardiva (22 giorni per l'agglutinazione su vetrino, 17 per l'agglutinazione in provetta, ridotti a 15 in una metodica con immunoconcentraione).
2. possibilità di falsi negativi, dato che la concentrazione anticorpale nella miscela è tale da assicurare l'agglutinazione o l'inibizione dell'agglutinazione in presenza di una data quantità di antigene: poiché la risposta è di tipo positivo / negativo, un risultato negativo ottenuto con metodo qualitativo può solamente significare che non vi è presenza di hCG ad una concentrazione superiore o uguale alla soglia, ma non significa, in alcun modo, che non vi sia hCG nel campione (30).

3. maggior esposizione a fattori interferenti, specifici, come altri ormoni (LH), ed aspecifici, ovvero la presenza di proteine (in parte risolto con l'introduzione di metodi a soglia di tipo "sandwich"), batteri, eritrociti ed emoglobina (30).
I metodi quantitativi risultano di maggior sensibilita' e specificità. I vantaggi legati al loro utilizzo sono rappresentati da
1. maggiore precisione
2. elevata accuratezza.
Gli svantaggi o i problemi di tali procedure possono presentarsi per:
1. costi elevati
2. interferenze
3. risultanti discordanti tra metodiche differenti
1. I costi risultano più alti di quelli dei metodi qualitativi per l'elevato costo dei reattivi, per i tempi più lunghi di effettuazione dei tests, per la necessità di disporre di strumentazione adatta o dedicata per la lettura del segnale isotopico o non-isotopico.
2. I fenomeni di interferenza sono stati evidenziati da numerosi studi. Gli antisieri antihCG presentano una reazione crociata di scarsa entità con altri ormoni, specialmente LH, ma che può procurare notevoli problemi di sensibilità clinica. Si è cercato di superare tale inconveniente con due espedienti: nei metodi semiquantitativi è stato aumentato il valore soglia, in modo che tale valore si trovi comunque al di sopra dei possibili valori di LH, mentre nei metodi quantitativi si è cercato di migliorare la specificità degli antisieri. Attualmente la massima parte dei metodi commercializzati presenta un anticorpo specifico rivolto verso la subunità β della molecola. Problemi di interferenza sono talora invocati per spiegare risultati macroscopicamente discordanti tra metodiche differenti, specialmente a bassi livelli di hCG, in cui, sorprendentemente, si verifica anche una certa interferenza da parte della subunità β dell'LH (41). Nei kits più recenti tale interferenza è certamente ridotta (57,96,102,108), per quanto non sia stata completamente eliminata. Altra possibile fonte di interferenza e' rappresentata dall'ormone TSH, più evidente nelle misurazioni, con metodiche altamente sensibili, di quest'ultimo. L'aggiunta di quantità variabili di hCG a pools di sieri contenenti 8, 4.5, 1, 0.6 uU/mL di TSH procurava una riduzione dei livelli misurati di ormone tireotropo, variabile dal 29 al 40% (62). Interferenze aspecifiche possono derivare dalla presenza di campioni con lipemia (56) o di sostanze diverse legantesi agli anticorpi antihCG (15), molto probabilmente riconducibili ad anticorpi eterofilici.
3. Tra le diverse metodiche si possono verificare notevoli discordanze (42,87). Le discrepanze analitiche conducono spesso a problemi diagnostici e terapeutici. Hussa et al (30) hanno descritto numerosi casi, ad esempio:
a) aborto spontaneo- in una donna con un presunto aborto spontaneo presentatosi alla quarta o quinta settimana di gravidanza non era stato possibile confermare istologicamente sul materiale proveniente dal curettage la presenza di tessuto trofoblastico. L'hCG misurata con reagenti RIA prodotti direttamente nel laboratorio, dopo un decremento durante i primi due mesi seguiti al curettage, rimase su valori tra 12 e 16 U/L per 10 mesi, mentre risultava negativa con un metodo IRMA del commercio. Durante tale periodo, la donna aveva mestruazioni regolari. All'undicesimo mese la donna rimase incinta con valori di hCG identici tra le metodiche. Dopo il parto, l'hCG risultava

negativa con IRMA mentre si assestava sulle 3 U/L con RIA. La discordanza è quindi riproducibile nello stesso soggetto.
b) gravidanza ectopica- un valore di 40 U/L (metodo RIA) nel siero condusse la paziente con sospetto di gravidanza ectopica ad una esplorazione chirurgica, senza però il ritrovamento di tessuto trofoblastico. L'analisi di 6 successivi campioni con il medesimo kit forniva valori tra 11 e 37 U/L, mentre erano negativi con IRMA. I valori riscontrati con il primo metodo erano certamente aberranti: la donna aveva cicli regolari durante tutto il periodo considerato.
c) endometriosi- una donna di 40 anni con isterectomia ed ovariectomia bilaterale presentava valori tra 6 e 57 U/L con 5 diversi prodotti e negativi con altri 2 (RIA e IRMA) senza che venisse dimostrato tessuto trofoblastico negli organi asportati chirurgicamente. Solitamente risultati discordanti si manifestano con caratteristiche peculiari e, entro certi limiti, costanti:
a) il test positivo presenta valori bassi di hCG (<30 U/L);
b) il risultato positivo non è correlabile con lo stato clinico del soggetto;
c) il risultato non varia nel tempo;
d) il risultato è negativo in almeno un test alternativo; è infatti raccomandabile l'utilizzo di metodologie completamente differenti nei casi di sospetta falsa positività, per minimizzare le possibili interferenze aspecifiche. La metodica che presenta la minor tendenza a fornire falsi positivi in donne non gravide e non affette da tumori sembra essere una immunoradiometrica sandwich con due anticorpi monoclonali (41). L'evenienza di tali discordanze e, in particolare, di falsi positivi con varie metodiche può essere associata a:
a) forme alterate della molecola dell'hCG (subunità libere, frammenti, forme con la parte saccaridica modificata, oligomeri). La possibilità di forme molecolari diverse conduce a differenti specificità degli anticorpi rappresentando un'ulteriore fonte di discordanze
b) la presenza di livelli molto bassi di materiale simile all'hCG (hCG-like), non identificabile come LH, che può essere rilevato dagli anticorpi di alcuni kits (41)
c) livelli molto bassi o molto alti di immunoglobuline o eccessiva presenza di DNA nativo, in metodi che prevedono la precipitazione dell'immunocomplesso (60)
d) problemi legati alle operazioni di campionamento: carryover o trascinamento. In metodiche che utilizzano minime quantità di campione la possibilità di inquinamento tra sieri o urine è notevole, in ragione del fatto che l'hCG può esser presente in quantità estremamente elevate in alcuni di essi. Il fenomeno del trascinamento può esser evidenziato sia in metodiche con preparazione manuale (38) sia su strumenti automatici
e) presenza di fattore reumatoide
f) diversa sensibilità dei kits Problemi di discordanza sono anche legati alla preparazione degli standards utilizzati nell'esecuzione dei tests. Le case produttrici preparano i loro sieri a contenuto noto di analita per la costruzione della curva di calibrazione mediante l'utilizzo di sieri approntati e certificati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS ovvero WHO-World Health Organization).

