

Estandarización del procedimiento para la detección de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en orina

Standardization of proceeding for the detection of human chorionic gonadotropin (hCG) in urine

Lic. Gema E. García Dafonte¹; Lic. Celia A. Alonso²; Lic. Tatiana Otero Diego³; Lic. Aimee Echevarría Arlet⁴; Lic. Margarita Teresa Correa Vidal⁵; Dr. Roberto Socarrás Ojeda⁶

¹ Investigador Auxiliar. Centro Antidoping, IMD.

² Investigador Auxiliar, Hospital Hermanos Ameijeiras, Laboratorio Clínico.

³ Licenciada en Química

⁴ Licenciada en Química. Investigador agregado.

⁵ Licenciada en Química e Investigadora auxiliar.

⁶ Especialista en 1er grado en Medicina del Deporte e Investigador Agregado. avlopez43@inder.cu

RESUMEN

Se presentan los resultados de la estandarización del proceder analítico para la detección y cuantificación de la Gonadotropina Corionica humana (hCG) en orina de atletas, así como la implementación del sistema de aseguramiento de la calidad, según la norma cubana NC:ISO/IEC 17025, en el Laboratorio Antidoping del Instituto de Medicina del Deporte (Lab. IMD). En el proceso de pesquisaje se utilizaron tiras reactivas de hCG para la detección cualitativa de la hormona, con sensibilidad de 10 UI/L y 25 UI/L respectivamente; se analizaron 281 muestras para un porcentaje (%) de resultados positivos del 1% (3/281). La determinación cuantitativa se realizó a 43 muestras utilizando el sistema inmunoenzimático automatizado AIA-600, obteniéndose un 7% (3/43) de resultados positivos a la presencia de la hormona en la matriz biológica orina. Las muestras procedentes de la Brigada Nacional Antidopaje (BNA) y del Laboratorio de Control del Dopaje del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM), de Barcelona se evaluaron utilizando las tiras reactivas para detección de embarazo, mientras que para los exámenes de pre-acreditación aplicados por el Comité Olímpico Internacional (COI) y la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) se empleó el AIA-600 como método de pesquisaje. El AIA-600 fue elegido para la cuantificación y confirmación de muestras de referencias donadas por el IMIM y cuantificación de controles internos. Los resultados satisfactorios obtenidos en el ejercicio de intercomparación con la identificación correcta de las 81 muestras de orinas evaluadas, provenientes del IMIM y el COI, corroboraron lo acertado de la estrategia para el control antidopaje de la hormona.

Palabras Claves: estandarización, control del dopaje, hCG, tiras reactivas AIA-600.

ABSTRACT

The results of the standardization of the analytical proceeding had been presented with the aim of detect and quantify the human chorionic gonadotropin (hCG) in the urine samples of athletes, as well as the implementation of the quality assurance system, according to the Cuban standard NC:ISO/IEC 17025, in the Antidoping Laboratory of the Medicine Institute of Sports (LAB. IMD). During the screening

procedure were utilized dipsticks of (hCG) for qualitative detection of the hormona, with sensibility of 10 UI/ L and 25 UI/ L respectively, were examined 281 sample with a positive results of 1% (3/281). The quantitative determination was realized to 43 samples using the immunoenzymatic automated system AIA-600, obtaining a 7 % (3/43) of positive results of presence of the hormone in the biological urinary pool. The samples recollected for the Nacional Squad of Antidopping (BNA) and from the Laboratory of Dopping Control of the Municipal Institute of medical investigations (IMIM) of Barcelona were evaluated utilizing dipsticks for detection of pregnancy, meanwhile for pre-accreditation test applied by the Internacional Olympic Committee (COI) and the World Anti-dopping Agency (WADA), was employed the AIA 600 test, as a screening procedure. The AIA-600 was elected for the quantification and confirmation of samples of references donated by the IMIM and quantification of internal controls. The satisfactory results obtained in the exercise of inter-comparison with the correct identification of the 81 samples of urine evaluated, originating of the IMIM and the COI confirm the correct approach for Antidopping control of the hormone.

