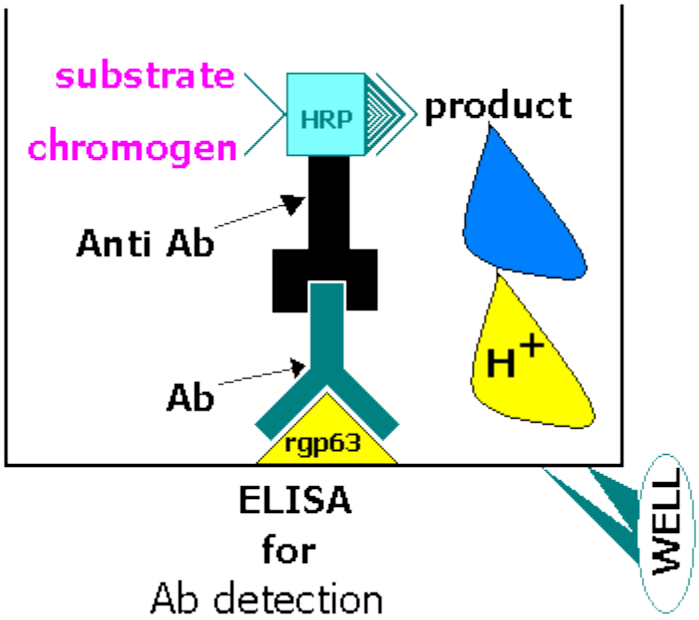
الایزا

- روش و تکنیک ها
- عوامل ایجاد کننده خطا و مشکلات احتمالی

ELIZA : Enzyme-Linked Immunesorbent Assay



الایزا یک روش آزمایشگاهی بیوشیمیایی ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به صورت همزمان فراهم می کند و روشی برای پی بردن به اختلالات سیستم ایمنی است تا حضور آنتی‌ژن یا آنتی بادی در یک نمونه را بررسی نماید این تکنیک در پزشکی و پاتولوژی گیاهان و در کنترل کیفی صنایع خصوصا صنایع غذایی کاربرد دارد در یک تعریف ساده ELISA مقدار آنتی ژن فیکس شده در سطح یک ظرف یا پلیت است که سپس با یک آنتی بادی خاص که روی سطح ریخته می شود به آنتی ژن متصل می شود . این آنتی بادی متصل به یک آنزیم است و در مرحله نهایی ، ماده ای به ظرف اضافه می شود که آنزیم بتواند برخی سیگنال های قابل تشخیص را مثل تغییر رنگ با یک ماده شیمیایی ایجاد نماید

همچنین آنتی بادی‌هایی که در پاسخ به برخی عفونت‌ها یا بیماری‌ها به‌وجود آمده نیز توسط این تست قابل تشخیص هستند. تست ELISA اولین آزمایش متداول در غربال‌زنی HIV است. در تست ELISA سرم فرد ۴۰۰ بار رقیق شده و به صفحه ای

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

که حاوی آنتی‌ژن HIV است اضافه می‌شود. اگر آنتی بادی HIV در سرم وجود داشته باشد، به این آنتی‌ژن های HIV می چسبد. سپس به منظور از بین بردن دیگر اجزا سرم، پلیت شستشو داده می شود. یک "آنتی بادی ثانویه" ساخته شده مخصوص (یک آنتی بادی چسبیده به آنتی بادی دیگری) به پلیت اعمال شده و شستشوی دیگری انجام می‌شود. این آنتی بادی ثانویه به صورت شیمیایی به آنزیم از پیش تهیه شده می‌چسبد. این‌بار زیر لایه ای برای آنزیم اعمال شده و توسط آنزیم کاتالیز می‌شود که منجر به تغییر رنگ در فلورسانس می شود.

با استفاده از روش ELISA چه چیزی تست می شود ؟

استفاده از روش ساندویچ انتخاب خوبی است برای یک پروتئین که با اپی توپ های متعدد شناسایی شده است،. این حالت معمولا نیاز به دو آنتی بادی دارد که با اپی توپ های مختلف واکنش نشان می دهند. با این حال، اگر مولکول دارای چندین اپی توپ تکراری باشد ممکن است با استفاده از روش ساندویچ از آنتی بادی یکسان برای هر دو جذب و تشخیص استفاده شود.

روش دیگر، اگر یک منبع آنالیت دیگر برای شناسایی به شکل استخراج شده وجود داشته باشد که توانایی جذب در یک microwell را دارد، پس از آن با استفاده از روش های رقابتی می تواند روشی را راه اندازی نماید که که در آن آنالیت استخراج شده بی حرکت و آنالیت در نمونه برای اتصال به آنتی بادی برچسب دار شده رقابت ایجاد نماید

تست الایزا را در حالت معمول برای ردیابی آنتی ژن یا آنتی بادی بکار می برند بدین ترتیب که یکی از این دو ماده در بستر جامد ثابت می شود و برای ردیابی دومی بکار گرفته می شود، اما اساسا برای ردیابی هر جفت ماده ای که مثل جفت آنتی ژن و آنتی بادی به هم گرایش داشته و قدرت اتصال مناسبی نسبت به هم دارند میتواند بکار گرفته شود (مثلا لکتین به لیگاند مربوطه اش یا مولکول به گیرنده اختصاصی اش) البته این پدیده یعنی اتصال بین دو ماده ای که آنتی بادی و آنتی ژن نیستند اما گرایش به هم دارند اغلب اوقات مشکل آفرین است و برای بالا بردن حساسیت و اختصاصیت اتصال بین آنتی بادی و آنتی ژن در الایزا باید این اتصالات ناخواسته را به طریقی مهار کرده و یا کارهای جبرانی لازم را در نظر گرفت.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

الایزا ترکیبی از آنتی بادی های اختصاصی با حساسیت بالاست بوسیله آنتی بادی ها یا آنتی ژن ها جفت شده به راحتی تشخیص داده می شوند . الایزا می تواند با سنجش مفید، غلظت آنتی ژن یا آنتی بادی را انجام دهد ۲ روش متفاوت وجود دارد

تست ELISA با روش‌های گوناگونی انجام می‌شود که که به صورت کلی به دو دسته ELISA مستقیم و غیر مستقیم تقسیم بندی می‌شود.: الایزایی که برای تشخیص حضور آنتی ژن ها می تواند به کار رود که بوسیله آنتی بادی شناسایی را انجام می دهد یا آن می تواند آزمایش کند آنتی بادی هایی که آنتی ژن ها را شناسایی می کنند در الایزای عمومی ۵ مرحله وجود دارد

۱- دیواره پلیت ها با آنتی ژن ها کد شده است

۲- مسدود کردن تمام نواحی باند نشده برای جلوگیری از جواب های مثبت منفی

۳- اضافه کردن آنتی بادی اولیه (برای مثال آنتی بادی مونوکلونال خرگوشی) به چاهک ها

٤- اضافه کردن آنتی بادی ثانویه جفت شده با آنزیم (مثل anti IgG موشی) به چاهک ها

٥- واکنش سوبسترا با آنزیم و تولید رنگ بنابراین مشخص شدن واکنش های مثبت

مراحل انجام یک آزمون ELISA که تقریبا در تمام انواع آن مشترک است عبارت است از:

۱) پوشش دهی، که به معنی جذب یک آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی با سطوح جامد است.

