

---

---

## INTERÉS CLÍNICO

La Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) es una hormona glicoproteica formada por dos subunidades diferentes (alfa y beta), la cadena alfa es común a la de las hormonas TSH, FSH y LH, mientras que la cadena beta es específica de la HCG. Esta hormona es sintetizada por el tejido trofoblástico y por algunas células malignas y es secretada a la circulación sanguínea y excretada en la orina, donde se puede detectar a partir del noveno día de la concepción. Es por ello que la determinación de HCG en suero u orina resulta de gran interés en:

**1.- El diagnóstico temprano del embarazo:** La detección de HCG en la orina es un indicador directo de embarazo, el cual puede ser detectado a partir del noveno día después de la concepción, antes de la fecha esperada de la próxima menstruación. Para este fin se utiliza un nivel de corte de 0,05 UI/mL.

**2.- La evaluación de trastornos del embarazo:** En los trastornos a principios del embarazo, como embarazo ectópico (1) y la amenaza de aborto espontáneo, la concentración de HCG en un determinado período de gestación y su ritmo de ascenso, es anormalmente baja, aunque los valores oscilan en un rango muy amplio.

**3.- Como marcador tumoral:** La gonadotropina coriónica es considerada como un marcador tumoral asociado a enfermedades malignas trofoblásticas y a tumores de células germinativas por lo cual se ha utilizado este marcador no sólo para el diagnóstico, sino para vigilar el tratamiento en pacientes con tumores secretores de HCG (2,3).

**4.- Marcador de riesgo para el Síndrome de Down:** Desde 1987 (4) y 1988 (5), varios investigadores reportaron niveles significativamente elevados de HCG en el suero de embarazadas portadoras de un feto con el Síndrome de Down. Teniendo en consideración la relación existente entre los niveles bajos de Alfa-fetoproteína (6,7) y el Síndrome de Down, así como la incidencia de la edad materna en esta aberración genética (8), diferentes autores han comprobado la utilidad clínica del pesquisaje combinado de AFP y HCG más edad materna (9,10,11) para calcular el riesgo de Síndrome de Down entre las 15 y 19 semanas de gestación, con niveles de detección que oscilan entre 55 y 65 % llegando en algunos casos hasta un 80 % para un 5 a 7 % de falsos positivos. El nivel de corte utilizado con más frecuencia es de 1:270 que se corresponde con el riesgo de una mujer de 35 años no sometida a pesquisaje.

## FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA HCG utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA (10 µL por pocillo) revestidas con anticuerpos monoclonales y policlonales Anti beta HCG. Las muestras se incuban en los pocillos de la tira y si éstas contienen HCG, la misma se fija a los anticuerpos del recubrimiento. La realización de un lavado posterior elimina los componentes de la muestra no fijados. Se añade entonces un conjugado Anti HCG (cadena alfa y beta)/Fosfatasa Alcalina (F.A.), el cual se une a la HCG fijada en la reacción anterior. Un nuevo lavado de las tiras elimina el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato) en los pocillos de la tira, éste resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de HCG en la muestra.

---



---

## CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO. Código UM 2021 (192 pruebas)

**Contenido:**

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	2
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	2 x 22 mL
R3: Suero Estándar (a-f)*	6 x Liof.
R4: Suero Control	1 x Liof.
R5: Conjugado	1 x 5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 ml

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

\*Calibrado frente al patrón de referencia internacional 75/537 de la O.M.S.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.

Los Sueros Estándares y el Suero Control, fueron negativos a las pruebas de detección de Anti-VIH 1+2, HBsAg y Anti-VHC.

**Preparación de las soluciones de trabajo:****Para diagnóstico de embarazo en muestras de orina:**

**R1:** Para una tira de reacción, diluya 1 mL de solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

**R2:** Diluya 1:10 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,2 mL de R2 + 1,8 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

**R3:** Reconstituya R3c con 0,5 mL de solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle, este Estándar es el Suero Control de Embarazo. Reconstituya R3d con 0,5 mL de solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle. Este Estándar constituye el Suero Control Positivo del ensayo.

