



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی و  
میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه ایمونولوژی

جلسه هشتم:  
تست  $\beta$ HCG

1

تهیه کننده: سهیلا عباسی

# تست HCG $\beta$

✓متداولترین، آسانترین، ارزانتترین و سریعترین روش تشخیص حاملگی، جستجوی هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (HCG: Human Chorionic Gonadotropin) در ادرار، با استفاده از روشهای سرولوژی می باشد.

✓هورمون HCG در دوران حاملگی، توسط سلولهای Syncytiotrophoblast جفت (Placenta) تولید شده و در سرم و ادرار قابل تشخیص است. این هورمون ۳ تا ۵ روز بعد از لقاح در سرم و ۷-۱۴ روز بعد از عقب افتادن عادت ماهانه (Menstrual cycle) در ادرار بانوان باردار قابل تشخیص است، و حدود دو هفته پس از زایمان طبیعی، در سرم ناپدید شده و قابل تشخیص نمی باشد.

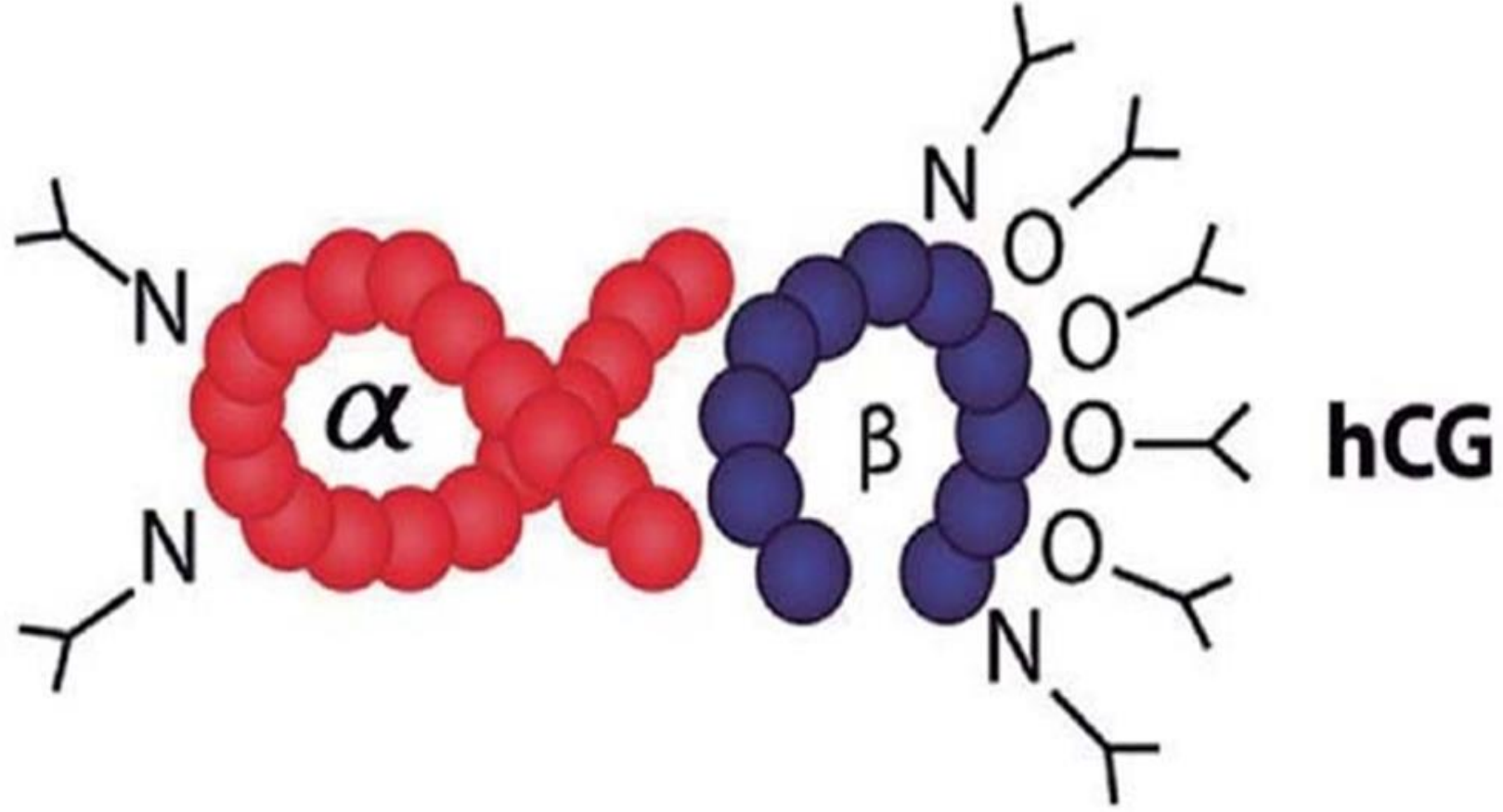
## Human Chorionic Gonadotropin(HCG)