Standards internazionali

L'OMS aveva preparato il cosiddetto "secondo standard internazionale" (2nd IS-hCG), non perfettamente purificato, per metodi di tipo biologico. Un certo contenuto di subunità libere ed altre impurità non soddisfaceva il criterio di omogeneità necessario ad uno standard per dosaggi di tipo immunologico. Pertanto, l'OMS ha definito, nel 1979, la preparazione di un altro siero con hCG altamente purificata (1st IRP-hCG) (17). E' possibile quindi ottenere discrepanze tra risultati con kits diversamente standardizzati: a parità di valori di unità internazionali di hCG contenute nel preparato, il 2nd IS contiene un maggior numero di molecole immunoreattive. E' fondamentale conoscere, pertanto, il sistema di taratura internazionale (Tab. 3), completo di lotto, utilizzato per i diversi reagenti ed, eventualmente, utilizzare dei fattori di conversione per equilibrare i sistemi. Altra fonte di inesattezze e di relativa confusione risulta la nomenclatura utilizzata per la denominazione e l'illustrazione delle diverse metodiche. Ad esempio, i kits che possono esser utilizzati per dosare la hCG intera e le sue subunità β vengono

Standards	Composizione	Data	N. Lotto
2nd IS hCG	hCG, subunità	1964	61/6
IRP hCG	hCG	1978	75/537
IRP hCG	sub. α	1978	75/569
IRP hCG	sub. β	1978	75/551

Tabella 3. Standards per hCG prodotti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità.

designati dalle case produttrici sia come βhCG sia come hCG. Inoltre, sono spesso tralasciate, nelle note informative unite ai kits, importanti informazioni, quali la cross-reattività e limiti di riferimento distinti per gravidanza e tumori. In una ricerca condotta sui kits commercializzati in Scandinavia (1), sono stati considerati 10 prodotti per l'analisi dell'hCG+subunità β e 4 per hCG intera, di cui 12 radioimmunologici e 2 immunoenzimatici. Un solo produttore riportava il grado di crossreattivita' tra catene α e β dell'hCG ed un altro per l'LH. Dalla denominazione non risultava chiara la specificità del sistema di dosaggio: il riconoscimento di hCG+subunità β può essere indicato sia come "βhCG" sia come hCG.

Effetto gancio

Ulteriore fonte di possibili errori e/o discordanze è il cosiddetto "effetto gancio" (hook effect) che si manifesta nei sistemi sandwich allorché la concentrazione dell'antigene è molto elevata e supera le possibilità di linearità del sistema. Si tratta di un effetto paradosso per cui l'intensità del segnale, raggiunto un massimo per una determinata quantità di antigene, diminuisce progressivamente quando la concentrazione dell'antigene cresce. La causa del fenomeno, che si presenta con frequenza e con particolare importanza diagnostica per l'hCG, analita che si trova nei liquidi biologici con un range estremamente ampio di valori, sembra risiedere nella disponibilità e nell'immediata saturazione dei due anticorpi del sistema per il grande eccesso di antigene (30).

Metodi radioisotopici

Il dosaggio su siero e/o urine dell'hCG viene classicamente determinato con metodo RIA o IRMA (30,100).

Studi di valutazione e comparazione

Numerosi studi sono stati effettuati per valutare le diverse metodiche. Alcuni di essi hanno comparato diversi tipi di reagenti per dosaggio RIA: Rasor et al (76), nel 1983, hanno eseguito una simile prova su 10 kits, con caratteristiche piuttosto diverse tra di loro: 6 presentavano gli standards calibrati secondo il 2nd IS e 4 secondo il 1st IRP, i tempi di incubazione variavano tra 0.5 e 3.5 ore, la temperatura di incubazione risultava 25 C per 6, mentre 4 metodi prescrivevano 37 C, la sensibilità oscillava tra 1 e 3 U/L. L'eterogeneità dei metodi esaminati era notevole; il confronto con un kit di riferimento (National Institute of Health) diede, d'altra parte, ottimi risultati, con coefficienti di correlazione (analisi statistica mediante regressione lineare) superiori, in tutti i casi, a 0.96, con intercette della retta di regressione comprese tra 2.8 e 14.8. Gli Autori fornivano anche una tabella con dei punteggi assegnati ai vari kits a seconda delle loro prestazioni per semplicità d'uso, sensibilità, specificità, correlazione clinica. Un altro studio di Dotti e coll. (25) ha comparato 8 sistemi radioimmunologici, tutti caratterizzati dall'impiego

di antisieri anti-β, meno uno, e dalla standardizzazione contro il 2nd IS. L'FSH non interferiva in nessuno dei sistemi testati, mentre l'LH non interferiva assolutamente su di un sistema IRMA (a). Quantizzando invece tale interferenza al 90% del segnale B/B0, si avevano risultati molto diversi per i vari prodotti: 530 U/L erano necessarie per inibire del 10% il legame del tracciante nel caso di un sistema con doppio anticorpo e separazione con polietilenglicole (b), 360 U/L per un altro sistema a doppio anticorpo (c), solo 140 U/L per un kit con coated tubes (primo anticorpo adeso alla fase solida) (d). La precisione, ad eccezione del sistema (c) che presentava CV% attorno a 20, risultava soddisfacente per tutti i kits, con un minimo attorno al 5% per (a). La presenza di una certa variabilità nelle prestazioni dei vari kits per le prove di precisione, con risultati differenti a seconda della dose, conduce ad una considerazione pratica importante: ad esempio, se si utilizza il sistema coated tubes (e) converrà diluire cinque volte di più rispetto al sistema (b) per ottenere la stessa precisione, dato che il primo è più preciso a basse dosi, il secondo alle medie. Nessun kit, peraltro, ha fornito falsi positivi su sieri di maschi normali o su donne non gravide. La sensibilità variava da 1 U/L a 1.8 U/L: tutti i sistemi esaminati devono ritenersi identicamente idonei per la diagnosi precoce di gravidanza. Hussa et al (30) si sono soffermati sulle possibili differenze tra risultati ottenuti con metodi RIA (5 differenti kits), IRMA (1 kit) ed EIA (3 kits), con standardizzazione contro 2nd IS per 7 di essi e contro 1st IRP per altri 2. Anche la sensibilità risultava variamente distribuita, essendo contenuta tra 0.5 e 7 U/L. L'analisi degli Autori ha riguardato 22 casi in cui si sono utilizzati, in modo vario e non programmato, i diversi reagenti, con valori talora molto discordanti. La rassegna clinica permette di individuare con la metodica IRMA le migliori prestazioni, con maggior sensibilità e corrispondenza alla clinica e con minori interferenze analitiche.