۲) اضافه کردن نمونه‌های مورد آزمایش.

۳) گذشت مدت زمان کافی برای انجام واکنش که به اصطلاح انکوباسیون واکنشگرها نامیده می شود.

۴) انجام عمل شستشو توسط واشر ELISA ، به منظورجدا کردن واکنشگرهای متصل شده و واکنش داده از واکنشگرهای آزاد و متصل نشده .

۵) اضافه عوامل لینک شده با آنزیم.

۶) مجددا طی مدت زمان انکوباسیون برای واکنشگرها .

۷)استفاده مجدد از واشر ELISA جهت انجام عمل شستشو .

۸) افزودن زیرلایه آنزیم جهت تشخیص واکنش دهنده‌ها.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

۹) طی زمان انکوباسیون.

۱۰) اتمام واکنش آنزیمی توسط متوقف کننده‌ها و خوانش دانسیته نوری به دست آمده توسط خواننده

مراحل ELISA

۱- فاز جامد میکرو پلیت هایی هستند که به طور تجاری در دسترس می باشند ۸*۱۲ خانه دارند

۲- مرحله جذب سطحی : در این پروسه آنتی بادی یا آنتی ژن که بصورت محلول در یک بافر قرار دارد اضافه می شود سپس به طور تهاجمی به فاز جامد در حالت انکوبه حمله می کند در واقع عدم حرکت آنتی بادی یا آنتی ژن در فاز ثابت عامل اصلی موفقیت واکنش در ELISA است

۳- مرحله شستشو : چاهک ها پر از محلول های بافری می شوند و خالی می شوند برای جدا شدن اتصالات و غیر اتصالات یا آنتی بادی ها یا آنتی ژن های آزاد در پلیت های الایزا ، این مرحله نقش مهمی را در واکنش ها بازی می کند.

۴- آنتی ژن ها : یک پروتئین یا کربوهیدرات است که وقتی به حیوانات تزریق می شود تولید آنتی بادی می کند بنابراین آنتی بادی ها به طور اختصاصی با آنتی ژن ها واکنش می دهند و می توان از آنها برای تشخیص آنتی ژن ها استفاده نمود

۵- آنتی بادی : تولیداتی که در پاسخ به آنتی ژن ها ایجاد می شوند از جنس پروتیئن هستند

۶- آنزیم : ماده ای که می تواند با یک غلظت پایین واکنش دهد مثل کاتالیز کردن واکنش های اختصاصی .چندین آنزیم اختصاصی به طور روتین در الایزا بکار می روند

۷- آنزیم های کانجوگیت : آنزیم هایی که به طور تغییر ناپذیری به واکنش های مخصوصی حمله می کنند این واکنش ها سیگنالهایی مثل تغییر رنگ که قابل خوانش است ایجاد می کنند (به طور مستقیم مثل تغییر رنگ ماده یا غیر مستقیم بوسیله تاثیر روی یک ماده شیمیایی دیگر)

۸- توقف : پروسه توقف فعالیت آنزیم روی یک ماده .این مرحله تاثیر روی توقف تغییرات رنگی بعدی در ELISAدارد

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

۹- خوانش: اندازه گیری رنگ تولید شده در ELISA . این کمیت بوسیله خوانش اختصاصی در اسپکتوفتومتری در ولتاژ مخصوص برای رنگ های خاص بدست آمده با آنزیم های خاص انجام می شود این تست ها می تواند بوسیله چشم تشخیص داده شود

چه نوع از روش های ELISA ممکن است به کار رود ؟

الایزای مستقیم: در این الایزا آنتی ژن ها به فاز جامد متصل شده اند و آنزیم ها به آنتی بادی لیبل شده اند این نوع از روش ها به طور کلی در اندازه گیری نمونه های سخت دشوار است، از آنجا که پروتئین های آلوده برای نواحی های اتصال پلاستیکی با هم رقابت دارند

الایزای غیر مستقیم : در این الایزا آنتی ژن ها به فاز جامد متصل شده اند اما در این مورد آنتی بادی اولیه لیبل ندارد وآنزیم کونجوگیتو بعنوان آنتی بادی ثانویه به طور مستقیم به آنتی بادی اولیه وصل می شوند این شکل اغلب به کار می رود

این روش برای تعیین آنتی بادی اختصاصی و یا تیتراسیون آنتی بادی در نمونه های سرم مورد استفاده قرار می گیرد . اساس آزمایش بدین نحو است که معمولاً سرم رقیق شده به آنتی ژن های کوت شده در فاز جامد (میکروول یا چاهک) اضافه می شود . آنتی ژن کوت شده آنتی ژن اختصاصی مربوط به آنتی بادی است که قرار است در نمونه رد یابی شود ، پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود بر حسب اینکه چه کلاسی از آنتی بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع آنتی هیومن مورد استفاده نیز متفاوت است مثلاً برای ردیابی آنتی بادی کلاس IgG از آنتی هیومن IgG و برای ردیابی کلاس IgA از آنتی هیومن IgA استفاده می شود . بهترین مثالها در مورد این روش تعیین آنتی بادی بر علیه توکسوپلاسما ، روبلا ، ویروس سیتومگال و هلیکوباکتر پیلوری از کلاس IgM ، IgA و IgG در سرم می باشد .

الایزای رقابتی : این سومین نوع الایزا از روش رقابتی استفاده می کند در این روش به طور همزمان آنتی بادی ها یا پروتئین ها رقابتی اضافه می شود . کاهش در سیگنال نمونه ها جایی که آنتی بادی یا پروتئین دوم نتایج اختصاصی بالایی می دهد روش های

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

رقابتی نیز بر پایه رقابت دو آنتی ژن یا دو آنتی بادی برای اتصال لیگاند با مقدار محدود استوار است. اگر اضافه کردن هردو آنالیت به سیستم همزمان انجام شود، روش را رقابتی می نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره زمانی انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهاری می نامند.