• HCG هورمونی گلیکوپروتئینی است که که از سلول های تروفوبلاستیک جنینی تولید و ترشح می گردد و از دو زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$  تشکیل یافته است. زنجیره  $\alpha$  در هورمون های FSH, LH, TSH و HCG مشابه بوده ولی زنجیره  $\beta$  این هورمون ها اختلافات زیادی با هم دارند. و لذا جهت تشخیص این هورمون از همدیگر بهتر است از زنجیره  $\beta$  استفاده گردد.

## Human Chorionic Gonadotropin(HCG)

✓ گونادوتروپین جفتی انسانی در سال ۱۹۱۲ توسط آختر کشف شد. این هورمون موجب تداوم تولید پروژسترون در هفته های اول حاملگی می گردد.

✓ ما امروزه به HCG به صورت یک گروه ملکولی با ساختار مشابه نگاه می کنیم که همگی بوسیله آزمون HCG سرمی و ادرار در آزمایشگاه و یا توسط آزمونهای حاملگی که در خانه بر روی ادرار انجام میشود قابل شناسایی هستند.



از ملاقات اسپرم و اوول تخمک لقاح پیدا میکند. تخمک لقاح یافته به طرف رحم رفته و در جدار آن لانه گزینی می کند. بین ۱۰-۳ روز بعد جفت تشکیل می شود HCG. هر دو بخش آلفا و بتا توسط سلولهای تروفوبلاستیک جفت سنتز می شود و نیمه عمر آن ۱۲ - ۳۶ ساعت است. مهمترین وظیفه این هورمون نگه داری از جسم زرد است که تولید استرادیول و پروژسترون می کند. مقدار این هورمون در حاملگی طبیعی از روز ششم تا دهم بعد از لقاح در سرم مادر بالا می رود ( حتی گاه از روز سوم لقاح هم قابل شناسایی است). معمولا ۳۵-۴۱ روز پس از آخرین قاعدگی ( و نه زودتر از آن ) مقدار این هورمون در ادرار مادر به اندازه ای میرسد که قابل اندازه گیری باشد.



Trophoblastic cells



HCG

Beta HCG

Alpha unit

Beta unit



Detect Pregnancy

## HCG Ranges

- 3 weeks since LMP: 5 - 50 mIU/ml
- 4 weeks since LMP: 5 - 426 mIU/ml
- 5 weeks since LMP: 18 - 7,340 mIU/ml
- 6 weeks since LMP: 1,080 - 56,500 mIU/ml
- 7 – 8 weeks since LMP: 7,650 - 229,000 mIU/ml
- 9 – 12 weeks since LMP: 25,700 - 288,000 mIU/ml
- 13 – 16 weeks since LMP: 13,300 - 254,000 mIU/ml
- 17 – 24 weeks since LMP: 4,060 - 165,400 mIU/ml
- 25 – 40 weeks since LMP: 3,640 - 117,000 mIU/ml
- Non-pregnant females: <5.0 mIU/ml
- Postmenopausal females: <9.5 mIU/ml