Metodi non-isotopici

Negli ultimi anni si sono sviluppati metodi immunologici di dosaggio dell'hCG utilizzanti marcatori non-isotopici. Tali sistemi sono disponibili come metodiche manuali ed anche come metodiche automatizzate, parzialmente o completamente. La valutazione dei nuovi prodotti che utilizzano marcatori non-isotopici prevede, comunque, un confronto con una metodica radioisotopica, specie di tipo IRMA, considerata metodo di riferimento.

Metodi immunoenzimatici

La metodica alternativa sicuramente più sviluppata è l'immunoenzimatica. Sono in commercio diversi prodotti che utilizzano un sistema di rilevamento basato sulla variazione colorimetrica di un substrato attaccato da un enzima, legato all'anticorpo rivolto verso l'hCG. Le metodiche EIA sono in genere manuali (3,108) così come le immunoenzimometriche (IEMA) (62,102). Alcune metodiche manuali con procedura EIA utilizzano un supporto solido con valutazione qualitativa dell'hCG intera, utili per una diagnosi veloce, entro un minuto, su plasma, siero o urine, con un'eccellente sensibilità (10 U/L) e con limitato effetto gancio e minime interferenze (37). Tali metodiche presentano semplicità d'uso, specie se usate qualitativamente, tempi brevi di esecuzione, buona precisione con coefficienti di variazione (CV) nella e tra le serie inferiori al 10%. Esistono metodiche immunoenzimatiche automatizzate sia su strumenti dedicati, sia su strumenti in genere destinati ad analisi chimico-cliniche. Su uno di questi strumenti, utilizzato principalmente per determinazioni di chimica clinica, la precisione del dosaggio dell'hCG è buona: CV% di 9.94, 2.75, 5.95 su materiali di controllo con concentrazioni di 15, 193 e 430 U/L. La correlazione è buona (r=0.94, y=-5.2 +0.98x) con metodo IRMA e meno soddisfacente con un altro IRMA (r=0.98, y=0.6+0.76x). La linearità è conservata fino a 500 U/L, con ridotta espressione dell'effetto gancio su 12 campioni testati con concentrazioni comprese tra 155.000 e 273.000 U/L (105). Una metodica immunoenzimatica utilizzante l'ABTS come cromogeno, presenta un range della curva di calibrazione di 0-600 U/L, una sensibilità di 0.5 U/L, CV nella serie <5% e tra le serie compresi tra 5 e 10% per concentrazioni di 10-50-100-500 U/L, buona correlazione con metodi RIA (14), è stata automatizzata su uno strumento dedicato. La linearità della metodica fino a 600 U/L viene confermata, così come la specificità, con variazioni ininfluenti dal punto di vista clinico negli studi di interferenza specifica (LH-FSH) o aspecifica (emoglobina, pH, bilirubina) (9,109). La precisione del

sistema risulta compresa tra 4 e 16% nella serie su siero (concentrazioni di 11,59,355 U/L) e tra 2 e 7% su urine (concentrazioni di 29,249,611 U/L) secondo lo studio di Wu et al (109) e tra 2 e 8% tra le serie in quello di Wehner et al (108), mentre la correlazione con un metodo IRMA su 87 campioni presenta un r di 0.98 (109). La minima dose valutabile è di 0.5 U/L: l'elevata sensibilità ha consentito di misurare hCG dopo 9 giorni dall'impianto dell'uovo fertilizzato in vitro, mentre un metodo RIA rivelava la presenza dell'ormone solamente dopo 15 giorni (21). La precisione ottenuta in un nostro studio (9) con la metodica automatizzata risultava la migliore, in confronto con altre metodiche non isotopiche (IFMA e CLIA) ed una metodica IRMA.

Metodi fluorimetrici

I metodi fluorimetrici sono stati introdotti in commercio alcuni anni or sono: si tratta di metodi semiautomatizzati (77,48) o automatizzati (12). Il metodo denominato Dissociated enhanced lanthanide fluoroimmunoassay utilizza come marcatore fluorescente un chelato di un lantanide, l'europio. Tali chelati dei lantanidi presentano un tempo di decadimento della fluorescenza dell'ordine dei microsecondi, rispetto ai nanosecondi di molecole organiche classicamente usate come fluorofori. Tempi così ristretti di decadimento permettono di separare in maniera ottimale l'emissione del marcatore dall'emissione di fondo se esiste un tempo di decadimento sufficientemente lungo per consentire un'adeguata lettura. Inoltre, la netta differenza tra la lunghezza d'onda di emissione e la lunghezza d'onda di eccitazione (Stokes shift) che i lantanidi manifestano, minimizza l'interferenza di emissione del siero, rendendo più agevole ed accurata la misura. Vengono utilizzati, quali molecole più idonee, per l'emissione di fluorescenza, complessi betadichetonici di europio, oppure di terbio e samario. Il loro uso, basato sulla buona delocalizzazione degli elettroni degli orbitali molecolari π, può presentare problemi legati all'instabilità dei complessi da loro formati, dovuta alla dissociazione imposta dalle molecole di acqua con fenomeni di caduta (quenching) della fluorescenza. Per ovviare a tale inconveniente, viene usato un analogo dell'EDTA come chelante e legato agli anticorpi che non risente della dissociazione causata dalle molecole di acqua. La loro fluorescenza, insufficiente per una corretta misura, viene esaltata da soluzione (enhancement) che, essendo acida, può dissociare lo ione europio dal chelante legato all'anticorpo. Inoltre, la soluzione contiene un chelante betadichetonico che si lega all'europio e che viene opportunamente isolato dall'acqua grazie alla presenza di detergenti non-ionici, preservando in tal modo le proprietà di fluorescenza. La lettura del segnale avviene mediante un fluorimetro con lampada allo xenon a 613 nm, dopo 400 usec dall'eccitazione, emessa a 340 nm. Un notevole pregio del metodo è l'alta attività specifica del tracciante per unità di tempo. Tale metodo immunofluorimetrico presenta un'ottima correlazione con il metodo RIA (n=92, r=0.98) e con il metodo EIA (n=87, r=0.96) (77), una buona precisione nella serie (CV% di 8.3, 10.1,9.9,10.3 per concentrazioni di 36, 64, 109, 10785 U/L) e tra le serie (CV% di 17.2 6.3,6.6 e 4.2 per concentrazioni di