ساندویچ الایزا : آخرین نوع روشی است که به کار می رود اتصال آنتی بادی ها به فاز جامد حمایت می شود نمونه ها حاوی آنتی ژن های شناخته شده یا ناشناخته هستند سپس بافر یا ماتریکسی اضافه می شود که اتصالات را به فاز جامد به حداقل رسانده اند آنزیم های لیبل شده به آنتی بادی ها سپس برای تشخیص اضافه می شوند . روش ساندویچ که متداول‌ترین روش ELISA است، یک آنتی ژن در بین دو آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد.

۱- کد کردن پلیت های الایزا با آنتی بادی و انکوبه کردن یک شب در ۴ Ċ
۲- شستشوی چاهک پلیت با آب دوبار تقطیر و PBS و تریتون برای ۲ بار
۳- مسدود کردن باند های غیر اختصاصی با استفاده از 1% BSA/PBS و انکوبه برای ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای اتاق
۴- شتشوی پلیت ،اضافه کردن استانداردها و 100ul نمونه محلول متناسب با چاهک ها
۵- انکوبه ۱ ساعت در دمای اتاق و شستشو
۶- اضافه کردن 100ul آنتی بادی ثانویه جفت شده با آلکالین فسفاتاز (AP) یا HPR و انکوبه برای ۱ ساعت و شستشو
۷- اضافه کردن 100ul سوبسترا به چاهک و انکوبه در دمای اتاق برای ۱ ساعت (افزودن محلول متوقف کننده)
۸- خوانش پلیت ها روی الایزا میکروپلیت ریدر

بهترین نتیجه از روش ساندویچ بدست می آید روش ساندویچ الایزا خود به دو دسته تقسیم می شود :

الف) روش Ag Capture یا Ab sandwich :

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

در این روش یک آنتی ژن در بین دو آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد ، این روش شایع ترین روش الایزا محسوب می شود ، در این روش از یک آنتی بادی برای به دام انداختن آنتی ژن بر روی چاهک های الایزا استفاده می شود و آنتی بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده است به عنوان شناساگر عمل می کند . قابل ذکر است که در این روش آنتی ژن باید دارای دو ناحِیه آنتی ژنیک

متفاوت باشد تا قادر به اتصال به هر دو آنتی بادی باشد ، مثال های بارز این روش اندازه گیری ، TSH، LH، FSH، PSA ، HCG و ...

ب) روش Antibody Capture :

- ·Ag Sandwich or Direct Ab Capture :

این روش برای تعیین سنجش آنتی بادی مورد استفاده قرار می گیرد بدین صورت که از یک آنتی ژن کوت شده بر روی فاز جامد به دام انداختن آنتی بادی اختصاصی آن استفاده می شود و همان آنتی بادی از طریق بازوی دیگر خود (Fab) پذیرای همان آنتی ژن اما به صورت نشاندار می باشد ، در نتیجه آنتی بادی اختصاصی در بین دو آنتی ژن ساندویچ می گردد . در این روش تعیین آنتی بادی توتال از هر کلاس ایمونوگلوبولین میسر است و یکی از اختصاصی ترین و حساس ترین روش ها برای تشخیص آنتی بادی در نمونه است . مثال بارز این روش کیت اندازه گیری آنتی بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس و ترپونما پالیدومو HBsAb می باشد.

۴ – الایزای رقابتی یا مهاری

رویداد مرکزی ELISA رقابتی یک فرایند اتصال رقابتی است که توسط آنتی ژن اصلی (آنتی ژن نمونه) و آنتی ژن افزودنی انجام می شود . روش ELISA رقابتی در برخی موارد در مقایسه با ELISA غیر مستقیم، ELISAساندویچ و ELISA مستقیم متفاوت است.روش به شرح زیر است:

۱- آنتی بادی اولیه فاقد لیبل با آنتی ژن نمونه انکوبه می شود

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

۲- کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن به پلیت ۹۶ خانه اضافه می شوند که از قبل با آنتی ژن مشابه کدگذاری شده است

۳- آنتی بادی های غیر متصل شده بوسیله شستشو پلیت حذف می شوند

٤- آنتی بادی ثانویه که اختصاصی برای آنتی بادی اولیه است و با یک آنزیم همراه است اضافه می شود

٥- سوبسترا اضافه شده و آنزیم باعث ایجاد یک سیگنال رنگی یا فلورسنتی می شود

مزایا :

- مزیت اصلی الایزای رقابتی شامل آنزیم های متصل شده به آنتی بادی است
- اختصاصیت بالا ، از اینرو ۲ آنتی بادی استفاده می شود
- مناسب برای نمونه های کمپلکس ، از اینرو نیاز نیست آنتی ژن ها در ابتدا استخراج شوند و اندازه گیری شوند
- انعطاف و حساسیت

در روش های رقابتی اساس سنجش بر رقابت دو آنتی ژن یا دو آنتی بادی (که یکی از آن دو نشاندار است) برای اتصال لیگاند با مقدار محدود استوار است اگر هردو آنالیت نشاندار و غیر نشاندار با هم به سیستم اضافه شوند روش را رقابتی می نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهاری یا بلاکینگ می نامند . در روش مهاری ممکن است در بین دو مرحله و قبل از اضافه نمودن آنالیت بعدی شستشو انجام شود یا انجام نشود ، مثال بارز روش های رقابتی و مهاری سنجش T4 و T3 می باشد .انواع روش هاای رقابتی عبارتند از :

الف) روش سنجش رقابتی یا مهاری برای آنتی ژن :

اساس این روش بر رقابت بین آنتی ژن نشاندار و آنتی ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی بادی اختصاصی کد شده در چاهک استوار است . در این روش مقدار آنتی بادی کد شده باید محدود باشد و ملکول سیگنال دهنده همان آنتی ژن نشاندار است ، اساس روش RIA و EIA کلاسیک همین روش است .

در این روش منحنی پاسخ دوز به صورت معکوس خواهد بود ، بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور مقادیر زیادی از آنالیت غیر نشاندار موجود در نمونه کمتر به آنتی بادی متصل می شود و در نتیجه سیگنال کمتری هم وجود خواهد آمد .