Keywords: standardization, dopping control, hCG, dipsticks AIA-600.

INTRODUCCIÓN

La hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) se produce en condiciones normales por el tejido trofoblástico de la placenta, su producción en condiciones patológicas se asocia a la presencia de tumoraciones de origen trofoblástico, no trofoblástico, y síndrome de Down¹⁻³; es una glicoproteína, con homología estructural con las de origen hipofisario: luteotrópica (LH), estimulante del tiroides (TSH) y estimulante del folículo (FSH); compuesta por dos subunidades α y β , siendo la α la que le confiere las características biológicas e inmunológicas distintivas⁴. Se incluyó en el listado de sustancias prohibidas por el Comité Olímpico Internacional (COI) en 1987 por estimular la esteroidogénesis testicular, prevenir la caída de la producción testicular de esteroides y la atrofia testicular asociada al empleo prolongado de sustancias androgénicas. Ha sido utilizada para burlar la detección de la Testosterona (T), ya que administradas conjuntamente se mantiene la relación Testosterona/Epitestosterona (T/E) dentro de los parámetros establecidos como normales⁵. El control antidopaje de la hCG se realiza en orina de atletas de ambos sexos en eventos de competencias y fuera de competencias; para su detección se utilizan inmunoensayos (IE) tipo isotópicos y/o no isotópicos corroborándose los resultados positivos mediante el uso de un IE diferente al primero. Valores de hCG iguales o mayores de 5 UI/L son reportados como hallazgos, la negación por parte del atleta de su consumo debe conllevar a un estudio clínico de sus causas como embarazo y presencia de tumoraciones productoras de hCG^{6,7}. Las tiras reactivas-hCG son IE cualitativos, no isotópicos, ampliamente utilizados en los servicios de urgencias, consultas médicas y en los propios hogares para el diagnóstico del embarazo. Los niveles de sensibilidad y especificidad de estos métodos satisfacen las expectativas diagnósticas para lo cual fueron diseñados pero su utilidad para el control antidopaje necesita ser evaluada. Este método no instrumental ofrece la ventaja de no necesitar de personal calificado ni de equipamiento de laboratorio para su implementación^{8,9}. El juego de reactivos (AIA-bhCG) es un IE, no isotópico, automatizado para la cuantificación de bhCG total. En este trabajo se presenta la estrategia analítica para la detección y cuantificación de la hCG implementada en el Lab. IMD, esta emplea las tiras-hCG como método de pesquaje y el AIA-600 como procedimiento de confirmación del resultado positivo; ambos procedimientos utilizan parejas de anticuerpos monoclonales (AcM) y sistemas de detección diferentes. Paralelo a el trabajo analítico se elaboraron e implementaron procedimientos normalizados de trabajo (PNT): para la detección cualitativa y cuantitativa de hCG, y preparación de controles, incluyendo registros

y diagramas de flujo, documentación que forma parte del sistema de Aseguramiento de Calidad del Laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las tiras reactivas

Se comprobó la sensibilidad y especificidad de la tira-hCG, Centis para su uso en el control antidopaje, procesándose: orinas procedentes de la BNA, orina de embarazada de 6 semanas, orina de referencia H003U001 (Lab. IMIM), ORP1-VI (control positivo) y BLOR-VI (control negativo), siguiendo las instrucciones del fabricante. Modificación del protocolo original de las tiras: consistió en incrementar el tiempo de inmersión de la tira, en 0.5 mL de orina, hasta 30 min. a temperatura ambiente (TA), se comprobó la influencia sobre la sensibilidad y especificidad de las tiras-hCG utilizando diluciones seriadas hasta 1:64 a orinas que contenían 170 y 200 UI/L de hCG. Se procesaron: ORP1-VI; BLOR-VI; muestras de referencia provenientes del Lab. IMIM (H003U001, H003U002 y H003U003); 200 muestras de orina de la BNA, 41 muestras de orina preparadas por el IMIM (exámenes de pre-acreditación) y 40 muestras enviadas por el COI (exámenes de pre-acreditación), aplicando el AIA-600 como método de pesquiasaje las cuales fueron paralelamente evaluadas por tiras SPINREACT. Se midió el tiempo en que se aprecia un color intenso e inequívoco en la zona de reacción de la tira y se compararon los resultados obtenidos por tiras Centis, tiras SPINREACT y AIA-600.