## از تست HCG در موارد زیر استفاده می شود:

- ✓ اثبات بارداری در سه ماهی اول حاملگی
- ✓ برای تعیین خطر سقط جنین در سه ماهی اول بارداری
- ✓ اثبات بارداری های خارج رحمی (ECTOPIC)
- ✓ برای تشخیص تومورهای تروفوبلاستیک در حاملگی و برخی از تومورهای در مردان مثلا سرطان پروستات

روشهای مختلف تشخیص و اندازه گیری هورمون HCG

۱- روش ممانعت از آگلوتیناسیون غیر فعال ذرات لاتکس Passive Latex Agglutination Inhibition Test

۲- روش آگلوتیناسیون غیر فعال ذرات لاتکس Reversed Passive Latex Agglutination

۳- روش الیزا ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

۴- روش آر. آی. ای RIA: Radio Immuno Assay (RIA) که حساسترین و دقیق ترین روش است.

در بین چهار روش فوق، روش اول، در آزمایشگاههای تشخیص طبی، بیشترین کاربرد را دارد. که در ادامه، روش انجام آن بطور مفصل بحث می شود.

# روش آگلوتیناسیون غیر فعال ذرات لاتکس

- اساس این روش آگلوتیناسیون Passive است و جهت انجام تست  $50\lambda$  معرف لاتکس HCG (آنتی بادی های اختصاصی علیه زنجیره  $\beta$ HCG که به ذرات لاتکس متصل شده) را به  $50\lambda$  ادرار صبحگاهی فرد در اسلاید سیاه اضافه می کنیم و در صورت وجود  $\beta$  HCG در نمونه آگلوتیناسیون مشاهده و تست  $\beta$  HCG مثبت است ولی در صورت عدم مشاهده تست منفی خواهد بود.

## روش ممانعت از آگلوتیناسیون غیر فعال ذرات لاتکس

- روش ممانعت از آگلوتیناسیون که خود از دو مرحله تشکیل شده است:
- در مرحله اول نمونه سرم یا ادرار صبحگاهی فرد با آنتی ژن اختصاصی علیه زنجیره بتا HCG (Reagent 1) مخلوط می گردد در صورت وجود HCG در نمونه اکتیو سایت های آنتی بادی با HCG اشغال شده و شروع مرحله دوم که عدم مشاهده آگلوتیناسیون دلیل یه مثبت بودن تست حاملگی است.
- اما اگر در مرحله اول نمونه سرم ویا ادرار HCG نباشد اکتیو سایت های آنتی بادی در مرحله اول اشغال نشده و در مرحله دوم با اضافه کردن معرف لاتکس متصل به زنجیره بتا HCG (Reagent 2) آگلوتیناسیون مشاهده خواهد شد. دلیل به منفی بودن حاملگی خواهد بود.

# HCG-LATEX



13

تهیه کننده: سهیلا عباسی

# نمونه های آزمایش:

- ✓ جهت انجام آزمایش، اولین ادرار صبحگاهی که حاوی HCG بیشتری می باشد توصیه می شود.
- ✓ لازم است که نمونه های ادرار در ظروف خشک و تمیز بدون مواد شوینده جمع شوند.
- ✓ بسیار ضروری است که نمونه کاملاً شفاف باشد. مواد نامحلول در نمونه ممکن اسن باعث تداخل در واکنش و ایجاد نتایج کاذب شوند. قویاً توصیه می شود که در صورت نیاز جهت حصول به نمونه کاملاً شفاف ادرار صبحگاهی با دور بالا سانتریفوژ شود.
- ✓ توصیه می شود که نمونه های ادرار بلافاصله بعد از جمع آوری (تهیه) تست شوند یا اینکه در یخچال قرار داده شوند. در این صورت حداقل برای مدت ۲۴ ساعت پایدار خواهند بود. برای مدتهای طولانی تر لازم است که نمونه ها Sodium azide اضافه شود. یا در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شوند.
- ✓ نمونه های فریز شده بایستی کاملاً شفاف باشند. در غیر اینصورت سانتریفوژ نمودن آنها ضروری است.
- ✓ وجود خون یا آلودگی های میکروبی می توانند باعث نتیجه غلط بشوند. در اثر مصرف بعضی از داروها امکان مشاهده نتایج کاذب وجود دارد.

