

PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ ȘI DETERMINAREA SEMICANTITATIVĂ PRIN METODA IMUNOLOGICĂ A CORIOGONADOTROPINEI UMANE DIN URINĂ

T. Nagy

Reacțiile biologice de sarcină utilizate în diagnosticul precoce al gravității, care după prima lor descriere de către *Ascheim* și *Zondek* au fost adoptate la mai multe specii de animale, în decursul timpului s-au simplificat mult. Dînd rezultate din ce în ce mai precise, reducînd și timpul necesar acestor determinări. În locul reacției biologice de sarcină de 96 ore, în prezent se utilizează reacția *Galli-Mainini* care poate fi executată în 2 ore. Gradul de precizie al acestei reacții biologice relativ rapide este apreciat între 90—99%. Variațiile periodice de sensibilitate ale animalelor, precum și dificultățile legate de îngrijirea lor au impus necesitatea elaborării unor metode care exclud aceste inconveniente majore ale reacțiilor biologice.

Diagnosticul de sarcină poate fi precizat și fără folosirea animalelor, prin cercetarea schimbării raportului estrogeni-progesteron. Aceste dozări, în condiții adecvate de laborator, oferă date valoroase, fiind utile și pentru studiul condițiilor hormonale în sarcină. Ele nu s-au extins însă ca metode practice în diagnosticul de sarcină.

Testul Soskin și probele de provocare hormonală (3, 5, 12, 13, 17, 25, 35) cu care s-a tîns la evitarea dificultăților legate de îngrijirea animalelor, nu s-au răspîndit în practică.

Reacțiile de sarcină utilizate mai recent, care nu se bazează pe metode biologice, trebuie să fie mai precise, mai simple decît reacțiile biologice și să le egaleze în certitudine. Precizia de 90% atînsă cu reacțiile biologice nu poate fi mărită. Scopul poate fi deci reducerea timpului relativ de examinare, posibilitatea punerii în evidență a sarcinii într-o fază mai precoce cu o tehnică simplificată.

Se pare că introducerea reacțiilor imunologice rezolvă aceste deziderate.

Ideea reacției imunologice de sarcină s-a născut încă în 1903, cînd *Liepmann* a imunizat iepuri cu extract de placentă umană. Pe baza rezultatelor sale, *Opitz* a preconizat introducerea unei reacții de precipitare în diagnosticul de sarcină. Printr-o tehnică imunologică, pentru prima dată s-a pus în evidență insulina în 1956.

Determinarea imunologică a hormonului gonadotropinic (HCG) se leagă de numele lui *Swierczynska* și *Samochowiec* (37), *Wilde* și *Gemzel* (39, 40), *Brody* și *Carlström* (6, 7, 8, 9, 10) și *McKean* (27), care în 1960, independenți unii de alții, au elaborat diferite procedee imunologice. Una dintre metode se bazează pe inhibiția hemaglutinării, iar cealaltă pe reacția de fixare a complementului, respectiv HCG se pune în evidență prin metoda precipitării din urină și ser.

Dintre reacțiile imunologice de sarcină, cele mai corespunzătoare în practică s-au dovedit a fi acelea care se bazează pe inhibiția pasivă a hemaglutinării și care folosește metoda aglutinării prin latex.

Metoda de inhibiție pasivă a hemaglutinării și cea a aglutinării prin latex, în principiu sînt asemănătoare, diferind numai sistemul indicator al purtătorilor de antigeni utilizat la citirea rezultatelor. La unul dintre sisteme indicatorul îl constituie hematiile de berbec sensibilizate cu HCG, la celălalt particulele de latex sensibilizate cu HCG. Coriogonina este adsorbită pe su-

