

Intervalli di riferimento di alfa-fetoproteina nel liquido amniotico con il metodo immunoenzimatico Cobas Core

Sergio Brenna¹, Lucia Giuliani¹, Mario Toller¹, Maria Grazia Pisoni², Laura Solerte², Alessandro Marocchi¹

¹Laboratorio di Biochimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera Ospedale Ca' Granda Niguarda, Piazza Ospedale Maggiore 3, 20162 Milano

²Divisione di Ostetricia e Ginecologia, Azienda Ospedaliera Ospedale Ca' Granda Niguarda, Piazza Ospedale Maggiore 3, 20162 Milano

ABSTRACT

Reference intervals for amniotic fluid alpha-fetoprotein by Cobas Core immunoenzymatic method

Alpha-fetoprotein (AFP) measurement in amniotic fluid (LAM) samples from pregnant women, between 14 and 21 weeks of pregnancy, allows to detect risks for neural tube defects and others fetal abnormalities. Between december 1999 and december 2000 we measured AFP in 429 amniotic fluids by means of an immunoenzymatic method (AFP-EIA Cobas Core Roche). The results evaluation was by week of pregnancy, with the exclusion of results belonging to fetal abnormality cases. We have therefore established the alfafetoprotein reference range in LAM for the more representative weeks of pregnancy, using median values and multiples of the median (MoM), as shown in following table.

Week of pregnancy	N	Median (UI/L)	0,5 MoM (UI/L)	2,5 MoM (UI/L)	2,5° P.LE (UI/L)	97,5° P.LE (UI/L)
14	26	18360	9180	45900	15369	28970
15	143	18340	9170	45850	10966	27827
16	161	16770	8385	41925	9470	25510
17	70	13510	6755	33775	8372	20627
18	12	10600	5300	26500	8323	15954

RIASSUNTO

La determinazione dell'alfa-fetoproteina (AFP) nel liquido amniotico (LAM) di donne gravide, nel periodo compreso tra la 14^a e la 21^a settimana di gestazione, permette di monitorare il rischio relativo di difetto di chiusura del tubo neurale e altre anomalie fetali. Nel periodo tra dicembre 1999 e dicembre 2000 sono state eseguite 429 determinazioni di AFP nel LAM con il metodo immunoenzimatico AFP-EIA su Cobas Core. I valori riscontrati sono stati classificati secondo la settimana di gravidanza. Dopo l'eliminazione a posteriori dei 9 valori relativi a malformazioni, sono stati calcolati gli intervalli di riferimento per le settimane di gravidanza più rappresentate utilizzando mediana e multipli della mediana (MoM) secondo la seguente tabella:

Settimana di gestazione	N	Mediana (UI/L)	0,5 MoM (UI/L)	2,5 MoM (UI/L)	2,5° P.LE (UI/L)	97,5° P.LE (UI/L)
14	26	18360	9180	45900	15369	28970
15	143	18340	9170	45850	10966	27827
16	161	16770	8385	41925	9470	25510
17	70	13510	6755	33775	8372	20627
18	12	10600	5300	26500	8323	15954

INTRODUZIONE

La determinazione quantitativa dell'alfa-fetoproteina (AFP) nel siero materno, ma ancor più nel liquido amniotico (LAM), è utile nella diagnosi prenatale di alcuni gravi difetti congeniti. Si riscontrano infatti livelli elevati di AFP nell'85-95% dei casi di difetti di chiusura del tubo neurale (anencefalia, encefalocele, onfalocele, gastroschisi, spina bifida) (1;2) e in altre gravi anomalie fetali (atresia duode-

nale, igroma cistico, nefrosi finnica) si riscontrano invece livelli ridotti di AFP nel LAM e nel siero di donne con feti che presentano anomalie quali la trisomia 21 (sindrome di Down) e la trisomia 18 (sindrome di Edwards) (3,4).