Interpretación de resultados: La presencia de una banda coloreada en la zona de reacción de la tira, se considera resultado negativo; dos bandas se corresponde con un resultado presuntamente positivo el cual debe ser confirmado por AIA-600 u otro IE que se elija.

Cuantificación por AIA-bhCG: El sistema automatizado AIA-600 se empleó para la cuantificación y /o confirmación de b-hCG total y como método de pesquiasaje en el procesamiento de las muestras provenientes del COI en ocasión de los cuatro exámenes de pre-acreditación realizados en el Lab. IMD. Se considera resultado positivo toda muestra con valores de hCG ≥ 5 UI obtenido en dos corridas independientes por duplicado.

Preparación de controles

Estudio de Precisión: La precisión inter-ensayo (variación día a día) del AIA-600, se evaluó con controles comerciales en matriz suero y controles internos en matriz orina. Se procesaron en 6 corridas diferentes ($n=6$), los controles comerciales CTRL1, CTRL2 y CTRL3 que cubrían los rangos de concentración bajo, medio y alto; para los controles internos (ORP1-VI y ORP2-VI) se ejecutaron 16 y 13 corridas respectivamente. Se calculó el valor medio (X), la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación en por ciento (CV%) para los controles antes mencionados.

RESULTADOS

Sensibilidad y especificidad de las tiras reactivas

La tabla I presenta los resultados de la detección cualitativa de hCG por tiras-hCG, Centis, siguiendo las instrucciones del fabricante, y los obtenidos por la cuantificación por AIA-600; todas las muestras negativas por tiras se correspondieron con valores de hCG <5 UI/L, inferior al límite de corte de positividad establecido (hCG ≥ 5 UI).

Hubo un resultado falso negativo (FN) por tiras Centis, para la muestra H003U001 con hCG por AIA-600 de 36 UI/L y se identificaron correctamente como positivas la muestra de embarazada con concentración de hCG superior a 400 UI/L y el control ORP1-VI (100 UI/L).

Tabla I. Comparación de resultados cualitativos (5 min.) y cuantitativos por AIA-600.

Muestra	Resultados Tira reactiva	Resultados AIA-600 (UI/L)
00128	-	2.3
00129	-	3.7
00130	-	3.2
00131	-	2.6
00132	-	2.0
00133	-	2.2
00135	-	0.7
00136	-	2.4
00137	-	2.4
BLOR-VI	-	1.3
ORP1-VI	+	100
H003U001	-	36
Orina de embarazada	+	> 400

La incubación de la tira-hCG, Centis en bulbo conteniendo 0.5 mL de orina durante 30 minutos a TA, resulto en un incremento de la sensibilidad de la tira como se demuestra en los resultados a diluciones sucesivas de orinas con concentraciones de 170 y 200 UI/L. Se aprecio señal de dos bandas hasta diluciones 1:64 correspondiente a concentraciones inferiores a 5 UI/L, sin afectarse la especificidad de la tira ya que el control negativo (BLOR-VI) se mantuvo con una sola banda en la zona de reacción.