prafața hematiilor de berbec, respectiv pe particulele de latex. Esența reacției constă în adăugarea unui ser antiuman conservat care conține gonadotropine cu urină, în prezența unei cantități corespunzătoare de hematii sau particule de latex folosite drept sistem indicator. Serul anti-HC și HCG din urina provenită de la gravide se leagă între ele și astfel, în sistemul bazat pe hemaglutinație, datorită neproduserii aglutinării are loc o sedimentare rapidă a hematiilor, iar în sistemul aglutinării prin latex nu se produce aglutinarea particulelor de latex. Dacă se adaugă urină de la negravidă care nu conține HCG, reacția va avea loc între serul conținând elemente anti-HC și HC fixat pe hematii sau latex. Acestea se aglutinează și hematiile aglutinate rămân suspendate timp mai îndelungat, apoi se sedimentează uniform, respectiv în metoda aglutinării prin latex particulele aglutinate se îngrămădesc. După metoda latex executată în eprubetă, recent s-au elaborat metode mai rapide, executate pe lame. Prin aceste reacții de sarcină poate fi executată în 2 minute.

Cercetările noastre

Am executat examinări atât cu metoda de inhibiție a hemaglutinării cit și cu cea a aglutinării prin latex. Pe baza experiențelor sîntem în măsură să confirmăm utilitatea, simplitatea și ușurința efectuării acestei metode.

Cercetările noastre le-am efectuat cu o combinație de reactivi Pregnosticon (Organon) care conține antiser liofilizat în fiole, hematii de berbec sensibilizate și o soluție tampon necesară dizolvării acestora, precum și preparatul denumit Gravindex (Cilag Chemie).

Aceste combinații conservate de reactivi, în stare de utilizare permanentă și potrivite la o sensibilitate corespunzătoare, asigură posibilitatea efectuării reacțiilor imunologice de sarcină în mod rapid și cu minimum de aparatură.

1. *Testul Pregnosticon.* Se efectuează astfel: antiserul liofilizat se diluează în 0,1 ml urină filtrată (e favorabil să se folosească fracțiunea urinară de dimineață sau cea cu densitate maximă). Se adaugă 0,4 ml suspensie de hematii sensibilizate și amestecul se agită ușor timp de 0,5—1 minut. În caz de sarcină în 1—1,5, maximum în 2 ore se formează un inel de sedimentare caracteristic ampulelor cu fundul în formă de semisferă (reacția pozitivă), în caz de negativitate inelul nu se formează nici după 3 ore (nu e caz de graviditate). Sensibilitatea reacției conform prescripțiilor fabricii este astfel stabilită, că în cazul unui conținut de 500—1000 U/l de HCG dă rezultat pozitiv, pe cînd sub această valoare rezultatul este negativ. Stabilirea limitei inferioare la cel puțin 500 U este necesară pentru că în cazul unor amenorei de scurtă durată se poate obține o reacție pozitivă falsă, din cauza conținutului bogat în LH al urinei (reacția *Ower Cross*) (fig. 1).

2. *Testul imunologic.* Gravindex pe lamă. Serul anti-HCG și antigenul latex HCG, necesare testului imunologic Gravindex, se păstrează într-o sticlă prevăzută cu o pipetă cu capac elastic. Se alătură și o lamă pe fond negru. Se pune o picătură de antiser pe lamă și i se adaugă o picătură din urina de examinat. Urina și antiserul se amestecă bine cu o baghetă de lemn și se incubează timp de 30 minute prin mișcarea lamei. După aceea i se adaugă 2 picături de antigen-latex, HCG, anterior bine agitat, și se amestecă din nou. Lama va fi ușor înclinată într-o parte și în cealaltă. La o lumină bună citirea rezultatului se face după 2 minute. Dacă în decurs de 2 minute se constată aglutinare, atunci reacția este negativă, și nu e caz de graviditate, iar dacă aglutinarea nu apare și particulele de latex, într-un amestec omogen, formează o suspensie cu aspect de smîntînă, atunci reacția este pozitivă și e caz de sarcină. Citirea trebuie făcută precis la sfîrșitul minutului al doilea. Aglutinarea apărută după 2 minute nu trebuie luată în considerare. Dacă aglutinarea nu poate fi apreciată cu ochiul liber, de exemplu din cauza luminii slabe, atunci citirea se poate face și la microscop. La microscop, în caz de reacție negativă, se pot observa grunji mari aglutinați, pe cînd în caz pozitiv particulele de latex sînt repartizate uniform (fig. 2, 3, 4, 5) (tabelul nr. 1).