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

در برخی از موارد نشاندار کردن روی خصوصیات هاپتن اثر می گذارد در نتیجه در روش رقابتی برای تعیین آنتی ژن از یک آنتی بادی نشاندار استفاده می شود ، در این نوع از سنجش ها این مطلب ضروری است که فاز جامد توسط آنتی ژن با مقدار کم و ثابت پوشیده می شود ، در این روش آنالیت موجود در نمونه با آنالیت کد شده در چاهک برای اتصال به آنتی بادی نشاندار رقابت

می کند . در اینجا هم منحنی استاندارد معکوس است ، از این روش بیشتر برای سنجش ایمنی به روش کمی لومینسانس استفاده می شود .

ب) روش رقابتی برای آنتی بادی :

در این روش رقابت بین دو آنتی بادی یکی در نمونه به صورت غیر نشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برای اتصال به یک آنتی ژن کد شده در چاهک صورت می پذیرد ، بدیهی است که هر چه مقدار آنتی بادی نمونه بیشتر باشد آنتی بادی نشاندار کمتری به چاهک ها متصل شده و سیگنال نیز کمتر خواهد بود و در نتیجه منحنی استاندارد نیز معکوس می باشد ، شاخص ترین مثال برای این روش اندازه گیری آنتی بادی بر ضد HBc (HBc Ab) است .

Direct ELISA

در روش مستقیم آنتی ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر به طور مستقیم بر سطح فاز جامد پوشش داده می شود و سپس آنتی‌بادی یا آنتی ژن مکمل نشاندار شده آن به سیستم اضافه می‌شود. با آنالیز سیگنال تولید شده می‌توان پی به وجود آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر در نمونه برد. این روش ارزش تشخیصی چندانی نداشته و بیشتر کاربرد تحقیقاتی دارد. تست الایزای مستقیم یک تیپ ساده ای از الایزا است که آنتی ژن های جذب شده در سطح پلیت های پلاستیکی قرار دارند و سپس پروتئین دیگر مثل آلبومین سرم گاوی اضافه می شود تا تمام نواحی اتصالی را بلاک کند تا آنزیم ها تنها به آنتی بادی ها در واکنش جداگانه ای متصل شوند. کمپلکس آنزیم –آنتی بادی شستشو داده می شود آنزیم –آنتی بادی متصل به آنتی ژن باقی می ماند. بوسیله اضافه کردن آنزیم به سوبسترا سیگنال های قابل تشخیص را ایجاد می نماید در مقایسه با الایزا غیر مستقیم مراحل ساده تر است اما یک اختلاف مهم و یک مرحله اضافی وجود دارد بعد از اینکه آنتی ژن بوسیله سطح پلیت جذب شد آنتی بادی بعدی به آنتی بادی که آنتی ژن

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

را شناسایی می کند اضافه می شود سپس یک آنزیم –آنتی بادی متصل به پلیت اضافه می شود و آنتی بادی که بوسیله آنتی ژن جذب شده شناسایی می شود .روش مستقیم سریعتر است چون فقط یک آنتی بادی استفاده می شود و مراحل کمتر است

معایب : آنتی بادی اولیه باید به طور جداگانه لیبل شود که می تواند زمان بر باشد اگرچه غیر قابل انعطاف و دارای سیگنال های ضعیف است

Indirect ELISA

در روش غیر مستقیم سرم رقیق شده به آنتی ژن های پوشش داده شده در فاز جامد اضافه می شود، سپس نمونه را به آن اضافه کرده و پس از گذشت زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو، آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود. این روش برای تعیین آنتی بادی اختصاصی یا تیتراسیون آنتی بادی در سرم استفاده می‌شود.

در الایزای غیر مستقیم ۲ مرحله دارد که ۲ پروسه اتصال درگیر است آنتی بادی اولیه و آنتی بادی ثانویه لیبل شده .آنتی بادی اولیه با آنتی ژن انکوبه می شود و سپس با آنتی ژن ثانویه انکوبه می شود اگرچه منجر به سیگنال های غیراختصاصی واکنش های متقاطع می شود

۱- پلیت ها با آنتی ژن انکوبه می شوند سپس شستشو و با آلبومین سرم گاوی فضاها پر می شوند
۲- نمونه ها با آنتی بادی ها اضافه و شستشو می شود
۳- آنزیم متصل به آنتی بادی ثانویه اضافه و شستشو می شود
۴- سوبسترا اضافه می شود و آنزیم روی آنتی بادی باعث سیگنال های رنگی یا فلورسنتی می شود

مزایا :

- حساسیت بالا : بیشتر از یک آنتی بادی لیبل شده به مولکول آنتی ژن متصل می شود

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- انعطاف پذیری : آنتی بادی های تشخیصی اولیه متفاوت می توانند با یک آنتی بادی ثانویه لیبل شده به کار روند
- صرفه جویی در هزینه : کمترین آنتی بادی های لیبل شده مورد نیاز است

در روش غیر مستقیم نمونه آنتی بادی بین آنتی ژن کد شده روی پلیت و آنزیم لیبل شده قرار می گیرد آنزیم ها باعث فعالیت رنگی شده که میزان رنگ ارتباط متناسبی با میزان باند های آنتی بادی ها نمونه دارد حضور آنتی بادی های بیشتر رنگ های قوی تر ایجاد می کند این روش برای تشخیص سطح کلی آنتی بادی در نمونه است

مزایای ELISA:

در مقایسه با سایر متد های ایمونواسی ،مزایای زیادی برای استفاده از ELISAوجود دارد

حساسیت بالا ، اختصاصیت : حساسیت بالا به خاطر گروه آنزیمی است که واکنش های رنگی به راه می اندازد و در حد نانو و میکرو گرم است روابط مکملی بین اپی توپ و پاراتوپ آنتی ژن ها باعث ایجاد روابط قوی می شود .

ELISA Device:

بیشتر پلیت هایی که در ELISA استفاده می شوند از جنس پلی استرن یا مشتقات آن هستند که بوسیله تغییرات شیمیایی به وجود می آید اغلب برای پلیت های ۹۶ تایی با ۸ تا ردیف و ۱۲ ستون طراحی شدند هر چاهک تقریبا۳۵۰ میکرولیتر حجم دارد با ناحیه داخلی ۲.۵ cm^2 می باشد اخیرا پلیت هایی با ۳۸۴ و ۱۵۳۹ چاهک با ابعاد پلیت های ۹۶ تایی درست شده اند و چاهک هایی با انتهای گرد طراحی شده اند که به جای انتهای با زوایای ۹۰ درجه که باعث بهتر انجام شدن مراحل شستشو می شوند گزارشات افزایش ۱۰-۲۰ ٪ در جذب IgG در چاهک های ستاره ای نشان داده شده است بعلاوه پلیت های غیر کد شده تغییرات متفاوتی در آمین ها ایجاد می کنند یا گروه های maleimide, hydrazine یا N-oxysuccinimide روی سطح فعال می کنند که بتواند برای اتصالات کوالان پروتئین ها به کار رود .