La tabla II compara los tiempos a los que aparece la señal en tiras-hCG, Centis y tiras-hCG, Spinreact a los 30 min de incubación a TA, conjuntamente con los resultados de la cuantificación por AIA-600. Se aprecia un resultado positivo para la muestra H003U001 re-ensayada con 30 min. de incubación a TA con tira-hCG, Centis y positivo con tira-hCG, Spinreact a los 13 min. a TA. El resultado para las muestras H003U001 y H003U003 con valores de concentración cercanos por AIA-600, ofrecen respuestas cualitativas por tira-hCG en tiempos diferentes; el BLOR-VI se mantuvo ausente de señal durante los 30 min. ensayados.

Tabla II. Comparación resultados cualitativos (30 min.) y cuantitativos por AIA-600.

Controles internos y orinas de referencias	Tira Centis (25 UI/L)		Tira Spinreact (10 UI/L)		Resultados AIA-600 (UI/L)
	Resultado	Tiempo (min.)	Resultado	Tiempo(min.)	
H003U001	+	30	+	13	36
H003U003	+	5	+	5	38
H003U002	+	5	+	5	220
ORP1-VI	+	5	+	3	100
BLOR-VI	-	30	-	30	1.3

Precisión

Se obtuvieron valores de CV% de: 9.7, 12.2 y 9.9% para los controles comerciales CTRL1, CTRL2 y CTRL3 en 6 corridas procesadas durante un año de trabajo. Los resultados para ORP1-VI fue 17% (n=16) y ORP2-VI de 19.4% (n=13).

Intercomparación con laboratorios antidoping acreditados

Al comparar los resultados obtenidos del procesamiento de 81 muestras de orina por tiras y AIA-600 tomando como referencia los resultados conocidos de las muestras previamente valoradas por el COI e IMIM, se obtuvieron 78 muestras negativas y 3 muestras positivas en concordancia con lo esperado. La cuantificación por AIA-600 de 44 muestras negativas dió un valor medio (X) de $X=1.13$ UI/L, desviación estándar (DS) de 0.8 UI/L, mínimo valor de hCG = 0.5 UI/L y máximo de 3.7 UI/L.

DISCUSIÓN

El proceder analítico estandarizado en el Lab. Antidoping del IMD para el control antidopaje de la hormona hCG en orina, involucra el uso de tiras reactivas para la detección de embarazo como método de pesquisaje y el sistema automatizado AIA-600 utilizado para la confirmación del resultado presuntamente positivo. El AIA-600 es un IE tipo "sandwich" de dos pasos, donde la hCG queda atrapada entre dos AcM: uno inmovilizado a partículas magnéticas, específico para moléculas intactas de hCG (reconoce determinante antigénico en subunidad b), y el otro conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (FA) específico para bhCG. En presencia del sustrato fluorogénico 4-metil- umberiferil-fosfato, se produce una respuesta en fluorescencia proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Para la evaluación de la factibilidad de la estrategia propuesta que incluye el uso de la tira como método rápido y económico de pesquisaje, se tuvo en cuenta el nivel de corte establecido por AMA de 5 UI/L y la obligatoriedad de confirmar el resultado positivo por otro IE que utilice anticuerpos y sistema de detección diferente al primero. Se considera una muestra presuntamente positiva aquella que provoque la aparición de dos bandas en la zona de reacción de la tira, y positiva, a toda muestra (presuntamente positiva), cuantificada por AIA-600 cuyos valores de concentración sea ≥ 5 UI/L. La modificación del protocolo original de las tiras, garantizó un adecuado nivel de sensibilidad y especificidad que logró el reconocimiento de la muestra H003U001 al ser re-en sayada por el método modificado (tabla II), anteriormente evaluada como FN (tabla I), con valores de concentración por AIA-600 de 36 UI/L. También se evidenció una respuesta cualitativamente positiva en muestras de embarazadas conteniendo 170 y 200 UI/L las cuales dieron señal hasta diluciones 1:64, identificándose concentraciones de hCG inferiores al corte de positividad. No obstante la estrategia analítica utilizada por la mayoría de los laboratorios acreditados incluyen el uso de inmunoensayos isotópicos y no isotópicos comerciales tanto para el pesquisaje como para la confirmación del resultado presuntamente positivo (ej: HCG Delfia, HCG Elecsys, DPC Immulite, Cobas Core)⁶, los cuales reconocen diferentes isoformas de la hormona, hasta el momento en nuestra experiencia el uso de tiras reactivas parecen ser un método adecuado para la detección inequívoca de valores de hCG ≥ 5 UI/L, lo cual quedo evidenciado por los resultados comparables obtenidos en el estudio de intercomparación realizado que utilizó muestras de orina con valores de concentración conocidos de hCG. A pesar de la discordancia reportada en la literatura para los IE disponibles comercialmente, se ha sugerido a estos métodos como la única forma práctica para el control antidopaje de la hormona, en virtud de su capacidad para procesar grandes volúmenes de muestras en un tiempo relativamente corto, con alto grado de certeza. Entre las causas de los resultados discordantes se cita la inmunoreactividad diferente de los AcM involucrados, por el