T. NAGY: PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ ȘI DETERMINAREA SEMICANTITATIVĂ
PRIN METODA IMUNOLOGICĂ...

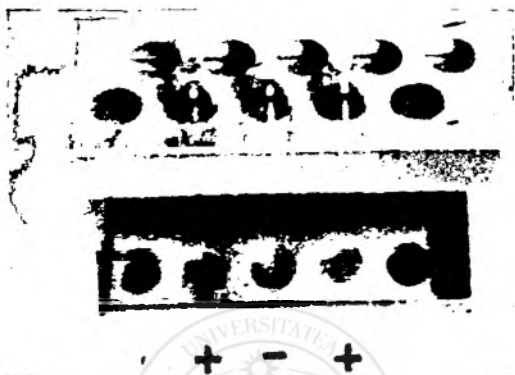


Fig. nr. 1.: Reacția Pregnosticon cu rezultat pozitiv și negativ. Pe fundul ampulei care prezintă rezultate pozitive, se observă o sedimentare inelară bine delimitată, iar pe fundul ampulei negative se sedimentează hematiile sensibilizate în mod uniform.

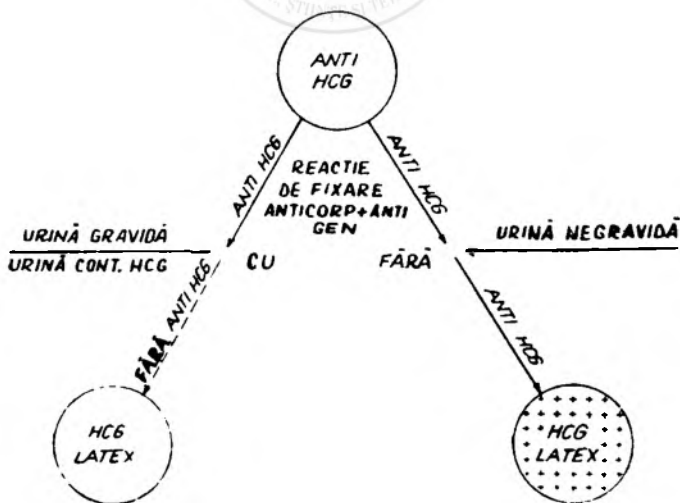


Fig. nr. 2.: Schema principală a testului imunologic (Gravindex).



Fig. nr. 3.: Aspectul macroscopic și microscopic al reacției Gravindex cu rezultat pozitiv.

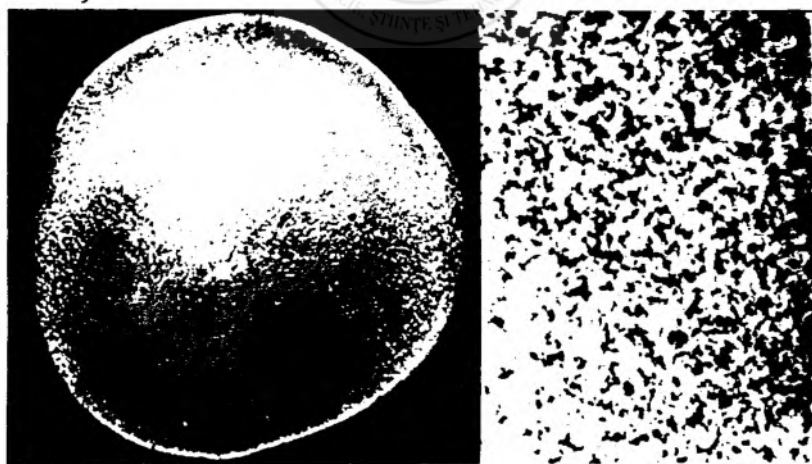


Fig. nr. 4.: Aspectul macroscopic și microscopic al reacției Gravindex cu rezultat negativ.