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

ویژگی پلیت های الایزا :

تک کاناله با حجم ثابت و حجم متغیر(1–20 µL, 10–100 µL, 20–200 µL, etc.)

چند کاناله : ۸-۱۲ کاناله

قابل نیمه اتوکلاو

سیستم های کامل اتوماتیک که برای پلیت های چندتایی به کار می رود

Washer Systems

- سیستم های دستی که یک ستون یا ردیف را در یک زمان می شوید
- سیستم های نیمه اتوماتیک که شستشوی یک استریپ یا پلیت را همزمان انجام می دهد
- سیستم های تمام اتوماتیک که شستشوی پلیت های چند تایی را همزمان انجام می دهد

از دیگر مراحل مهم تست ELISA ، شستشو است که در هر مرحله از تست به منظور دفع و تخلیه کامل مولکول‌های غیر اختصاصی از محیط واکنش انجام می گیرد. شستشو به دو صورت دستی و خودکار انجام می شود. ابتدایی ترین روش شستشو، شستشوی دستی است بدین ترتیب که مایع شستشو را با پیپت بر روی چاهک ها ریخته و سپس آن را در سینک خالی می کنند. فشار بالای شستشو در روش دستی که به علت تخلیه سریع بافر به وجود می آید، منجر به جداشدن و حذف اتصالات اختصاصی از کف چاهک‌ها و کاهش کاذب می‌شود، همچنین فشار پائین‌شست‌شو ناشی از تخلیه آهسته بافر، باعث عدم دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی و افزایش کاذب جذب نوری می‌شود. بهتر است در روش دستی تا نزدیک لبه فوقانی چاهک ها از محلول شستشو پر شود، در صورت پر شدن لب به لب چاهک‌ها، احتمال آلودگی چاهک به چاهک افزایش پیدا می‌کند. همچنین باید از سرریز شدن محلول شستشو، ایجاد حباب هوا در چاهک‌ها و تماس با کف چاهک جلوگیری کرد. در هنگام تخلیه چاهک‌ها نیز باید مکش و تخلیه به طور کامل انجام شده و دقت شود که حتی ذره ای از مایع بافر در کف چاهک‌ها باقی نماند. اما این روش شستشو (شستشوی دستی) بسیار وقت گیر بوده و خطر آلودگی محیط و کاربر را در پی دارد. از این رو دستگاه‌های خودکار واشر ELISA

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

برای شستشوی پلیت ها به وجود آمده است که علاوه بر دقت و ایمنی بالاتر، سریع‌تر و راحت‌تر عمل شستشو را انجام می دهند. این دستگاه‌ها در انواع مختلف ۸ یا ۱۲ کاناله، تک سوزنه و دوسوزنه موجود است. در انواع دو سوزنه، یک سوزن برای ریختن و دیگری برای خالی کردن محلول شستشو استفاده می‌شود بدین ترتیب که یک سوزن به طور دائم در حال مکش است تا اگر مایع شوینده بیشتری در هنگام پر کردن وارد چاهک ها شد ، آن‌را خالی کند و این در حالی‌است که در مدل تک سوزنه تمامی اقدامات توسط همان یک سوزن صورت می گیرد. این دستگاه ها بسیار موثر و تقریباً سریع بوده و توسط افراد مجرب مورد استفاده قرار می گیرند.

ELISA Plate Readers

- ریدر های دستی که یک ردیف یا چاهک را می خواند
- ریدر های نیمه اتوماتیک که یک پلیت را در یک زمان می خواند
- سیستم های تمام اتوماتیک که خوانش پلیت های چندتایی را همزمان انجام می دهد

خوانشگر ELISA در واقع یک دستگاه فتومتر است که در آخرین بخش از تست ELISA به طور اختصاصی برای خواندن نمونه های مربوطه طراحی شده است. وظیفه آن طیف‌سنجی نوری یا خوانش دانسیته نوری واکنش ELISA است. طول موج مشخصی از نور از پائین درون چاهک می‌گذرد، در مسیر آن فیلتر مناسبی باتوجه به نوع آنزیم و نوع سوبسترای آنزیم جهت دستیابی به طول موج مطلوب قرار داده می شود. در بسیاری از خوانشگرها سیستم تک موج یا دو موج است و جهت برطرف سازی نقص سیستم نوری ، تغییرات چاهک به چاهک حجم نهایی در چاهک ها، تصحیح جذب نوری به طور خودکار صورت می گیرد . این عمل توسط نوع خاصی از فیلترتحت عنوان فیلترهای تفاضلی صورت می گیرد. خوانش میزان جذب محتوی چاهک‌ها توسط خواننده ELISA الزاما بایستی در زمان تعیین شده انجام شود. بعضی از دستگاه‌های خواننده ELISA قابلیت برنامه‌ریزی زمانی، نوع تشخیص و کنترل و در نهایت مشخص کردن مثبت یا منفی بودن نمونه‌های مجهول را دارا هستند. امروزه انواع مختلفی از خوانشگرها برای پلیت ها ی ELISA در بازار موجود هستند اکثر این خوانشگرها یک ستونی یا ۹۶ خانه (یک پلیتی) بوده که اکثرا خودکار و تعداد اندکی نیز دستی هستند. این دستگاه‌ها دارای فیبرهای نوری هستند. در دستگاه‌های

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

خواننده انتخاب طول موج توسط فیلترها یا گریدها (گریتینک ساختارهایی که با تابیده شدن نور به آن‌ها، تنها نور با طول موج خاصی ازآن‌ها ساطع می شود) انجام می شود. برای چاپ نتایج نمونه‌های موردآزمایش ، یا دستگاه خود دارای پرینتر است یا می توان آن‌را به پرینتری متصل کرد. همچنین می توان جهت انجام محاسبات بیشتر خوانشگر ELISA را به کامپیوتر وصل کرد.

شیکر ELISA (ELISA SHAKER)

Shaker Eliza

تکان دادن میکروپلیت ها(shaking) از مهم‌ترین بخش های تکنیک ELISA است، چرا که تاثیر زیادی در تغییر رنگ محیط آنزیمی پس از افزودن محلول اسیدی دارد. استفاده از روتاتور معمولی با قطر چرخش زیاد و تعداد دور کم و در نتیجه تکان دادن آهسته میکروپلیت‌ها باعث خوب مخلوط نشدن معرف‌ها و در نتیجه ادامه و پیشرفت جزئی واکنش در طی زمان و بروز خطا می‌شود. همچنین تکان شدید این پلیت ها نیز باعث آلوده شدن چاهک های میکرو پلیت با هم می‌شود. شیکر ELISA دستگاهی است که برای مخلوط کردن محتویات میکروپلیت‌ها به کار گرفته می شود. شیکر ELISA با حرکت سریع با قطر چرخش کم باعث اختلاط مناسب معرف‌ها و در نتیجه پیشرفت واکنش در طی زمان می‌شود. شیکرهای امروزی مجهز به سیستم کنترل زمان و کنترل دور به صورت دیجیتال است.