## تست HCG به روش آگلوتیناسیون

این تست کیفی و نیمه کمی بر اساس واکنش ایمنولوژیک بین HCG متصل به ذرات لاتکس و آنتی بادی های مونوکلونال که بر علیه قسمت های خاصی از زنجیر B ساخته شده اند صورت می پذیرد. در این محصول از روش غیر مستقیم جهت بالا بردن حساسیت استفاده شده است. بدین ترتیب اگر غلظت این هورمون حدوداً بیش از ۰/۵ واحد در میلی لیتر ادرار باشد، اتصال آنتی بادی به آنتی ژن متصل به ذرات لاتکس (که سبب آگلوتیناسیون می گردد) صورت نخواهد پذیرفت. عدم آگلوتیناسیون نشان دهنده حاملگی خواهد بود. بر اساس این روش در صورت حاملگی، تست در ۶-۸ روز پس از قطع پریود مثبت می شود.

# روش ممانعت از آگلوتیناسیون غیر فعال ذرات لاتکس

آزمایش، با استفاده از کیت و در دو مرحله انجام می شود. اجزای موجود در کیت عبارتند از:

- ۱- قطره چکان حاوی کنترل مثبت (ادرار شخص حامله)
- ۲- قطره چکان حاوی کنترل منفی (ادرار شخص غیرحامله)
- ۳- قطره چکان حاوی آنتی بادی بر ضد زنجیره بتای هورمون HCG
- ۴- قطره چکان حاوی ذرات لاتکسی که بر روی آنها، زنجیره بتای هورمون HCG متصل شده است.

توجه: معرفها در یخچال (۲ تا ۸ درجه) تا تاریخ انقضاء کیت قابل استفاده خواهند بود.

- سوسپانسیون لاتکس را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید و از انجماد آن جداً و دداری نمایید.
- معرفها حاوی Sodium azide می باشند. در مصرف آنها احتیاط کنید.





## روش آزمایش:

- در انجام آزمایش تعیین حاملگی لازم است که اسلاید و نمونه ادرار به درجه حرارت اطاق رسیده باشند.
- رساندن سوسپانسیون لاتکس و محلول آنتی بادی به درجه حرارت اطاق ضروری می باشد. اسلاید را با آب ولرم بشویید و بلافاصله بخوبی خشک کنید. از نگهداری دراز مدت آن در آب خودداری فرمایید. مراحل زیر را به دقت انجام دهید.

## روش کیفی:

- ۱- ۵۰ میکرولیتر (یا یک قطره، با استفاده از قطره چکان همراه کیت) از نمونه های ادرار را در وسط دایره قرار دهید. سپس یک قطره از محلول آنتی بادی را در حالیکه ویال حاوی این معرف به حالت عمودی نگهداری شده است، در کنار آن ها بچکانید.
- ۲- با استفاده از همزن پلاستیکی، قطرات را طوری مخلوط نمایید تا کاملاً سطح داخلی دایره را پوشانده و حداقل برای مدت ۳۰ ثانیه بصورت دورانی در دست یا با استفاده از روتاتور حرکت دهید.
- ۳- سوسپانسیون لاتکس را به آرامی تکان دهید و یک قطره از آن را به هر یک از نمونه ها بچکانید.
- ۴- با استفاده از همزن پلاستیکی، قطرات را مخلوط نموده و در سطح دایره ها پخش نمایید.
- ۵- اسلاید را مجدداً بطور دورانی برای مدت ۲ دقیقه حرکت دهید.