Tabelul nr. 1.

	Numărul în- vestigațiilor	Numărul cazu- rilor pozitive cu reacția	Numărul cazu- rilor pozitive cu testul Pregnosticon	Pregnosticon	
				reacție fals negativă	reacție fals pozitivă
Graviditatea în fază pre- coce+disgravidie	46 (43)	34 (34)	46 (43)	∅	∅
Graviditatea extrauterină	9 (5)	∅	9 (5)	∅	∅
Negravidă	24	∅	3	∅	3 (?)
Lehuză sănătoasă ziua a 3-a ziua a 4-a	1 2	∅ ∅	2 ∅		
După avort incomplet la 3. zile la 4. zile	6 4	∅ 1	4 ∅		
După avort instrumental la 9. zile la 14. zile reziduuri	10 3	∅ ∅	10 3		
Total	108				

Numerele puse în paranteză arată numărul persoanelor consultate, iar fără paranteză numărul consultațiilor.

Tabelul nr. 2.

Numărul cazurilor	Rezultate corespunzătoare								
	Gravindex		Galli- Mainini		Pregnos- ticon		Grav- dex	Galli- Mainini	Pregnos- ticon
	+	-	+	-	+	-			
12	7	5							
50	32	18	30	18			2		
7	4		2		7	3	6		
Total: 69	43	23	32	18	7	3	8		

Iar în 50 de cazuri numai cu reacția Galli-Mainini, paralel.

În 12 cazuri reacția cu Gravindex a fost efectuată fără controlul altor reacții.

În 7 cazuri am efectuat paralel cu reacția Galli-Mainini și reacția Pregnosticon.

Rezultatele noastre

În cursul cercetărilor am dorit să primim răspuns la următoarele întrebări:

1. Sensibilitatea testelor?
2. Dacă aceste preparate produse în primul rînd pentru scopul unui examen calitativ sînt apte pentru cercetări semicantitative sau cantitative?
3. Sînt aceste reacții oare specifice?
4. În ce măsură rezultatele sînt fidele?
5. Pot să fie oare reproduse rezultatele?

Ad. 1. Cercetările referitoare la sensibilitate au fost executate cu serii de diluție ale preparatelor HCG (Pregnyl, Choriogonin). Folosind testul Pregnosticon în cazul diluării cu urină negativă, pe lingă un conținut de HCG de 500 U/l am obținut o reacție pozitivă slabă (un inel subțire, larg), la o valoare de 1000 U/l HCG. reacția pozitivă a fost accentuată. În seria de diluții, efectuate cu soluții fiziologice, rezultatul a fost pozitiv doar dacă concentrația HCG a depășit valoarea de 5000 U/l. Aceste rezultate similare cu ale lui *Richter* și *Arnold* (32) arată că la inhibarea hemaglutinării contribuie și alte substanțe proteice din urină. În același timp demonstrează și faptul că sensibilitatea testului Pregnosticon egalează pe aceea a testului hiperemiei ovariene descris de *Kuppermann* (23) și este aproximativ de 10 ori mai sensibil decît reacția cu broscuul.

Sensibilitatea testului Gravindex am găsit-o de 10.000 U/l atît la diluția cu ser fiziologic, cît și la cea cu urină negativă.