ELISA Reagents

سه ماده ضروری برای معرف های الایزا شامل :

immunosorbent, conjugate و substrate است تمام این محتویات برای یک کیت و تشخیص توسط الایزا ضروری است

۱- Immunosorbent فاز جامدی که روی آن بوسیله آنتی بادی یا آنتی ژن کد می شود

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

و در دمای پائین ۲-۸ درجه قابل نگه داری می باشد و در شرایط بدون رطوبت برای ۶ ماه قابل نگهداری است کیت هایی وجود دارد که آنتی بادی و آنتی ژن های کد شده را می تواند نگهداری نماید و بعنوان کنترل استفاده می شود . در تست های الایزا وظیفه فاز جامد جذب و حمل کننده است بنابراین خودش واکنش دهنده نیست . مواد زیادی وجود دارد که معمولا از جنس پلی استرن است که برای الایزا می توان از آن استفاده کرد و قدرت زیادی برای جذب پروتئین ها دارد و آنتی بادی یا پروتئین های آنتی ژنی بعد از جذب فعال روی آن باقی می مانند . بعلاوه به طور وسیعی کاربرد دارد چون ارزان قیمت است . پلی استرن یک ماده پلاستیکی است که می تواند به شکل های مختلف ساخته شود

سه شکل از حامل های الایزا وجود دارد :

small ball , small tube و microtiter plate

معمولا microtiter plate ۹۶ خانه استفاده می شوند . از ویژگی پلیت های الایزا این هست که می تواند برای تشخیص حجم زیادی نمونه در یک زمان استفاده شود و نتیجه سریع بوسیله رنگ سنجی محاسبه شود پلی استرن در جذب پروتئین قدرتمند است معمولا ایمونوگلبولین ها بعد از پرتودهی ،می تواند آنتی بادی ها را در فاز جامد افزایش دهند .یک پلیت الایزا خوب جاذب قوی است با فاصله های کم و شفافیت بالا در ته چاهک ها

- Conjugate (Antigen or antibodies conjugated enzyme)
- **اساس روش های سنجش ایمنی**
- **مزایای IEMAنسبت به : EIA**

کانجوگیتیو ها آنتی بادی ها یا آنتی ژن هایی هستند که به آنزیم متصل شده اند و ماده کلیدی در الایزا می باشد یک کانجوگیتیو خوب تنها فعالیت کاتالیتیکی آنزیمی ندارد همچنین توانایی ایمونولوژیکی آنتی بادی ها را هم داراست . آنتی بادی یا آنتی ژن بخشی از آنزیم هستند که به ترتیب آنزیم ها و آنتی بادی های غیر لینک شده را کاهش می دهد . بعلاوه کانجوگیتو ها باید در حد مطلوب پایدار باشد.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

اگر کیت های درخواستی شما محلول های کانجوگیتو آماده استفاده را داشته باشد مطمئنا ساختار راحتی را دارند فقط چیزهایی که سریع به آن نیاز دارید را آماده کنید و باقی محلول ها را برای استفاده بعدی نگه ندارید اگر کانجوگیتو ها آلوده شوند یا در انبار بد نگهداری شوند آنها فعالیت آنزیمی خود را از دست می دهند یا ممکن است افزایش در جواب ها ایجاد شود بیشتر کیت ها محلول های آماده دارند

۱-آنزیم

آنزیم هایی که در ELISA استفاده می شوند باید خلوص بالا ، نرخ تبدیل بالا ، اختصاصیت مناسب ، خواص پایدار ، منبع غنی ،قیمت ارزان و اجزاء فعال ،خاصیت کاتالیتیکی بعد از اتصال به آنتی بادی باید داشته باشد سوبسترا هاراحت ساخته و نگهداری می شوند محصولات فاقد آهن خیلی راحت تشخیص داده می شود . در الایزا HRP و الکالین فسفاتاز معمولا استفاده می شود

۲-آنتی ژن و آنتی بادی

IgG استخراج شده زیاد ، معمولا در کانجوگیتو استفاده می شود و بترتیب از مداخله سایر پروتئین ها زمانیکه متصل به آنزیم هستند ممانعت می کند بهترین روشی برای استخراج آنتی بادی ها از طریق کروماتوگرافی است . این آنزیم ها کونجوگه شده تماما اختصاصی از اجزا ایمونولوژی هستند و می توانند در غلظت های پایئن واکنش دهند

سوبسترا :

فعالیت شیمایی سوبسترا می تواند در معرض نور یا در تماس با فلزات به خطر بیفتد . حمایت این محلول ها بوسیله نگهداری در ظروف تاریک تا زمان انجام کار لازم است

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

کنترل ها :

بیشتر کیت ها دارای کنترل های از پیش رقیق شده هستند اگرچه بعضی از آنها نیاز دارند که به شکل یکسانی با نمونه رقیق شوند. کنترل ها باید به پلیت با روشی یکسان و همزمان با نمونه اضافه شوند

رقت نمونه ها و محلول های شستشو :

مطمئن شوید که رقت نمونه ها و محلول های شستشو با دمای اتاق (18–25°C) قبل ار استفاده هم دما شده است آنها معمولا در بطری های بزرگ در یک کیت قرار دارند و بیشترین مواقعه موازنه است اگر محلول شستشو مواد کریستالی داخلش بود بعد از رسیدن به دمای اتاق ، آن را بوسیله تکان دادن بطری برای چند بار مخلوط کنید در پلیت الایزا ۰.۰۵توئین ٪۲۰ PBST به طور معمول برای رقیق کردن استفاده می شود

محلول متوقف کننده :

از وجود محلول متوقف کننده در کیت مطمئن شوید .هر اقدام پیشگیرانه یا احتیاطی را که در کیت ذکر شده انجام دهید این محلول قبل از استفاده باید به دمای اتاق برسد اگر محلول متوقف کننده مواد کریستالی داخلش بود بعد از رسیدن به دمای اتاق ، آن را بوسیله تکان دادن بطری برای چند بار مخلوط کنید محلول متوقف کننده ممکن است در دمای پائین به فرم کریستالی در بیاید قبل از استفاده کامل آنها را حل کنید و ظاعر شفاف آن را بررسی کنید H2SO4 به طور وسیعی به عنوان محلول متوقف کننده استفاده می شود غلظت آن به میزان حجم نهایی محلول بستگی دارد معمولا 2 mol/L در پلیت الایزا استفاده می شود .