**R5:** Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

**R6:** Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

**Para la cuantificación de HCG en muestras de suero:**

**R1, R2 y R6:** De igual forma que lo descrito en muestras de orina.

**R3:** Reconstituya cada frasco con 0,5 mL de solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle.

**R4:** Reconstituya con 0,5 mL de solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle.

**R5:** Realice a partir del frasco listo para el uso una dilución 1:3 con solución de trabajo R2 (0,1 mL de R5 + 0,2 mL de R2).

---

---

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 °C, en esas condiciones serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses, de 2 a 8 °C, en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

## MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Incubadora a  $37 \pm 1$  °C.
- Papel absorbente.

## PRECAUCIONES

- Manipule las muestras, los Sueros Estándares y el Suero Control, como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.
- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén a temperatura ambiente y los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez preparados según las especificaciones, se encuentren completamente disueltos.
- Utilice puntas limpias o nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones y muestras.
- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.
- Las muestras de suero y de orina a utilizar deben ser preferentemente frescas, sin precipitados y debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las mismas.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora, para evitar que se condense humedad en su superficie.
- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos del UMELISA HCG de lotes diferentes no se deben intercambiar.

## PROCEDIMIENTO TÉCNICO.

### 1.-a) Preparación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras de suero.

#### Sueros Estándares y Suero Control:

Los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez reconstituidos quedan listos para su uso. La concentración corresponde a la especificada en la etiqueta de los frascos.

#### Muestras:

Diluya los sueros 1:400 con solución de trabajo R2 al menos 10 minutos antes de transferirlos a la placa de reacción.

### 1.-b) Preparación de los controles y las muestras de orina para la detección de embarazo.

#### Suero Control de Embarazo:

Una vez reconstituido el frasco R3c queda listo para el uso.

#### Suero Control Positivo:

Una vez reconstituido el frasco R3d queda listo para el uso.

#### Muestras:

Diluya 1:2 las muestras de orina con solución de trabajo R2.

### 2.-Adición de los Sueros Estándares, los controles y las muestras a las tiras de reacción.

Añada 10 µL de los Sueros Estándares, los controles y las muestras de suero u orina, siguiendo el siguiente esquema de distribución.

a) Para la cuantificación de HCG en muestras de suero:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	R3a	R3e	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
<b>B</b>	R3a	R3e	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
<b>C</b>	R3b	R3f	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
<b>D</b>	R3b	R3f	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
<b>E</b>	R3c	R4	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
<b>F</b>	R3c	R4	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
<b>G</b>	R3d	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
<b>H</b>	R3d	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

b) Para muestras de orina en el diagnóstico de embarazo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3a	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	R3a	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	R3d	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	R3d	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	R3c	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	R3c	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

Los Sueros Estándares (R3a-R3f) y el Suero Control (R4) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

**Se recomienda evaluar las muestras por duplicado.** De utilizarse con este fin el programa UMELISA HCG para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

### 3.-Incubación de los Sueros Estándares, los controles y las muestras.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

#### 4.-Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción cuatro veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

#### 5.-Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

#### 6.-Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

#### 7.-Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

#### 8.- Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

**9.- Incubación del sustrato.**

Incuba en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 100 a 160 unidades para el Suero Estándar R3f y de 70 a 160 unidades para el Suero Control Positivo, según se analicen muestras de suero o de orina. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura, puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.

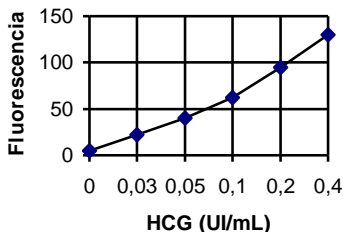
**10- Lectura.**

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación, utilizando un lector de la serie SUMA.

**PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO**

Los valores de fluorescencia de las muestras de suero de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra la concentración de HCG correspondiente a la Curva Estándar, obteniéndose los resultados en UI/mL.

Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.

**Curva Estándar**

Para el diagnóstico del embarazo, se comparan las fluorescencias de las muestras, con la del Control de Embarazo, para clasificarlas como positivas, negativas o dudosas según se describe en "Interpretación de los Resultados".