Ad. 2. Rezultatele cercetărilor de sensibilitate descrise arată în același timp că dacă reacțiile efectuate cu preparatele din circuitul comercial servesc în primul rînd la determinarea calitativă a HCG, în urma sensibilității lor relativ mari pot fi utile chiar și pentru cercetări semicantitative. *Wide* (41), folosind metoda hemaglutino-inhibării la aproape 1000 de sarcini fiziologice, cu ocazia determinărilor semicantitative, a găsit între zilele 60—80, după ultima menstruație, valoarea HCG mai mare de 100.000 U/l și conform cercetărilor sale cantitative de HCG eliminată prin urină, în tot cursul sarcinii rămîne peste 10.000 U/l, pînă în momentul nașterii. Această constatare aduce date noi în cercetările cantitative hormonale din cursul sarcinii.

Ad. 3. În legătură cu specificitatea metodelor imunologice doresc să arăt doar faptul că PMS (Gestyl) diluat cu urină de bărbat, nici într-o cantitate de 40.000 U/l n-a dat rezultate pozitive la nici un test folosit de noi. Testul Pregnosticon însă fiind mai sensibil, la un nivel mai înalt de concentrație urinară al LH, poate să dea o falsă pozitivitate din cauza structurii antigenice asemănătoare dintre HPLH și HCG (reacția *Ower Cross*). Aceasta însă se poate înlătura cu siguranță prin folosirea unei semidiluții urinare, specificitatea acestei reacții imunologice între condițiile de cercetare date, fiind demnă de încredere.

Ad. 4. În cele 108 cazuri examinate cu Pregnosticon n-am obținut nici un rezultat fals-negativ. Reacții fals- pozitive am avut în trei cazuri. În aceste cazuri fiind vorba de o amenoree de 15—30 zile la femei mai în vîrstă (40—42 ani) nu se poate exclude posibilitatea reacției *Ower Cross*, cu toate că datorită hemoragiei tardive dar abundente este posibil să fie vorba și de un avort precoce. Pozitivitatea cea mai precoce am obținut-o într-a 34-a zi după ultima menstruație, respectiv în a 6-a zi după menstruația care n-a mai avut loc.

Pozitivitatea reacției a precedat pe cea a reacției cu broască cu 8—12 zile. Sarcinile au putut fi confirmate cu ocazia examenelor ulterioare de control, respectiv prin examinarea materialului de raclaj obținut în avorturi provocate. În sarcini extrauterine, cînd reacția cu broasca a fost în repetate rînduri negativă, am obținut reacția pozitivă repetată cu metoda Pregnosticon. Aceste rezultate au fost mai tirziu confirmate prin date operatorii și histologice.

Cu reacția Gravindex la 3 din 69 cazuri am obținut o falsă reacție negativă. Acestea au fost la sarcini foarte precoce, într-a 37-a și a 39-a zi după ultima menstruație. În majoritatea cazurilor reacția am efectuat-o într-a 40-a și a 100-a zi după ultima menstruație. În aceste cazuri n-am obținut reacții false. Discrepanța

Între cele două reacții se datorește sensibilității diferite a acestora. Respectind condițiile corespunzătoare ale examenelor, respectiv prin creșterea preciziei tehnicii de citire (folosind și citirea la microscop), după cum arată și datele din literatură, reacții false abia că se constată (tabelul 1, 2).

Ad. 5. Prin folosirea mai multor fracțiuni de urină, respectiv în serii, cu diluții identice, rezultatele au putut fi întotdeauna reproduse.