L'AFP è una glicoproteina costituita da una singola catena polipeptidica di 591 aminoacidi, con un PM di circa 70000 daltons, strutturalmente ma non antigenicamente simile all'albumina, con migrazione elettroforetica nella regione delle alfa-1-globuline. La sua funzione non è ben

nota. Durante lo sviluppo fetale, a partire dalla 4-5^a settimana di gestazione, essa viene prodotta nel fegato, nella membrana vitellina e, in quantità minime, anche nel tratto gastrointestinale e forse anche dalla placenta. L'AFP ha un'emivita di 4-5 giorni e la sua degradazione avviene principalmente in seguito al processo di deglutizione e digestione fetale.

Mentre nel siero materno l'AFP è apprezzabile significativamente a partire dalla 14^a settimana compiuta e aumenta gradualmente fino al parto, nel LAM essa presenta un picco attorno alla 18^a settimana per poi decrescere gradatamente nelle settimane successive fino al parto, in modo del tutto parallelo alla concentrazione riscontrabile nel siero fetale (5).

Per quanto riguarda la determinazione dell'AFP, sia nel siero materno che nel LAM, esistono problemi di omogeneità e sovrapposibilità dei dati: addirittura anche per uno stesso metodo utilizzato si possono rilevare notevoli discrepanze nei risultati. Nel caso dei reagenti diagnostici da noi utilizzati, due precedenti sperimentazioni indipendenti (dati non pubblicati), avevano prodotto ciascuna un proprio intervallo di riferimento: in un caso i risultati si presentavano più alti, mentre nell'altro caso erano più bassi rispetto a quelli da noi ottenuti. È consigliabile quindi che ogni laboratorio determini il proprio intervallo di riferimento per il metodo analitico utilizzato, oltre che in base alla modalità di conservazione dei campioni ed alla popolazione esaminata (6).

Scopo del nostro lavoro è stato quello di costruire gli intervalli di riferimento dell'AFP nel LAM per le diverse settimane di gestazione (dalla 14^a alla 21^a) (7,8) con l'utilizzo del metodo immunoenzimatico AFP-EIA su strumentazione Cobas Core.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 429 campioni di LAM prelevati per amniocentesi da altrettante pazienti che erano seguite come gravidanze a rischio (età e segni ecografici attuali per aumentato rischio di cromosomopatie, tri-test positivo, precedenti cromosomopatie fetali) e visitate periodicamente presso l'ambulatorio della Divisione di Ostetricia e

Ginecologia dell'Ospedale di Niguarda. I campioni sono stati ottenuti nell'intervallo di circa 1 anno (dicembre 1999-dicembre 2000) e raccolti con frequenza settimanale. Sul campione di LAM raccolto in provette senza anticoagulante veniva quindi misurata in giornata la concentrazione di AFP, previa diluizione del campione 1:100 con il diluente fornito con il kit.

Tutti i campioni sono stati classificati in base alle settimane compiute di gestazione (dalla 14^a alla 21^a).

Nel corso dello studio sono stati osservati nove casi di malformazioni fetali: i valori corrispondenti sono stati esclusi dalla successiva analisi statistica.

Metodo analitico

Il metodo utilizzato è l'AFP-EIA (Roche, art.0734365) applicato sull'analizzatore Cobas® Core (Roche). Si tratta di un esame immunoenzimatico "one step" in fase solida, basato sulla tecnica sandwich. Il test utilizza anticorpi monoclonali di topo specifici per l'AFP umana. I campioni vengono incubati in un'unica fase con granuli ricoperti di anticorpi anti-AFP e con un secondo anticorpo monoclonale anti-AFP legato covalentemente alla perossidasi di rafano in fase liquida. Nel corso dell'incubazione, l'AFP presente nel campione reagisce contemporaneamente con l'anticorpo del granulo e con l'anticorpo coniugato, formando il sandwich. Dopo una fase di lavaggio, i granuli vengono incubati con una soluzione di substrato dell'enzima (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina): l'intensità della colorazione sviluppata dalla reazione enzimatica viene letta a 450 nm.