ELISpot Schematic Procedure

نتایج ELISA به صورت عددی گزارش می‌شود. بحث‌انگیزترین وجه این تست تعیین نقطه برش بین نتایج مثبت و منفی است. علاوه بر آزمایش HIV از ELISA برای آزمایش بیماری‌هایی چون هپاتیت، تب استخوان‌شکن، leptospirosis ، عفونت انگلی، تبخال، سرخجه و دیگر عفونت‌های ویروسی و باکتریایی استفاده می‌شود.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

پیش از پیدایش روش ELISA ، تنها گزینه برای انجام سنجش ایمنی، ایمنی سنجی رادیویی بود، که از آنتی ژن ها و آنتی بادی هایی که به صورت رادیواکتیو ممیز شده بودند استفاده می‌شد. در این روش در صورت وجود آنتی بادی یا آنتی‌ژنی خاص، رادیواکتیویته سیگنالی تولید می‌کرد. تئوری روش ایمنی سنجی رادیویی اولین بار سال ۱۹۶۰ توسط Rosalyn Sussman Yalow و Solomon Berson مطرح شد. از آنجایی‌که رادیواکتیویته خطرات زیستی داشت، پیشنهاد امن تر و ایمن تری مبنی بر جایگزینی سیگنال های غیر رادیو اکتیو به جای سیگنال های رادیو اکتیو ارائه شد. وقتی یک آنزیم مشخص (مانند پر اکسیداز) با زیر لایه مناسب واکنش می دهد، منجر به تغییر رنگ آن می‌شود که می تواند به عنوان سیگنال استفاده شود. البته باید تناسب بین سیگنال و وجود آنتی‌بادی یا آنتی ژن تعیین می‌شد که این پروسه توسط StratisAvrameas و G.B. Pierce انجام شد. در سال ۱۹۶۶ توسط Wide و Porath این روش تکمیل تر شد. و در سال ۱۹۷۱ Peter Perlmann و Eva Engvall نهایتا به روش ELISA به شیوه امروزی دست پیدا کردند. ELISA امروزی مزایای زیادی نسبت به روش‌های ایمنی سنجی رادیویی دارند. از جمله عدم وجود خطر تشعشع، امکان اتوماسیون، امکان افزایش حساسیت روش، عمر طولانی کیت های آنزیمی، سرعت خوانش بالا و قیمت ارزان‌تر دستگاه‌ها و معرف ها.

فرایند انجام ELISA:

برای انجام تست ELISA باید نمونه خون از بیمار گرفته شود و سرم آن جدا شود. برای این کار باید به مواردی دقت داشت. مثلا از بستن گارو برای مدتی طولانی باید اجتناب کرد چرا که ممکن است در پارامترهای مورد اندازه گیری تاثیر گذاشته و موجب بروز خطا شود. در هنگام جداسازی سرم نیز باید دقت شود که فیبرینوژن یا ذرات دیگر نباشد. پیش از انجام آزمایش باید به کیفیت کیت های مورد مصرف توجه کرد، همچنین نگهداری آن‌ها باید در دمای2-8 C صورت گیرد. تمامی محلول‌های موجود در کیت قبل از مصرف بایدخوب مخلوط شده و به دمای آزمایشگاه برسد و پس از استفاده به منظور افزایش پایداری، بلافاصله اجزاء کیت به یخچال منتقل شود. درحین انجام آزمایش باید از نوسانات غیر تدریجی دما در هنگام انکوباسیون، مانند باز بودن پنجره یا درب آزمایشگاه در محل آزمایش جلوگیری کرد. ایجاد پدیده هوک باعث ایجاد نتایج پایین کاذب می‌شود لذا توصیه می‌شود برای جلوگیری از این پدیده سرم رقیق نشده و سرم یک دهم رقیق شده، مخلوط وآزمایش را انجام دهیم، تا اثر احتمالی هوک اصلاح شود.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

از آنجا که فریز و دیفریز کردن نمونه ها باعث کاهش سطح برخی از هورمون ها می‌شود، باید تا حد ممکن از این کار پرهیز شود. پیش از اندازه گیری باید کلیه ابزارهای مورد استفاده اعم از نوک ابزار نمونه‌گیری و کیت ها استریل شوند. که البته استفاده از ابزارهای یکبار مصرف پیشنهاد می‌شود و باید قبل از استفاده لوله آزمایش های شیشه‌ای آن‌ها را با اسید سولفوریک رقیق شستشو داده و با آب مقطری که دوبار تقطیر شده آبکشی انجام داد. از به کار بردن محلول‌های شستشوی نامناسب یا آب مقطر ناخالص باید پرهیز کرد. ضمنا باید از کارکرد صحیح دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده به عنوان مثال از صحت طول موج فیلترهای خواننده ELISA به کمک استفاده از ماده رنگی با ثبات، نظیر بیکرومات پتاسیم یا عملکردصحیح دستگاه واشر ELISA اطمینان حاصل کرد.

برای انجام الایزا:

۱- ابتدا باید پروتئین مورد نظر را به کف پلیت چسباند.

۲- نقاط اتصال باقی مانده را باید با محلول پروتئینی مناسب مسدود کرد.

۳- محلول مورد آزمایش را اضافه کرد تا دو ماده همدیگر را پیدا کرده و متصل شوند

۴- سیستم های تقویتی اولیه را برای افزایش حساسیت آزمایش بکار گرفت

۵- سیستم آنزیمی نهایی را به راه انداخته و رنگ نهایی تولید شده را اندازه گرفت

حال این ۵ مرحله به تفکیک توضیح داده می شوند:

۱) اتصال پروتئین به کف پلیت (Coating):

آنتی ژن (یا آنتی بادی) در مقادیری در حدود میکروگرم به داخل چاهک پلیت الایزا اضافه شده و فرصت داده میشود تا به مقدار کافی به کف چاهک (well) متصل شود برای اینکار بسته به نوع پروتئین بافرهای مختلفی به کار گرفته می شود و غلظت پروتئین نیز باید مناسب سازی شود در مقادیر بسیار پایین حساسیت ردیابی پایین می آید و در مقادیر بالای آنتی ژن اتصالات سستی نیز برقرار میشود که در مراحل بعدی کنده شده و هنگام شستشو آنتی ژن همراه با آنتی بادی اختصاصی