Discuții

În concordanță cu cercetările altor autori putem să confirmăm, pe baza rezultatelor noastre, faptul că prin reacțiile imunologice de sarcină, diagnosticul a intrat în posesia unor mijloace valoroase (4, 11, 14, 18, 19, 21, 22, 24, 26, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 38, 40, 42). Din cauza numărului relativ redus nu dorim să interpretăm procentul rezultatelor noastre. Putem să stabilim însă că atât cercetările cu Gravindex cât și cele cu Pregnosticon ating nivelul de siguranță al reacției cu mascul de broască, chiar mai mult, testul cu Pregnosticon dă o reacție pozitivă mai precoce decât reacția cu broască mascul. Datele literare stabilesc siguranța probei imunologice de sarcină la 95—100%, ceea ce corespunde sau chiar și depășește rezultatele celor mai bune reacții biologice. Reacția Pregnosticon, datorită sensibilității ei mai mari, în cazurile sarcinilor patologice și extrauterine, depășește cu mult siguranța de numai 30—50% ale reacției *Galli-Mainini* simple, efectuate cu urină neconcentrată, egalând atât reacția *Ascheim-Zondek* mult mai lungă și costisitoare, cât și reacția hiperemică *Koppermann*. Reacțiile fals- pozitive pot să fie cu siguranță înalturate prin diluarea 1 : 2 a urinei. Despre reacția imunologică pe lamă (reacția Gravindex) se relatează deocamdată numai în câteva comunicări. Sensibilitatea ei nu atinge pe cea a testului Pregnosticon, fiind aproximativ egală cu cea a reacției *Galli-Mainini*, devine pozitivă într-a 40—42-a zi după ultima menstruație, pe când reacția Pregnosticon dă rezultate pozitive cu 6—8 zile mai devreme. Unii autori, în locul examinării urinei de dimineață, propun examinarea fracțiunii urinare cu densitatea cea mai mare, relatind cu aceasta rezultate pozitive în proporție de 99%. Avind în vedere toate acestea, reacțiile fals-negative pot fi favorabil influențate.

Față de metodele de pînă acum folosite în diagnosticul sarcinii, reacțiile imunologice oferă mai multe avantaje. Au o tehnică simplă care face posibilă executarea lor fără nici un utilaj, chiar în cadrul consultațiilor de policlinică, egalează sau depășesc certitudinea celor mai bune reacții biologice și devin pozitive mai precoce decât reacția pe broască. Greutățile întreținerii animalelor, sensibilitatea oscilantă a lor accentuează avantajele reacțiilor imunologice. Chiar și în timp dau rezultate mai rapide. Testul Pregnosticon poate fi citit după 2 ore, iar testul Gravindex după 2 minute.

Testul Pregnosticon, datorită sensibilității crescute, pe lângă diagnosticul de rutină, poate fi utilizat în sarcini patologice și în diagnosticul mai dificil, pe când testul imunologic pe lamă, din cauza rapidității sale, își poate găsi o aplicație mai largă în diagnosticul de rutină al consultațiilor ambulante. Cu toate că unele examinări sînt cu ceva mai costisitoare decât reacțiile biologice cele mai simple, ele sînt însă compensate prin munca mai redusă pe care o necesită procurarea și întreținerea animalelor necesare metodelor biologice mai sensibile. Ele pot fi efectuate și în consultații ambulante. Efectuarea testelor imunologice cu precizie identică în toate perioadele mărește posibilitățile de diagnostic ale consultațiilor ambulante, ale policlinicilor, dar și ale laboratoarelor spitalicești și clinice, și chiar din acest motiv ele au devenit astăzi indispensabile.

Sosit la redacție: 4 februarie 1965.