31,59,109,9819 U/L) segnalata in uno studio americano (77), mentre in uno studio policentrico francese (69) i CV% nella serie sono di 11.5, 6.7, 10.6 per concentrazioni di 9.15, 69.6,138.5 U/L e i CV% tra 30 serie diverse, per le stesse concentrazioni, risultano di 14.1, 12.9,11.6. La linearità si conserva fino a 10.000 U/L con diluizioni successive di uno standard acquoso (77), mentre con diluizioni su siero il metodo si dimostra lineare fino a 7.000 U/L (69) o 6.000 U/L (10). L'interferenza causata da LH risulta trascurabile (9) ed e' stata inoltre approntata una nuova metodica ancor meno influenzata dalle altre gonadotropine (35). Esiste un altro sistema che utilizza la fluorescenza a risoluzione di tempo con europio. In tale sistema è usato il chelante acido 4,7 bis(clorosulfofenil) 1,10 fenantrolina 2,9dicarbossilico (BCPDA) legato covalentemente alla streptavidina. La misura dell'emissione di fluorescenza viene effettuata in uno strumento dotato di laser che provoca l'eccitazione della molecola. I vantaggi che teoricamente si possono avere con tale sistema sono: 1) aumento della sensibilità; 2) stabilità per alcuni mesi del complesso fluorescente; 3) velocità di lettura con l'uso di strisce seccate. Khosravi e Diamandis (48) descrivono una buona prestazione analitica dell'hCG dosata con questo metodo e presenta CV<6% su 21 ripetizioni nella stessa serie su miscele di sieri con 14, 52, 210, 400 U/L di ormone, mentre la variabilità su 12 giorni sugli stessi campioni è inferiore al 9.7%. La linearità è stata studiata con diluizioni seriate con standard zero di 5 campioni con concentrazioni comprese tra 310 e 450 U/L disponendo di ottime correlazioni tra valori ottenuti e valori attesi. Il recupero di hCG esogeno aggiunto a varie concentrazioni a pools di sieri varia dal 92 al 106%. Interessante è lo studio dell'interferenza: in una prima parte delle prove è stata misurata la risposta del kit all'aumentare di LH, FSH e TSH in assenza di hCG. Non esisteva una interferenza significativa da FSH e TSH, mentre l'LH la produce se supera le 100 U/L, con un massimo del 18% di crossreattività a circa 500 U/L. In un secondo esperimento le stesse concentrazioni di ormoni sono state immesse in campioni con quantità fissa di hCG (100 U/L) per valutare la possibilita' di legame degli ormoni competitori ad alte concentrazioni all'anticorpo antihCG biotinilato con un potenziale effetto di falsa negatività. Anche in tal caso, TSH e FSH non determinavano variazioni del dosaggio di hCG, mentre l'LH produceva lo stesso effetto di incremento dell'hCG e non false negatività. Dato che l'interferenza da LH risultava importante clinicamente solo a concentrazioni fortemente patologiche (>500 U/L) non si è proceduto all'inserimento nel sistema di un anticorpo antiLH che ne può bloccare l'attività di interferenza. La correlazione dell'hCG immunofluorimetrico con un IRMA dava un r=0.97 (y=3.52+0.91x) e con Delfia un r=0.99 (y=1.87+1.01x) su 76 campioni. L'hook effect è stato studiato su campioni di circa 100.000 U/L: la diluizione del campione è necessaria, secondo gli Autori, allorchè la concentrazione è >1000 U/L. L'hook effect risulta invece nettamente meno evidente se la procedura di analisi usata prevede due incubazioni. La sensibilità è elevata: 1 U/L, in relazione al peculiare sistema di amplificazione usato nel sistema. Un sistema immunoenzimofluorimetrico completamente automatico presenta un'analisi sandwich sequenziale, con il primo anticorpo, monoclonale anti-α, immobilizzato su un supporto solido costituito da una lastrina di fibra di vetro. L'antigene, contenuto nel siero depositato dall'ago campionatore sulla lastrina, si lega all'anticorpo adeso. Vengono poi aggiunti il coniugato (anticorpo monoclonale anti-β legato a fosfatasi alcalina) ed il substrato (4metilumbelliferilfosfato). L'immissione del substrato direttamente sulla

lastrina ha il compito anche di rimuovere la frazione di antigene non legato oltre che avviare la reazione fluorimetrica che viene letta cineticamente ogni 20 secondi: un microprocessore compara le letture con una curva di calibrazione memorizzata e fornisce i risultati. I vantaggi offerti dal metodo dovrebbero risiedere nella velocita' di esecuzione del test (8 minuti per il primo dato, 1 minuto per i successivi), nella semplicità d'uso e nella precisione. Beinlich e Carpenter (12) hanno evidenziato che il limite di sensibilità del metodo è di 2 U/L, il recupero medio del 101%, la linearità si conserva fino a 500 U/L, mentre la comparazione con EIA su 210 campioni offre un r=0.98 (y=-4.3 +1.08x). L'interferenza da LH e' nulla per aggiunte fino a 150 U/L, mentre è <0.4% per 600 U/L; l'interferenza da FSH, bilirubina ed emoglobina sono del tutto trascurabili. Gli Autori fanno notare come sia invece importante il trascinamento (in 11 campioni con concentrazioni comprese tra 6500 e 199.000 U/L il carryover medio era dello 0.06%) e concludono che un campione con hCG>5.000 U/L può pregiudicare il risultato del campione successivo con la necessità quindi di ritestare frequentemente dei sieri. La precisione risulta elevata. I CV% sono <3 per concentrazioni dei campioni ripetuti 20 volte di 29.7 e 272 U/L con una prestazione migliore rispetto ad un IRMA (104) e <5.5 su tre livelli (20.8, 92.9, 176 U/L) nella serie e <10.4 tra le serie in uno studio che ha coinvolto vari laboratori francesi (69). Anche in tale studio viene però sottolineato che il carryover, per quanto basso (0.01%), non risulta trascurabile. Un metodo fluorimetrico per hCG è stato sviluppato anche da un'altra casa produttrice per uno strumento automatico, ed utilizza un anticorpo monoclonale legato a particelle di lattice ed uno policlonale legato a fosfatasi alcalina che agisce sul metilumbelliferone. Il metodo è lineare fino a 1000 U/L, con sensibilità di 2 U/L, precisione nella e tra le serie con CV<8%, crossreazione del 2% con LH, recupero tra 94.1 e 105.6% (79). E' stato sviluppato un sistema fluorimetrico utilizzante particelle magnetiche di biossido di cromo, alle quali è legato un anticorpo monoclonale anti-α. Al sistema di reazione è poi aggiunto un monoclonale anti-β unito a fosfatasi alcalina che agisce sul fluoroforo. Il metodo è lineare fino a 200 U/L, con buona correlazione con IRMA (r=0.99, y=1.5+1.02x) e presenta un recupero del 97.5% (103).