La validación, interpretación e impresión de los resultados, son realizados automáticamente por el programa UMELISA HCG dependiendo de la naturaleza de la muestra ensayada. Los resultados pueden expresarse en múltiplos de la mediana (MoM), para lo cual se calcula el cociente entre la concentración de HCG de la muestra, expresada en UI/mL y la mediana de la edad gestacional correspondiente. Los valores de las medianas establecidas en gestantes cubanas son:

<u>Semanas de Embarazo</u>	<u>Medianas (UI/mL)</u>
15	52,30
16	42,45
17	39,35
18	32,10
19	29,00

### CONTROL DE LA CALIDAD

#### Ensayo cuantitativo en suero:

I.La Curva Estándar debe cumplir la siguiente condición:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada Suero Estándar (R3a-R3f) deben proporcionar un incremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II.El valor de concentración calculado para el Suero Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

III.Si las muestras son analizadas por duplicado deben cumplir la siguiente condición:

La diferencia de los valores de fluorescencia de los duplicados de una muestra debe ser menor al 10 % con respecto a su valor medio.

#### Ensayo cualitativo en orina para el diagnóstico del embarazo:

I.Al menos uno de los duplicados del Blanco (R3a) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.

II.Ambos duplicados del Suero Control de Embarazo (R3c) deben tener valores de fluorescencia que se correspondan con la mitad de la media del valor de fluorescencia del Suero Control Positivo.

III.Al menos uno de los duplicados del Suero Control Positivo (R3d) debe tener un valor de fluorescencia entre 70 y 150 unidades.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

#### Ensayo cuantitativo en suero:

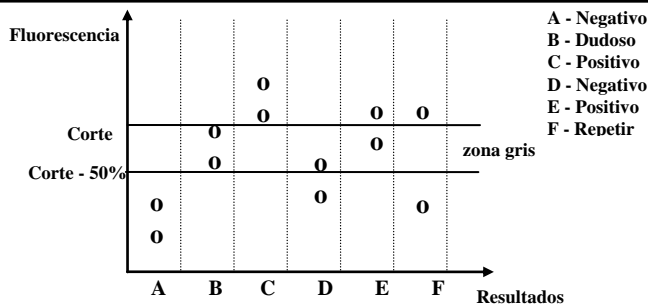
El resultado expresa la concentración de HCG en suero, en UI/mL. Con la dilución de las muestras 1:400 se puede cuantificar entre 0 y 160 UI/mL. Si el resultado de una muestra no se encuentra dentro de esos límites, se debe repetir el ensayo diluyendo apropiadamente.

#### Ensayo cualitativo en orina para el diagnóstico del embarazo:

Este ensayo sólo detecta la presencia de HCG en orina por encima de determinado valor (0,05 UI/mL) que indica la presencia de un embarazo.

I-Muestras analizadas por duplicado:

La interpretación de los resultados se hará según el siguiente diagrama.



II-Muestras analizadas de forma simple:

-Las muestras se evalúan individualmente y se consideran positivas cuando:

$F_i \geq FCE$  Donde:  $F_i$  = fluorescencia de la muestra

$FCE$  = fluorescencia del control de embarazo.

-Las muestras se consideran en el umbral de positividad o dudosas cuando su valor de fluorescencia se encuentra en la zona comprendida entre el nivel de corte y un 50 % por debajo del mismo ("zona gris").

-Si el valor de fluorescencia de una muestra es menor al límite inferior de la "zona gris" se considera que la muestra es negativa.

Toda muestra con un resultado dudoso debe repetirse antes de realizar una interpretación, utilizando la fuente original. Si persiste el resultado como dudoso para estas muestras, debe repetirse el ensayo con una segunda muestra tomada dos días después de la primera.