La concentrazione di AFP nei campioni è interpolata dalla curva di calibrazione di standard di AFP umana (0, 10, 100, 200 UI/ml).

Statistica

La distribuzione dei risultati per settimana di gestazione è stata descritta con statistica non parametrica (mediana, 2,5° e 97,5° percentile), mentre per gli intervalli di riferimento è stato adottato il criterio dei multipli della mediana (MoM): 0,5 MoM e 2,5 MoM.

Tabella 1

Concentrazioni di AFP nel LAM dalla 14a alla 21a settimana di gestazione

settimana di gestazione	n	mediana*	0,5 MoM*	2,5 MoM*	2,5° p.le*	97,5° p.le*
14	26	18360	9180	45900	15369	28970
15	143	18340	9170	45850	10966	27827
16	161	16770	8385	41925	9470	25510
17	70	13510	6755	33775	8372	20627
18	12	10600	5300	26500	8323	15954
19	3	8050	4025	20125	6825	9038
20	3	6280	3140	15700	4827	7819
21	2	5075	2538	12688	4681	5469

*i valori indicati sono espressi in UI/L
MoM = multipli della mediana

RISULTATI

La tabella 1 riporta per ciascuna settimana di gravidanza (dalla 14^a alla 21^a), i valori dell'AFP ottenuti nel LAM con la relativa numerosità dei campioni, la mediana, i multipli della mediana (0,5 MoM e 2,5 MoM) e i valori del 2,5° e 97,5° percentile.

La figura 1 descrive i dati nelle diverse settimane di gravidanza secondo i parametri statistici della mediana, 2,5° e 97,5° percentile. L'analisi delle curve mostra un andamento decrescente dei valori tra la 16^a e la 18^a settimana, in accordo con i dati della letteratura.

La figura 2 descrive le curve di normalità dell'AFP nel LAM nelle diverse settimane di gravidanza, utilizzando il criterio (clinico) dei MoM: 0,5 MoM come limite inferiore e 2,5 MoM come limite superiore.

DISCUSSIONE

La concentrazione di AFP nel LAM è il risultato dei processi di organogenesi e di maturazione fetale che si realizzano nel corso della gravidanza. Nelle prime settimane di gravidanza gli alti livelli di AFP sono dovuti al rilascio

della proteina nella cavità amniotica da parte dell'embrione e alla sua mancata clearance. Man mano che l'organogenesi si conclude e i sistemi fetali si stabilizzano, la concentrazione di AFP nel LAM continua a diminuire.

Il riscontro di alti livelli di AFP nel LAM denota difetti o ritardi della maturità fetale come mancata chiusura del tubo neurale e la non completa organizzazione parenchimale degli organi produttori di AFP, che quindi continua ad essere riversato nel liquido amniotico (7).

La concentrazione di AFP nel LAM è un indicatore di "rischio forte" relativo a difetti del tubo neurale e altre anomalie congenite, che necessita poi comunque di una valutazione morfologica fetale di II° livello. Un prerequisito essenziale per il laboratorio è disporre degli intervalli di riferimento ottenuti con il metodo analitico impiegato per la determinazione dell'AFP, per le diverse settimane di gestazione.

La nostra valutazione relativa ai campioni di liquido amniotico raccolti nel periodo di circa 1 anno ci ha consentito di determinare gli intervalli di riferimento con il metodo immunoenzimatico AFP-EIA su Cobas Core.