Metodi chemiluminometrici

Il metodo della chemiluminescenza è utilizzato in diversi sistemi per dosaggi immuno-chimici. Un metodo commercializzato per l'hCG e' previsto per un sistema che utilizza la chemiluminescenza potenziata, in cui la reazione antigene-anticorpo determina l'attivazione della perossidasi con liberazione di ossigeno molecolare da perossido di idrogeno. Si verifica quindi l'ossidazione del luminolo con la formazione di acido aminoftalico: tale reazione causa emissione di luce che viene esaltata dalla presenza di un opportuno enhancer. La sensibilità di 0.6 U/L, crossreattività trascurabile con le altre gonadotropine, linearita' fino a 1.000 U/L, precisione buona con CV% di 3.1 nella serie e 5.8 tra le serie ad una concentrazione di 22 U/L, ottima correlazione con un metodo

IRMA (n=35, r=0.96) (96). In un nostro studio (14) riguardante tale metodo la precisione nella serie presentava CV% di 4.05, 6.28 e 4.62 per pools di sieri con concentrazione di 19.6, 43.45 e 298.6 U/L. La precisione tra le serie (5 replicati per 10 giorni) presentava CV% di 4.8, 15 e 11 per gli stessi pools. La linearità era conservata fino a 200 U/L, come dichiarato dalla casa produttrice. La correlazione con un metodo IRMA con un metodo fluorimetrico e con un metodo EIA automatizzato su 70 campioni di routine con ampio range di valori dell'analita risultava ottima (r di 0.91, 0.91 e 0.92, rispettivamente). Luppa et al (55) hanno trovato una precisione nella serie ottima per valori di 12.7 (CV: 4.5%), 271 (CV:2.7%), 745 U/L (CV:1.5), e tra le serie con CV% di 6.7, 4.1 e 4 per concentrazioni di 30.5, 183, 43950 U/L. Il valore minimo misurabile era di 1.25 U/L, mentre il recupero trovato utilizzando il 1st IRP era dell'86%, non si identificava carryover con l'uso di campioni con valori >50.000 U/L. L'interferenza da LH risultava molto bassa (2.3 U/L di hCG misurata per una concentrazione di 105 U/L di LH), così come per FSH e TSH; non si notavano interferenze aspecifiche per la presenza di gammopatie monoclonali.

Metodi con particelle sensibilizzate

Esistono altri sistemi di dosaggio basati sull'utilizzo di particelle di lattice sensibilizzate (82). Le possibilità analitiche per il dosaggio di un antigene risultano: a) particelle di lattice sensibilizzate con l'anticorpo, con antigene del campione come agglutinante b) competizione tra anticorpo del campione e anticorpo legato alle particelle per una data quantità di antigene. La reazione di agglutinazione può essere, inoltre, amplificata mediante utilizzo di macromolecole cui sono legati covalentemente diversi apteni, o miscelazione di diversi tipi di particelle di lattice, o, infine, con l'inserimento di molecole di fattore reumatoide. Il sistema dell'agglutinazione di particelle di lattice viene usato per la determinazione visiva e qualitativa dell'hCG su urine, ma può essere proposto anche per una quantificazione su apparecchi automatici, mediante turbidimetria, nefelometria, spettroscopia o con contatori di particelle. La tecnica di conta delle particelle (Particle Counting Immunoassay, PACIA) è basata su di una lettura effettuata in una cella a flusso, con particolare selezione dei segnali elettrici compresi tra due livelli, rappresentanti le soglie entro le quali sono comprese le particelle libere di dimensioni 0.6-1.2μ. La metodica descritta è stata automatizzata sullo strumento Impact, sul quale la misurazione dell'hCG ha dato ottimi risultati analitici, con una riduzione dell'interferenza da LH ottenuta con un pretrattamento con pepsina (57). Il quadro riassuntivo relativo agli studi fatti sulla valutazione del dosaggio dell'hCG con i metodi non isotopici è riportato nella tabella 4.

Autori	Metodo valutato	Metodo di riferimento	Sensibilità	*CV% PB	*CV% PM	*CV%PA	Confronto
Warkentin et al.	EIA	IRMA	- - - -	9,94	2,75	5,95	y=-5.2+0,98x r=0,94
Wu et al.	ELISA	EIA	0.5 U/L	4	4	16	y=-0.17+1.04x r=0.9
Reid et al.	IFMA	RIA	- - - -	8,3	10,1	10,3	y=879.9+0,91x r=0.9
Khosravi et al.	IFMA	IRMA	1 U/L	4,3	5,2	4,3	y=3.52+0.91x r=0.97
Beinlich et al.	EIA	EIA	2 U/L	3	3	5	y=-4.3+1.08x r=0.98
Richerson et al.	FIA	EIA	2 U/L	5	5	8	y=14.1+0.94x r=0.99
Luppa et al.	CLIA	ELISA	1.25 U/L	4,5	2,7	1,5	y=0.8+0.92x r=0.99 y=111.5+0.773x
Vickery et al.	EIA	EIA	- - - -	5	5	5	y=1.5+1.02x r=0.99
Banfi et al.	EIA	IRMA	- - - -	2,4	1,5	1,4	y=1.0x r=0.99
	IFMA	IRMA	- - - -	8	9,3	8,6	y=1.0x r=0.95
	CLIA	IRMA	- - - -	6,2	4,6	4	y=3+1.1x r=0.97

Tabella 4. Tabella riassuntiva degli studi di valutazione dei metodi non-isotopici per il dosaggio dell'hCG. PB=pool a basso livello, PM= pool di livello medio, PA= pool a livello elevato.