20

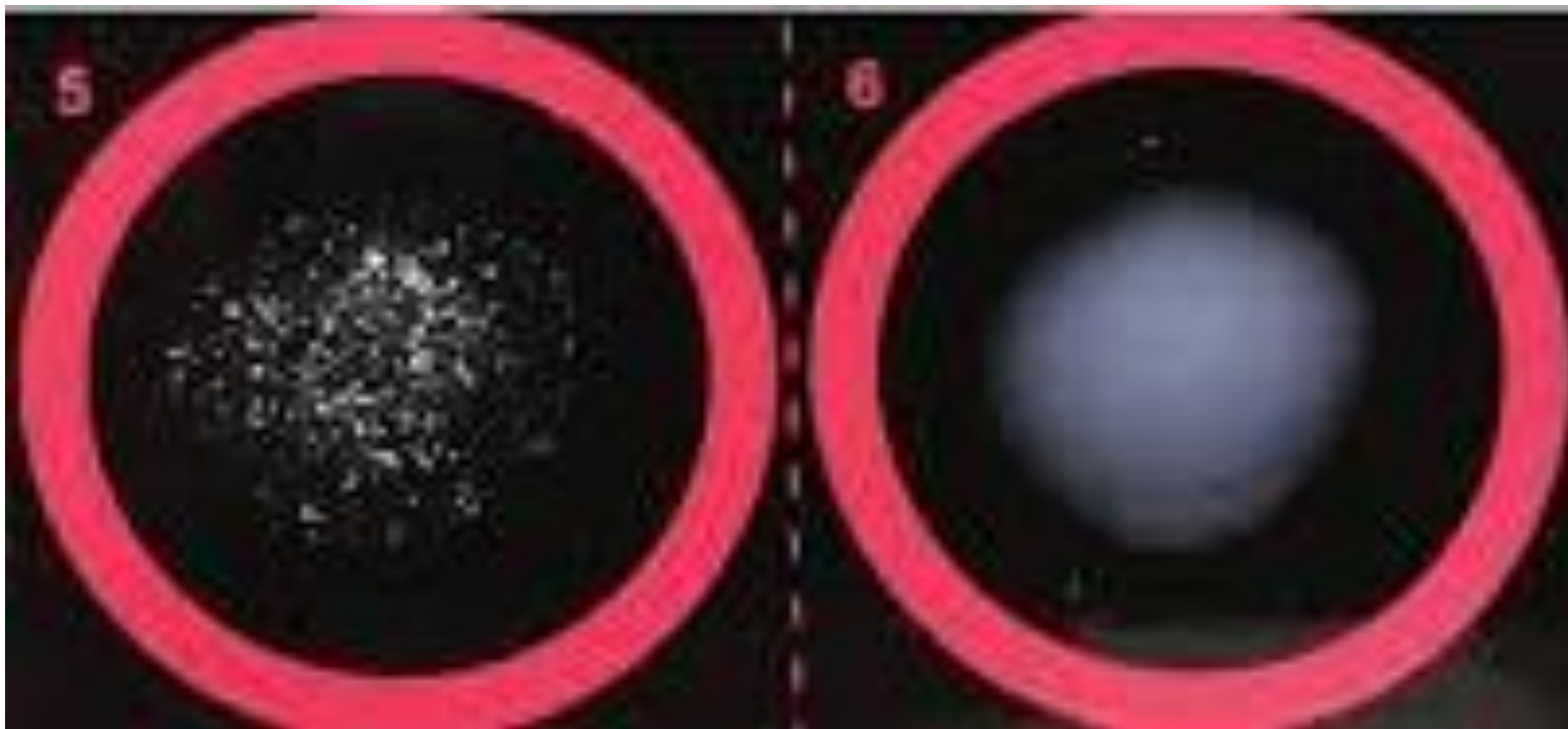
تهیه کننده: سهیلا عباسی

## ادامه روش کیفی

پس از این مدت در قطره مربوط به کنترل مثبت، ذرات آگلوتینه مشاهده نمی شود ولی در قطره مربوط به کنترل منفی، ذرات آگلوتینه مشاهده خواهد شد. در نمونه ادرار مورد آزمایش، اگر ذرات آگلوتینه مشاهده شد، نشان دهنده عدم وجود هورمون HCG در نمونه ادرار، و حامله نبودن شخص است. ولی اگر ذرات آگلوتینه مشاهده نشد، نشان دهنده وجود هورمون HCG در نمونه ادرار، و حامله بودن شخص است.