I valori di AFP nel LAM per settimana di gestazione non hanno una distribuzione normale; si impiegano quin-

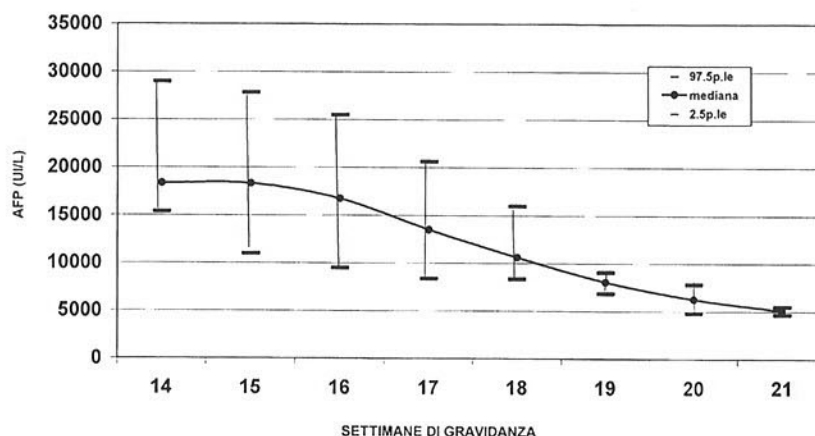


Figura 1

Intervalli di riferimento di AFP nel liquido amniotico; mediana, 2,5° e 97,5° percentile

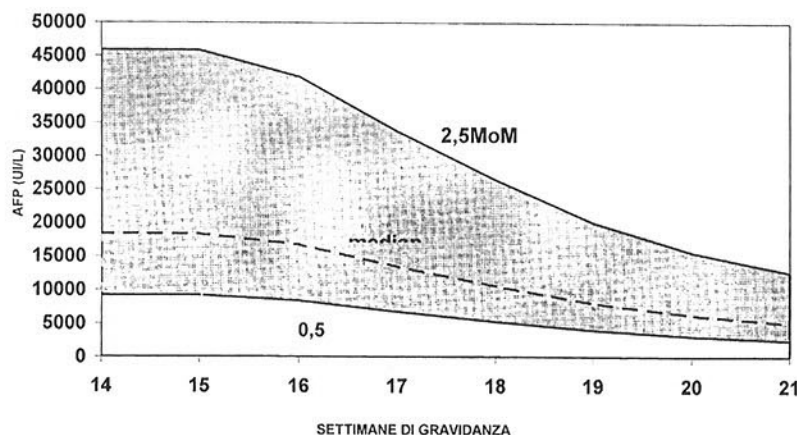


Figura 2

Intervalli di riferimento di AFP nel LAM: 0,5-2,5 MoM

di la mediana e i percentili per descrivere la distribuzione dei dati. Inoltre come intervalli di riferimento clinici nel LAM vengono impiegati parametri più arbitrari, quali i multipli della mediana (MoM). In letteratura sono stati proposti valori compresi tra 0,5 e 2,0 o maggiori di 2,0 MoM (9,10). Dagli studi di Crandall (11) è emerso che usando un cut-off maggiore o uguale a 2,0 MoM la probabilità di diagnosticare difetti di chiusura del tubo neurale era del 95%, per l'anencefalia e la spina bifida era del 100%, mentre per l'encefalocele era del 78%. In base a studi successivi di Crandall (12) i risultati maggiori a 2,0 MoM che hanno dato luogo a casi di anomalie fetali sono stati suddivisi in 3 gruppi: quelli "leggermente superiori" (tra 2,0 e 4,9 MoM) avevano sensibilità diagnostica del 25%, quelli "moderatamente superiori" (tra 5,0 e 9,9 MoM) dell'88% e infine quelli "molto elevati" (maggiori o uguali a 10,0 MoM) del 98%.

Secondo Goldstein il valore predittivo di un test negativo (<2,0 MoM dell'AFP nel LAM è approssimativamente il 97%; mentre il valore predittivo di un test positivo, in aggiunta all'analisi della colinesterasi, consente la diagnosi del 99% dei difetti del tubo neurale (13).