Bibliografia

1. Aakwaag A, Leskinen E, Lindstedt G, Maller J, Nyberg A, Weber A : Kits for the quantitative assay for chorionic gonadotropin. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 48:299,1988
2. Albertini A : Biochimica ed immunologia della gonadotropina corionica umana. Atti del Convegno di Studio: la gonadotropina corionica umana, Parma, 1982
3. Alexander RL, Mueller DS, Lipe AL, Minton JS, Szmurlo RE : Evaluation of an enzyme immunoassay method for hCG. Clin. Chem. 31:960,1985
4. Armstrong EG, Ehrlich PH, Birken S, Schlatterer JP, Siris E,Hembree WC, Canfield RE : Use of highly sensitive and specific immunoradiometric assay for detection of human chorionic gonadotropin in urine of normal, nonpregnant, and pregnant individuals. J Clin Endocrinol Metabol 59:867,1984
5. Asheim S, Zondek B : Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn (durch hormonnachwies) Klin. Wochenschr 7:8,1928
6. Bagshawe KD : Management of trophoblastic tumours. Excerpta Med. Internat. Congr. Ser. 512:576,1980
7. Bagshawe KD : Risk and prognostic factors in trophoblastic neoplasia. Cancer 38:1373,1976.
8. Bandi ZL, Schoen I, Waters M : An alghorithm for testing and reporting serum choriogonadotropin at clinically significant decision levels with use of “pregnancy test” reagents. Clin. Chem.35:545,1989
9. Banfi G, Casari E, Murone M, Bonini PA : Three non-isotopic methods for human choriogonadotropin evaluated. Clin. Chem. 35, 1989, in press.
10. Banfi G, Casari E, Murone M, Bonini PA : Valutazione di due metodiche non isotopiche per il dosaggio della coriogonadotropina. 20 Congresso SIBioC, Roma, ottobre 1988 (poster).
11. Batzer FR : Hormonal evaluation of early pregnancy. Fertil Steril 34:1,1985
12. Beinlich CJ, Carpenter RH : Automated and manual quantitative assays of choriogonadotropin in serum compared. Clin. Chem. 33:167,1987.
13. Birken S,Canfield RE : Chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin.-Segal SJ: Chorionic gonadotropin -New York 1980
14. Bonini PA, Banfi G, Murone M : Enhanced chemiluminescence in the measurement of proteins and haptens: evaluation of choriogonadotropin (hCG) and free thyroxin. J. Biolumin.Chemilumin. 3, 1989, in press.
15. Boscato LM, Stuart MC : Incidence and specificity of interference in two site immunoassays. Clin. Chem. 32:1491,1986
16. Braunstein GD, Karow WG, Gentry WC, Rasor J, Wade ME : First trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. Am. J. Obstet. Gynecol. 131:25,1978
17. Canfield RE, Ross GT : A new reference preparation of human chorionic gonadotropin and its subunits. Bull. World Health Org. 54:463,1976
18. Cartwright PS, Di Pietro DL : Ectopic pregnancy:changes in serum human chorionic gonadotropin. Obstet. Gynecol. 63:76,1984
19. Clayton RA, Tyrey L, Weed JC, Hammond CB : Endocrine aspects of trophoblastic neoplasia. J. Reprod. Med. 26:192,1981
20. Clements JA, Reyes FI, Winter JSD, Faiman C : Studies on human sexual development.III. Fetal pituitary and serum and amniotic fluid concentrations of LH,HCG and FSH. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 42:9,1976

21. Colette J, Adam A, Ers P, Parmantier M, Notche M, Demoulin A, Franchimont P : Analytical and clinical evaluation of Enzymun- test HCG for determining choriogonadotropin in serum. Clin Chem 33:715,1987
22. Curry SL, Hammond CB, Tyrey L, Creasman WT, Parker RT : Hydatiform mole. Diagnosis, management and long-term follow-up of 347 patients. Obstet. Gynecol. 45:1,1975
23. Daae LNW : Choriogonadotropin determination in serum is preferable for early diagnosis of ectopic pregnancy. Clin. Chem. 33:1669,1987
24. De Groot LJ et al (eds) : Endocrinology, New York, Grune and Stratton, 1979 - Goldstein DP : Gestational neoplasm, 1629-48.
25. Dotti C :Metodologie di determinazione radioimmunogica della gonado- tropina corionica umana- studio comparato. Convegno di Parma , 1982
26. El Metenawy WH, El Ghamrawy K, Hassan A, Haggag M : Diagnostic and prognostic value of tumor markers alphafoetoprotein and betachorionic gonadotropin in testicular tumors. J. Tumor Mark. Oncol. 3:329,1988.
27. Englert Y, Roger M, Belaish-Allert J, Jonde M, Frydman R, Testart J Delayed appearance of plasmatic chorionic gonadotropin in pregnancies after in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 42:835,1984
28. Erlich PH, Moustafa ZA, Krichevsky A, Birken S, Armstrong EG, Canfield RE : Characterization and relative orientation of epitopes for monoclonal antibodies. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 8:48,1985
29. Fiddes JC, Goodman HM : The cDNA for the B-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untraslated region. Nature 286:684,1980
30. Fuchs F, Klopper A (Eds) : Endocrinology of pregnancy. New York- Vaitukaitis JL : Human chorionic gonadotropin.
31. Ghielmi S, Archetti S, Mantero G, Capucci L, Gamba D : Production and characterization of hCG-Mab for the assessment of a RIA method. Clin. Chem. 31:960,1985
32. Gnudi A : La beta hCG come marker di neoplasia. Atti del Convegno di studio: La gonadotropina corionica umana, Parma, 1982.
33. Hattori M, Yoshimoto Y, Matsukura S, Fujita T : Qualitative and quantitative analyses of human chorionic gonadotropin and its subunits produced by malignant tumors. Cancer 46:355,1980.
34. Hay DL, Gronow LM, Lopata A, Brown JB : Monitoring early production of chorionic gonadotropin (HCG) following in vitro fertilization and embryo transfer Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol. 24:206,1984
35. Hemmila I, Batsman A : Time-resolved immunofluorometry of hCG. Clin. Chem. 34:1163,1988.
36. Herberman RB, McIntire KR : Immunodiagnosis of cancer, New York, 1979 - Braunstein GD : Use of chorionic gonadotropin as a tumor marker in cancer, 383-409.
37. Hether NW, Gadsden RH : Evaluation of the Abbott beta-hCG 15/15 enzyme immunoassay (EIA) kit with comparison to two other methods. Clin. Chem. 31:959,1985.
38. Higgins T : Source of error in beta-choriogonadotropin determinations. Clin. Chem. 28:1822,1982
39. Hussa RO. The clinical marker hCG. New York, Praeger, 1984.
40. Hussa RO : Clinical utility of hCG and alfa-subunit measurements. Obstet Gynecol 60:1,1982
41. Hussa RO, Rinke ML, Schweitzer PG : Discordant human chorionic gonadotropin results, causes and solutions. Obstet. Gynecol: 65:211,1985
42. Hussa RO: Procedure for discordant hCG results. Clin. Chem. 30:809,1984
43. Iffy L, Kaminetzky HA (eds) : Principles and practice of obstetrics and perinatology, New York, Wiley and Sons - Pattillo RA, Hussa RO : Hydatiform mole and chorionic malignancy,
44. Jovanovic L, Landesman R, Saxena BB : Screening for twin pregnancy. Science 198:738,1977
45. Kauppilla A, Huhtaniemi I, Ylikorkala O : Raised human chorionic gonadotropin concentrations in hyperemesis gravidarum. Br. Med. J. i:1670,1979