- میزان آگلوتیناسیون را بصورت زیر گزارش کنید:

- بدون آگلوتیناسیون و کاملاً شیری منفی (حاملگی مثبت)
- آگلوتیناسیون مشخص مثبت (حاملگی منفی)
- آگلوتیناسیون ضعیف (مشکوک)



22

تهیه کننده: سهیلا عباسی

## روش نیمه کمی:

- ۱- برای هر نمونه ادرار، ۶ عدد لوله آزمایش را با شماره های ۱ تا ۶ علامت گذاری کنید.
- ۲- ۰/۵ میلی لیتر PBS یا سرم فیزیولوژی را به لوله شماره ۱ و ۰/۲ میلی لیتر از آن را به لوله های ۲ تا ۶ اضافه کنید.
- ۳- به لوله شماره ۱) ۰/۵ میلی لیتر از ادرار مورد آزمایش اضافه نمایید و تکان دهید تا مخلوط شود.
- ۴- ۰/۲ میلی لیتر از محلول شماره ۱ را به لوله شماره ۲ اضافه کنید و بعد از مخلوط کردن این عمل را برای لوله های دیگر بطور سریال تکرار نمایید (۲ به ۳ ...).
- ۵- هر کدام از نمونه های رقیق شده را بر اساس روش کیفی فوق بررسی کنید و از اطلاعات زیر جهت مشخص کردن مقدار نیمه کمی هورمون HCG استفاده نمایید (به عنوان مثال، اگر اگلوتیناسیون در نمونه اولیه که ۳۲ برابر رقیق شده است دیده نشود، نمونه حدوداً حاوی ۲۴ واحد از HCG در میلی لیتر خواهد بود).

غلظت تقریبی HCG (Iu/ml)	• رقت نمونه ادرار
۵/۱	• ۱:۲
۳	• ۱:۴
۶	• ۱:۸
۱۲	• ۱:۱۶
۲۴	• ۱:۳۲
۴۸	• ۱:۶۴

# 24

تهیه کننده: سهیلا عباسی



## روش کمی

گاهی اوقات لازم است مقدار نسبی هورمون HCG را در ادرار محاسبه نمود. بدین منظور می بایست ابتدا، نمونه ادرار را در لوله های آزمایش، با سرم فیزیولوژی، به ترتیب ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و غیره رقیق کرد. سپس از هر کدام از لوله ها یک قطره برداشته و بر اساس روش کیفی که در بالا توضیح داده شد، برای وجود یا عدم وجود هورمون HCG بررسی کرد. آخرین قطره ای که در آن آگلوتیناسیون مشاهده نشود بعنوان تیترا هورمون HCG آن ادرار در نظر گرفته می شود. در نهایت مقدار هورمون HCG از فرمول زیر محاسبه می شود.

$$V * D * S \bullet$$

$V$ (Volume): حجم ادرار بر حسب میلی لیتر،  
 $D$ (Denominator): مخرج کسر تیتر  
هورمون،  $S$  (Sensitivity): حساسیت کیت

همچنین برای محاسبه مقدار هورمون HCG در ادرار ۲۴ ساعته، کافیست ادرار ۲۴ ساعته را در یک ظرف تمیز جمع آوری کرده و در فرمول فوق به جای  $V$  عدد مربوط به حجم ادرار ۲۴ ساعته را قرار دهید.

## نکته ها

بهترین نمونه برای روش لاتکس، نمونه ادرار اول صبح است، چرا که در طول شب کمتر مایعات مصرف می شود و بنابراین ادرار غلیظ بوده و غلظت مواد موجود در آن، تقریباً برابر غلظت آنها در سرم می باشد.

واژه هایی چون گراویندکس، تست حاملگی و یا پرگنسی (Pregnancy) ، همگی به معنای آزمایش تشخیص حاملگی می باشد.

✓ به جز در حاملگی، در موارد دیگر مثل موارد زیر نیز، تیتراژ  $\beta$  HCG افزایش می یابد

✓ مول هیداتیدفرم

✓ نئوپلاسم تروفوبلاستیک حاملگی (کوریو کارسینوما بدون تایید هیستولوژیک) و کوریو کارسینوما

28

تهیه کننده: سهیلا عباسی

با تشکر از حسن  
توجه شما