## CARACTERÍSTICAS ESPECIFICAS DEL ENSAYO

### 1. PRECISIÓN.

Se evaluaron tres muestras con concentraciones conocidas de HCG en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

#### Precisión del UMELisa HCG

(UI/mL)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n=20)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
14	0,81	5,62	0,73	5,04
28	2,04	7,27	1,98	8,96
54	2,15	4,03	2,16	4,04

DE: Desviación Estándar

CV: Coeficiente de Variación

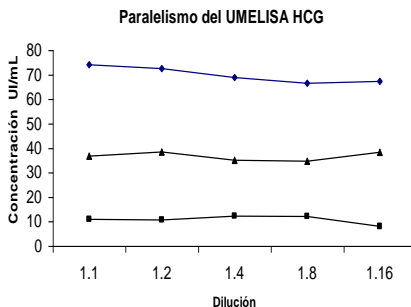


## 2. EXACTITUD.

Se añadieron cantidades conocidas de HCG a tres sueros negativos y se determinó el porcentaje de recuperación al comparar los resultados obtenidos con los valores esperados para cada muestra. Los resultados se presentan en el siguiente gráfico:

**Recuperación del UMELISA HCG**

Muestras	Valor Esperado (UI/mL)	Valor Obtenido (UI/mL)	Recuperación (%)
1	9,4	8,2	87,23
2	21,4	24,85	116,12
3	60,2	59,15	98,25



Se realizaron diluciones seriadas a muestras de pacientes con altos niveles de HCG, las curvas resultantes son paralelas a la Curva Estándar.

## 3. DETECTABILIDAD.

La detectabilidad del UMELISA HCG es de 0,0007 UI/mL. Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Suero Estándar R3a + 2 D.E.

## 4. ESPECIFICIDAD.

Se evaluaron como muestras, preparaciones de altas concentraciones (1 µg/mL) de las hormonas hipofisarias LH, FSH y TSH y el resultado indicó la no presencia de reacciones cruzadas detectables en el ensayo de HCG con estas hormonas relacionadas.

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.-Kingdom, J.C.P., Kelly, T., MacLean, A.B., MacAllister, E.J.: Rapid one step urine test for human chorionic gonadotrophin in evaluating suspected complications of early pregnancy. *British Medical Journal* 302:1308-1311, 1991.
- 2.-O'Connor, F.J., Schlatterer, J.P., Birken, S., Krichevsky, A., Armstrong, E.G., McMahon, D., Canfield, R.E.: Development of highly sensitive immunoassay to measure human chorionic gonadotrophin, its beta subunit, and beta core fragment in the urine: application to malignancies. *Cancer Research* 48:1361-1366, 1988.
- 3.-Norman, R.J., Buck, R.H., Aktar, B., Mayet, N., Moodley, J.: Detection of small molecular species of human chorionic gonadotrophin in the urine of patients with carcinoma of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia: comparison with other assays for human chorionic gonadotrophin and its fragments. *Gynecologic Oncology* 37:254-259, 1990.
- 4.-Bogart, M.H., Pandian, M.R., Jones, O.W.: Abnormal maternal serum chorionic gonadotrophin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 7:623-630, 1987.
- 5.-Wald, N.J., Cuckle, H.S., Densem, J.W. et al.: Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancies. *Br Med J* 297:883-887, 1988.
- 6.-Merkatz, I.R., Nitowsky, H.M., Macri, J.N., et al.: An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosome abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 14:886, 1984.
- 7.-Knight, G.J., Palomaki, G.E.: Maternal serum alpha-fetoprotein screening for fetal Down's Syndrome *Journal of Clinical Immunoassay* 13:23-29, 1990.
- 8.-Ezzell C. Down detection. *Sci.Am*, 279(5): 28-9.1998.
- 9.-Wald NJ, Kennard A, Hackshaw A, Mc Guire A. Antenatal screening for Down's syndrome. *J Med Screen*, 4(4): 181-246.1997.
- 10.-Newby D, Aitken DA, Crossley JA, Howatson AG, Macri JN, Connor JM. Biochemical markers of trisomy 21 and the pathophysiology of Down's syndrome pregnancies. *Prenat. Diagn*, 17(10): 941-51. 1997.
- 11.-Crossley, J.A., Aitken, D.A., Connor, J.M.: Prenatal screening for chromosome abnormalities using maternal serum chorionic gonadotrophin, alpha-fetoprotein, and age. *Prenatal diagnosis*. 11:83-101, 1991.

**Marzo 25, 2003.**

**UMELISA HCG**

**Código UM 2021.**

**Centro de InmunoEnsayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, Cuba.**

**Teléfono: 2082929, Télex: 512439, Fax: (537) 2086514.**