In base alle Raccomandazioni Internazionali NCCLS solo il 2% delle donne normali ha valore di AFP maggiori di 2,5 MoM nel LAM (14).

Ci è sembrato quindi ragionevole adottare come intervallo di riferimento dei valori di AFP nel LAM tra la 14^a e la 21^a settimana di gravidanza i valori compresi tra 0,5 e 2,5 MoM. Dei nove valori relativi a malformazioni che abbiamo escluso dal calcolo degli intervalli di riferimento, uno era relativo alla sindrome di Edwards, otto alla sindrome di Down. Di questi otto, due erano inferiori a 0,5 MoM, gli altri 6 invece erano normali, pur collocandosi nella parte bassa del nostro intervallo di riferimento.

L'intervallo di riferimento che abbiamo scelto per ciascuna settimana (dalla 14^a alla 18^a) risulta abbastanza ampio rispetto ai percentili, ma sufficientemente ristretto da non includere eventuali difetti di chiusura del tubo neurale ed altre anomalie.

Per quanto riguarda il periodo successivo alla 18^a settimana la scarsità dei nostri dati non ci consente di stabilire intervalli di riferimento affidabili.

L'accuratezza diagnostica delle patologie fetali è sensibilmente aiutata da indicatori di "rischio forte" come la

concentrazione di AFP nel LAM. L'uso di precise curve di riferimento per le diverse settimane di gestazione costruite sulla popolazione di donne gravide afferenti all'ambulatorio del Centro di Diagnosi Prenatale permette al laboratorio di fornire un valido presidio alla diagnosi.

BIBLIOGRAFIA

1. Brock DJK. Alfa-fetoprotein in antenatal diagnosis on anencephaly and spina bifida. *Lancet* 1972; 2:197.
2. Wenstrom KD, Owen J, Davis RO, Brumfield CG. Prognostic significance of unexplained elevated amniotic fluid alpha-fetoprotein. *Obstet Gynaecol* 1996; 87(2):213-6.
3. Merckatz IR. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynaecol* 1984;148:886.
4. Spencer K, Muller F, Aitken DA. Biochemical markers of trisomy 21 in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1997; 17 (1): 31-7.
5. Burtis CA and Ashwood ER. *Tietz textbook of Clinical Chemistry*. 2nd edition. Saunders WB Company ed. 1994;2119-23.
6. Monti E., Centini G, Landi D, Pecciarini L et al. Normal range of alpha-fetoprotein in amniotic fluid and maternal plasma. *Minerva Gynaecol* 1987;39:315-20.
7. Wathen NC, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T., Alphafetoprotein levels in amniotic fluid from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:380-2
8. Maestri D, Sanseverino MT, Cheinquer N, Correa MC. Alpha-fetoprotein: normal values in amniotic fluid between 14 and 21 weeks. *Rev Assoc Med Bras* 1998; 44:273-6.
9. Palomaky GE, Knight GJ, Haddow JE. (Letter). Calculating amniotic fluid alpha-fetoprotein median values in the first trimester. *Prenat Diagn* 1993;13:887-9.
10. Crandall BF, Matsumoto M. Risks associated with an elevated amniotic fluid alpha-fetoprotein level. *Am J Med Genet* 1991; 39 (1):64-7.
11. Crandall BF, Chua C. Detecting neural tube defects by amniocentesis between 11 and 15 weeks gestation. *Prenat Diagn* 1995; 15(4):339-43.
12. Crandall BF, Chua C. Risks for fetal abnormalities after very and moderately elevated Af-AFPs. *Prenat Diagn* 1997; 17(9):837-41.
13. Goldstein RB and Caponigro M. The role of sonography in the evaluation of pregnant women with high maternal serum alpha-fetoprotein. *Applied Radiology* 2001(3): 9-18.
14. NCCLS 1981. Guidelines to assist the quality of systems for AFP assay in prenatal diagnosis. Committee report 1981;3:57-100.