Bibliografie

1. ARQUILLA E. R., STAVITSKY A. B.: cit. Wide; 2. ASCHEIM S., ZONDEK B.: *Klin. Wschr.* (1927), 6, 1322; 3. ÁRVAY A.: *Gynécologie Pratique* (1963), 15, 29;
4. BARR W. A.: *Obst. and Gynaec. Brit. Commonwealth.* (1963), 70, 551; 5. BRANDL K.: *Münch. med. Wschr.* (1961), 103
6. BRÓDY S., CARLSTRÖM G.: *Lancet* II (1960), 99; 7. BRÓDY S., CARLSTRÖM G.: *Nature* (1961), 189, 841;
8. BRÓDY S., CARLSTRÖM G.: *Scand. Journ., of Clin. and Lab. Investig.* (1961), 13, 683; 9. BRÓDY S., CARLSTRÖM G.: *Clin. Endocrin. and Metabolism.* (1962), 22, 564; 10. BRODY S., CARLSTRÖM G.: *Acta Endocrin* (1963), 42, 485;
11. BROSOWITZ E., LOHMEYER H.: *Zbl. Gynäk.* (1963), 85, 1095; 12. BURGER K.: *Med. Klin.* (1951), 46, 821; 13. CAFFIER P.: *Zbl. Gynäk* (1947), 69, 10; 14. FRANK R.: *Zbl. Gynäk.* (1963), 85, 1088; 15. FRIEDMANN M. H.: *Amer. J. Physiol.* (1929), 90, 653; 16. GALLI-MAININI C. J.: *Clin. Endocrin* (1947), 7, 653; 17. GONDA T.: *Gyógyszereink* (1963), 13, 17; 18. GRUENEBERG V., ULM R.: *Geb. und Frauenheilk* (1964), 23, 366; 19. HENRY J. B., LITTLE W. A.: *J.A.M.A.* (1962), 182, 230; 20. HOBSON B. N.: *Obstet. Gynec. Brit. Emp.* (1955), 62, 354; 21. HUTCHERSON W. P., SCHWARTZ H. A., BATES H. M.: *Amer. J. Obstet. Gynec.* (1964), 89, 70; 22. ISLAMI Z., FISCHER L. M., KUPFER H. G.: *Amer. J. Obstet. Gynec.* (1964), 89, 586; 23. KUPPERMAN H. S., GREENBLATT R. B., LOBACK C. R.: *J. Clin. Endocr.* (1943), 3, 548; 24. LEMKE J., LAURITZEN C. H.: *Zbl. Gynäk.* (1963), 85, 1081; 25. LIEPMANN W.: *Dtsch. med. Wschr.* (1903), 29, 80, (1903), 29, 383; 26. LOHMEYER A., BROSCITZ E.: *Ztschr. f. Geb. U. Gyn.* (1964), 1, 162; 27. McKEAN C. M.: *Amer. J. Obstet. Gynec.* (1960), 80, 596; 28. NAGY S., SAS M.: *Magy. Nőorv. L.* (1963), 26, 42; 29. OPITZ E.: *Dtsch. Med. Wschr.* (1903), 29, 597, 29, 849; 30. RAPE J.: *Bulletin Soc. Roy. Belg. Gyn. et Obst.* (1962), 32, 505; 31. RICHTER R. H. H.: *Gynecologie* (1962), 154, 124; 32. RICHTER R. H. H., ARNOLD H.: *Gynécologia* (1963), 155, 72; 33. SOMONETTA R., BOCCI A., LOMBARDI M.: *Minerva Gyn.* (1964), 16, 387; 34. SOUTHAM A. L., SULTZER B. M., COHEN H.: *Am. J. Obstet. Gynec.* (1963), 85, 495; 35. SCWARTZ H. A.: *Amer. J. Obstet. Gynec.* (1950), 59, 213; 36. SULYOK S., ORIOVICS J., ERDÖSI F., CZEIZEL E.: *Orv. Hetil.* (1963), 104, 2428; 37. SWIERCZYNSKA Z., SAMOCHOWIEC E.: *Polski Tygodnik Lekarski* (1960), 15, 1217; 38. VALLÓ D., SZÁSZ I., PERKEDI J.: *Orv. Hetil.* (1963), 104, 2278; 39. WIDE L., GEMZEL C. A.: *Acta Endocrin* (1960), 35, 261; 40. WIDE L., GEMZEL C. A.: *Acta Endocrin.* (1962), 39, 539; 41. WIDE L.: *Acta Endocrin. Suppl.* (1962), 70; 42. WILKEN H.: *Zbl. Gynäk.* (1964), 86, 1609.