46. Keller PJ (ed): Contribution to obstetrics and gynecology. Human chorionic gonadotropin. Basel,1976
47. Keller E, Schindler AE : Diagnostic and therapeutic aspects of trophoblastic tumors. Atti del Convegno di studio: la gonadotropina corionica umana. Parma, 1982.
48. Khosravi MJ, Diamandis EP : A sensitive immunoassay of choriogonadotropin (hCG) by time-resolved fluorescence spectroscopy, with a new europium chelate as label. Clin. Chem. 34:1220,1988.
49. Kletzky OA, Rossman F, Bertolli I, Platt D, Mishell DR jr : Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 151:878,1985
50. Klink F, Grosspietzsch R, Conte N, Vallerine G, Diani F : Alpha- fetoprotein and beta human chorionic gonadotropin in amniotic fluid. Internat. J. Biol. Res. Preg. 2:99,1981
51. Lagrew DC, Wilson EA, Fried AM : Accuracy of serum human chorionic gonadotropin concentrations and ultrasonic fetal measurements in determining gestational age. Am. J. Obstet. Gynecol. 149:165,1984
52. Le Maistre A, Bracey A, Katz A, Wu AHB : Role of qualitative choriogonadotropin assays in diagnosis of ectopic pregnancy. Clin.Chem. 33:1908,1987
53. Lenton EA, Neal LM, Sulaiman R: Plasma concentration of human chorionic gonadotropin from the time of implantation until the second week of pregnancy. Fertil Steril 37:773,1982
54. Lopata A, Martin M, Oliva K, Johnston I : Embryonic development and blastocyst implantation following in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 38:682,1982
55. Luppa P, Neumeier D, Knedel M : Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for the determination of human chorionic gonadotropin in serum. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 26:705,1988
56. MacLeod JE, Chu SY, Wadman MAH : Interference from lipemia in choriogonadotropin. Clin. Chem. 32:2099,1986
57. Mareschal JC, Gilles JG, Masson PL : Particle counting immunoassay of human chorionic gonadotropin beta subunit in the Impact instrument. Clin. Chem. 31:960,1985
58. Marrs RP, Kletzky OA, Howard WF, Mishell DR : Disappearance of human chorionic gonadotropin and resumption of ovulation following abortion. Am. J. Obstet. Gynecol. 135:731,1979
59. Marrs RP, Mishell DR Jr : Placental trophic hormones. Clin. Obstet. Gynecol. 23:721,1980
60. Matsuo N, Koide SS : DNA interference with radioimmunoassay procedures. Clin. Chem. 29:1912,1983
61. Mattingly RF, Thompson JD : Linde's surgical gynecology. Ectopic pregnancy. Philadelphia,1985
62. McBride JH, Rodgerson DO, Allin RE : Choriogonadotropin interference in a sensitive assay for thyrotropin. Clin. Chem. 33:1303,1987
63. McCready J, Braustein GD, Helm D, Wade ME : Modification of the choriogonadotropin beta subunit radioimmunoassay for determination of urinary choriogonadotropin. Clin. Chem. 24:1958,1978
64. Morgan FJ, Canfield RE : Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 88:1045,1971.
65. Nishimura R, Ide K, Utsunomiya T, Kitajima T, Yuki Y, Mochizuki M : Fragmentation of the Beta-subunit of human chorionic gonadotropin produced by choriocarcinoma. Endocrinology 123:420,1988
66. Pandian MR, Mitra R, Bahl OP : Immunological properties of the betasubunit of human chorionic gonadotropin. II. Properties of a hCG-specific antibody prepared against a chemical analog of the betasubunit. Endocrinology 107:1564,1980.
67. Papapetrou PD, Sakarelou NP, Braouzi H, Fessa PH: Ectopic production of human choriogonadotropin by neoplasms. Cancer 45:2583,1980
68. Pastorfide GB, Goldstein DP, Kosasa TS, Levesque L : Serum Chorionic gonadotropin activity after

molar pregnancy, therapeutic abortion, and term delivery. Am. J. Obstet. Gynecol. 118:293,1974
69. Patricot MC, Badonnel Y, Roger M, Revol A : Dosage immunologique de l'hormone gonadotrope chorionique au cours de la grossesse. Etude multicentrique de cinq reactifs. Ann. Biol.Clin. 45:527,1987.
70. Pattillo RA, Hussa RO : The hCG assay in the treatment of trophoblastic disease. J. Reprod. Med. 29:802,1986
71. Peake GT, Buckman MT, Davis LE, Standefer J. : Pituitarity and placentally derived hormones in cerebrospinal fluid during normal human pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 56:46,1983
72. Pfuhl JP, Schafer D, Baum RP, Falk S, Baumann R : Tumormarkers beside oncology: characterisation of ectopic pregnancy tissue with immunochemical assays. J. Tumor Mark. Oncol. 3:330,1988
73. Pierce JG, Parsons TF : Glycoprotein hormones: Structure and function. Annual Rev Biochem 50:465,1982
74. Pittaway DE, Reish RL, Wentz AC : Doubling times of human chorionic gonadotropin increase in early viable intrauterine pregnancies. Am.J.Obstet.Gynecol.152:299,1985
75. Powell JE, Lee AC, Tregear GW, Niall HD, Steven VC: Characteristics of antibodies raised to carboxil-terminal peptides of hCG beta subunit. J. Reprod. Immunol. 2:1,1980
76. Rasor JL, Farber S, Braustein GD : An evaluation of 10 kits for determination of human choriogonadotropin in serum. Clin. Chem. 29:1828,1983
77. Reid D, Maturen A, Prasad R, Biskup N : Dissociated-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFIA) of serum of human chorionic gonadotropin (hCG) Clin. Chem. 32:1072,1986.
78. Reuter AM, Gaspard UJ, Deville JL, Vrindts-Gevaert Y, Franchimont P Serum concentrations of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. During normal singleton and twin pregnancies. Clin. Endocrinol. 13:305,1980
79. Richerson RB, Babik DM, Venetucci ME, Ogunro EA : Measurement of human chorionic gonadotropin with an automated fluorescent immunoassay analyzer. Clin. Chem. 34:1219,1988.
80. Rizkallah T, Gurpide E, Van De Wiele RL : Metabolism of hCG in man. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 29:92,1969
81. Robbins SL, Cotran RS : Le basi patologiche delle malattie, Padova, Piccin, 1982, pp 1321-24.
82. Roda A (ed) : Tecniche immunologiche con marcatori non isotopici. Fenili D : L'utilizzo delle particelle di lattice sensibilizzate nello sviluppo di metodi immunochimici omogenei e non isotopici. Milano, SIBioc 1988.
83. Roger M., Feinstein M.C., Scholler R.: Le dosage de la choriogonadotropine (HCG). Problemes actuels. Ann Biol Clin 44:491,1986
84. Romero R, Kadar N, Copel JA, Jeanty P : The effect of different human chorionic gonadotropin assay sensitivity on screening for ectopic pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 153:72,1985
85. Romero R, Horgan JG, Kohorn EI, Kadar N, Taylor KJ, Hobbins JC New criteria for the diagnosis of gestational trophoblastic disease. Obstet. Gynecol. 66:553,1985
86. Rosa C, Amr S, Birken S, Wehmann F, Nisula B.: Effect of deasialylation of human chorionic gonadotropin on its metabolic clearance rate in humans. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 59:1215,1984
87. Rzasa PJ, Caride VJ, Prokop EK : Discordant inter-kit results in the radioimmunoassay for choriogonadotropin in serum. Clin. Chem. 30:1240,1984
88. Said ME, Campbell DM, Azzam ME, MacGillivray I : Beta- human chorionic gonadotropin levels before and after the development of pre-eclampsia. Br. J. Obstet. Gynecol. 91:772,1984
89. Sande HA, Riertsen O, Fonstelien E, Torjesen P : Evaluation of threatened abortion by human chorionic gonadotropin levels and ultrasonography. Internat. J. Gynecol. Obstet. 18:123,1980
90. Sandvei R, Stoa KF, Ulstein M : Radioimmunoassay of human chorionic gonadotropin beta-subunit as an early diagnostic test in ectopic pregnancy. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 60:389,1981
91. Schlaerth JB, Morrow CP, Kletzky OA, Nalick RG, D'Ablaing GA : Prognostic characteristics of the serum human chorionic gonadotropin titer regression curve following molar pregnancy. Obstet. Gynecol. 58:478,1981