reconocimiento preferente de alguna de las formas moleculares y subunidades de hCG, presentes en la matriz biológica^{9,10}. Lo que también podría explicar las diferencias en tiempos de aparición de la señal en tiras-hCG, ante concentraciones de hCG muy similares (tabla II).

CONCLUSIONES

Se propone la tecnología no instrumental (tiras-hCG) como alternativa óptima para el pesquijaje de hCG en el control del dopaje por su demostrada sensibilidad, especificidad, bajo costo (0.42 USD/determinación), fácil ejecución (no se necesita personal especializado) y rapidez (resultados en 30 min.). El AIA-600 se sugiere como método de confirmación a un costo por determinación de 2 USD.

Agradecimientos

Deseamos agradecer al Lab. IMIM, especialmente a los Dr. Rafael y Xavier de La Torre y a la Dra. Rosa Ventura, por toda la información y apoyo brindado, así como por el suministro de muestras de referencias utilizadas en la estandarización del procedimiento.

Al Dr. Víctor Cabrera, Lab. IMD, por la revisión y correcciones hechas al manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pritchard, J.A. Tratado de Obstetricia. 3^{ra} Edición, Madrid. SALVAT Editores SA.1991.
2. Stenman UH, Alfthan H, Hotakainen K. Human chorionic gonadotropin in cancer. Clin Biochem 2004;37:549-61.
3. Sturgeon CM, McAllister EJ. Analysis of hCG: clinical applications and assay requirements. Ann Clin Biochem 1998;35:460-91.
4. Birken, S.; Canfield, R.E.. Chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin. Ed., Plenum Press, New York, NY, 1980; 65-88.
5. Stenman UH, Unkila-Kallio L, Korhonen J, Alfthan H. Immunoprocedures for detecting human chorionic gonadotropin: clinical aspects and doping control. Clin Chem 1997;43:1293-1298.
6. Reporte final de WADA2004. PT-04. Diciembre 2004.
7. The World Anti-Doping Code. The 2005 Prohibited List. S2 Hormones and related substances. January 2005; 2.
8. Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, Davies S, Rayburn WF. Accuracy of home pregnancy test at the time of missed menses. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2004; 190:100-5. (Amer. J. Obst. and Gynecol)
9. Butler SA, Khanlian SA, Cole LA. The suitability of home test devices for detecting early pregnancy hCG. Clin Chem 2001; 47: 2131-2136.
10. Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between method variation in human chorionic gonadotropin test results. Clin Chem 2004; 50: 874-882.
11. Leinonen, A; Tahtela, R; Karjalainen, E., Detection of Human Chorionic Gonadotropin in Urine by two Different Immunoassays Recent Advances in Doping

Analysis (6). En: Proceedings of the 16th Cologne Workshop on Dope Analysis, Ed.,
SPORT and BUCH StrauB. ISBN 3-89