92. Schwartz RO, DiPietro DL : Beta hCG as a diagnostic aid for suspected ectopic pregnancy. Obstet. Gynecol. 56:197,1980
93. Schwarz S, Berger P, Wick G : Epitope-selective, monoclonal- antibody-based immunoradiometric assays of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits Clin. Chem. 31:1322,1985
94. Segal SJ (Eds) : Chorionic Gonadotropin. New York,1980- Chen HC, Matsuura S, Ohashi M: Limitation and problem of hCG-specific antisera.
95. Seppala MT, Ranta T, Tontti K, Stenman UH, Chard T : Use of rapid hCG-beta-subunit radioimmunoassay in acute gynaecological emergencies. Lancet i:165,1980
96. Spiller G, Tovey KC, Smith GFW, Mashiter K : Development of a highly sensitive assay for hCG based on enhanced luminescence. Clin. Chem. 32:1164,1986
97. Swaminathan N, Braunstein GD : Location of major antigenic sites of the beta subunit of human chorionic gonadotropin. Biochemistry 17:5832,1978.
98. Talmadge K, Boorstein WR, Vamvakopoulos NC, Gething MJ, Fiddes JC: Only three of the seven human chorionic gonadotropin beta subunit can be expressed in the placenta. Nucl Acids Res 12:8415,1984
99. Vaitukaitis JL, Ross GT, Braunstein GD, Rayford PL: Gonadotropins and their subunits: basic and clinical studies. Rec. Progr. Horm. Res. 32:289,1976
100. Vaitukaitis JL, Braunstein GD, Ross GT : A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of luteinizing hormone. Am. J. Obstet. Gynecol.113:751,1972.
101. Vaitukaitis JL : Radioimmunoassay of human choriogonadotropin. Clin. Chem. 31:1749,1985.
102. Valkirs G, Chisum D, Barton R : Qualitative two site IEMA for serum hCG using immunoconcentration technology. Clin. Chem. 31:960,1985
103. Vickery DK, Carlson CJ, Masulli IS, Tseng SY, Tuhy PM : A highly sensitive fluorometric enzyme immunoassay for hCG using chromium dioxide magnetic particles. Clin. Chem. 34:1219,1988
104. Walker EM, Lewis M, Cooper W, Marnir M, Howie PW : Occult biochemical pregnancy: fact or finction? Brit. J. Obs. Gyn. 95:659,1988
105. Warkentin D, Averia E, Gaghan V, Marchand A : Comparison of hCG assay as performed on the Dupont ACA with the immunoradiometric assays from Hybritech and Serono. Clin. Chem. 34:1220, 1988
106. Wehmann RE, Nisula BC : Renal clearance rates of the subunits human chorionic gonadotropin in man. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 50:674,1980
107. Wehmann RE, Nisula BC : Metabolic and renal clearance rates of purified human chorionic gonadotropin. J. Clin. Invest. 68:184,1981
108. Wehner R, Lenz H, Deer R, Linke R : Enzyme immunoassay for the quantitation of serum hCG using monoclonal antibodies. Clin. Chem. 31:960,1985
109. Wu AHB, Wong SS, Waldron C, Chan DW : Automated quantification of choriogonadotropin: analytical correlation between serum and urine with creatinine correction. Clin. Chem. 33:1424,198
110. Yuen BH, Cannon W : Molar pregnancy in British Columbia: Estimated incidence and postevacuation regression patterns of the beta subunit of human chorionic gonadotropin. Am. J. Obstet. Gynecol: 139:316,1981

Indice

Editoriale.....pag. 3
Istruzioni per gli Autori..... » 4
Generalità..... » 5
Il significato clinico ..... » 6
Comparsa nella gravidanza ..... » 6
Metabolismo dell'HCG ..... » 9
Incrementi dell'HCG ..... » 10
Aborto spontaneo ..... » 10
Gravidanza ectopica ..... » 11
HCG come marker tumorale ..... » 14
Mola idatiforme..... » 14
Mola invasiva-coriocarcinoma..... » 14
Tumori testicolari..... » 16
Tumori non trofoblastici ..... » 16
Anticorpi ed immunogenicità..... » 17
Metodi di dosaggio ..... » 19
Standards internazionali ..... » 22
Effetto gancio..... » 23
Metodi radioisotopici..... » 23
Metodi non radioisotopici ..... » 25
Metodi immunoenzimatici ..... » 25
Metodi fluorimetrici ..... » 26
Metodi chemiluminometrici..... » 28
Metodi con particelle sensibilizzate ..... » 29
Bibliografia ..... » 31
Indice ..... » 36
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio..... » 37

Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La ß-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. **Guastella G., Cefalù E., Carmina M., Gullo D.:** ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**

35. **Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.:** ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno ’88.**
36. **Baccini C.:** ***Le droghe d’abuso (2).*** **Luglio ’88.**
37. **Piantino P., Pecchio F.:** ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre ’88.**
38. **Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.:** ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio ’89.**
39. **Sommariva D., Branchi A.:** ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. **Butturini U., Butturini A.:** ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. **Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.:** ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. **Palleschi G.:** ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. **Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.:** ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. **Fanetti G.:** ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. **Contu L., Arras M..:** ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. **Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.:** ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. **Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. :** ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. **Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. :** ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**

Caleidoscopio
anno 8, numero 48

Rivista monografica di Medicina

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
(079) 270464

Editore
Medical Systems S.P.A.
Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
tel. (010) 808051(7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 804661- 802257.

Segretaria di Direzione
Fiorella Gaggero

Servizio Abbonamenti
Franca Giordano

Stampa
G. Martelli Arte Grafica S.p.A
Via Lungotorrente Secca, 12r - Tel. (010) 710241/2
16163 Genova - S. Quirico

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare nel Febbraio 1990

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)