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

دفع می شوند و لذا حساسیت تست مجددا پایین می آید.بطور کلی این مرحله اساسی بوده و نقش زیادی در نتیجه نهایی دارد ایده آل های مورد انتظار برای این مرحله اینها هستند:

الف) مقدار آنتی ژن متصل شده به کف همه چاهک های یک پلیت باید یکنواخت باشند و کمترین واریانس را در نتیجه ایجاد کنند، بدین معنی که وقتی یک نمونه واحد را در چند چاهک مختلف منتقل نموده و آزمایش کنیم باید نتایج بدست آمده به هم نزدیک بوده و حداقل خطا را نشان دهند. همچنین اگر آزمایش مورد نظر در حجم بالا انجام میگیرد و چند پلیت را هم زمان کد نموده و استفاده میکنیم باید جنس پلیت ها و شرکت تهیه کننده آنها یکسان باشد تا از خطای مربوط به تفاوت در قدرت اتصال پلیت ها جلوگیری شود و ترجیحا بافر کوتینگ و زمان کوتینگ و محلول آنتی ژنی آماده شده برای کوتینگ بهتر است یکسان باشند.

ب) اتصالات برقرار شده بین آنتی ژن و بستر جامد باید به اندازه کافی محکم و قوی باشند تا در مراحل شستشوی بعدی کنده نشوند، معمولا برای آنتی ژن های عادی، اتصال دهنده اضافی لازم نیست ولی اگر آنتی ژنی استثناً با روش معمول به کف پلیت نچسبید یا اتصالات سستی برقرار کرد از مواد و روش های خاصی برای اتصال آنتی ژن به کف بستر استفاده می شود (مثلاً استفاده از گلوتارآلدئید یا اشعه ایکس یا ...).

ج) پروتئین متصل شده نباید آنقدر کم باشد که نتواند مقادیر بالای آنتی بادی را جذب کند در این صورت غلظت های بالای آنتی بادی قابل تشخیص نخواهد بود از طرفی پروتئین متصل شده نباید آنقدر زیاد باشد که اتصالات غیراختصاصی از اتصالات اختصاصی بیشتر شوند که در این صورت جواب آزمایش قابل اعتماد نخواهد بود

برای تامین این سه هدف تمهیدات خاصی به کار گرفته می شوند که در فرصتی مناسب توضیح داده خواهند شد

۲) مرحله مسدود سازی یا بلوکینگ (blocking):

نقاطی از کف پلیت که با پروتئین اختصاصی پوشانده نشده اند با استفاده از محلول های پروتئینی خنثی (از این نظر که در

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

واکنش اختصاصی بعدی اثر سوئی ندارد) پوشانده می شوند محلول های پروتئینی برای این منظور حاوی شیر کم چربی یا آلبومین گاوی یا ژلاتین و یا کازئین میباشند. علاوه بر پروتئین از دترژانت های غیر یونی خاصی نظیر Tween 20 یا Tween 80 یا ... نیز به عنوان کمکی استفاده می شوند نوع این مواد و مقادیر بکار برده شده به صورت تجربی تعیین می شوند و با توجه به تجربیات دیگران می توان محدوده خاصی را برای کار مورد نظر امتحان کرد و بهترین غلظت را بدست آورد (چون پروتئین ها از ریشه های جانبی متفاوتی برخوردارند لذا برای پروتئین های بسیار خالص مثل پروتئین های ریکامبینانت مناسب سازی این ترکیبات در بالا بردن اعتبار نتایج بسیار کمک کننده خواهد بود). علاوه بر پروتئین و دترژانت، غلظت یونی بافر بلوک کننده نیز اهمیت زیادی دارد و برای اتصال انتخابی پروتئین مورد نظر (از میان مخلوط پروتئینی) میتوان بافرهای مختلف و غلظت یونی متفاوت را ارزیابی کرده و بهترین بافر را برای آزمایش مورد نظر بدست آورد.

۳) اتصال آنتی ژن و آنتی بادی

محلول مورد آزمایش که احتمال میرود حاوی مقادیر قابل ردیابی از آنتی بادی بر علیه آنتی ژن اختصاصی موجود در کف پلیت میباشد در این مرحله در بافر مناسبی تهیه شده و اضافه می شود آنتی بادی شناور در محلول، آنتی ژن متصل به بستر را پیدا کرده و به آن متصل می شود بندرت این آنتی بادی متصل به آنزیم است اما در اغلب اوقات کونژوگه آنزیم دار در مرحله بعدی بکار گرفته می شود.آنتی بادی های متصل نشده با عمل شستشو از محیط حذف می شوند بافر شستشو معمولا دارای پروتئین خنثی به کار گرفته شده در محلول بلوکان است. و از نظر قدرت و pH بافری مناسب برای اتصال آنتی ژن با آنتی بادی است. آنتی بادی ها، سرم ، و محلولهای بکار گرفته شده در مراحل مختلف الایزا معمولا در بافر شستشو رقیق می شوند.

۴) سیستم های تقویتی اولیه

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

سیستم تقویتی اولیه قبل از سیستم تقویتی اصلی (که همانا بکار گرفتن خصوصیت آنزیمهاست) میباشد در این مرحله ما واکنش های اضافه تری را به کار میگیریم تا قدرت اندازه گیری تست (حساسیت و اختصاصیت) بالا برده شود.بدین منظور از قدرت تقویت کنندگی بیوتین-آویدین، بیوتین-استرپتاویدین، لکتین-لیگاند و ... استفاده می شود.

۵) تقویت آنزیمی

هر آنزیمی بر روی سوبسترای اختصاصی خود اثر کرده و آنرا به محصول تبدیل می کند این واکنش در طی زمان منجر به جمع شدن مقدار متنابهی از محصول در محیط می شود بدین معنی که با گذشت زمان معینی یک مولکول آنزیم می تواند مولکول های سوبسترای بسیاری را به محصول تبدیل کند این اثر افزایشی در حقیقت اساس الایزا را تشکیل میدهد. بدین ترتیب که آنتی بادی نهایی باقی مانده پس از شستشوی نهایی با مولکول آنزیم متصل است و افزودن سوبسترا در طی زمان معینی (مثلاً یک ساعت) منجر به آزاد سازی مقادیر متنابهی سوبسترا می گردد که یا خود رنگی میباشد یا در واکنش با ماده دیگری (کروموژن یا رنگزا) که به محیط اضافه شده است رنگ تولید میکند در نهایت رنگ تولید شده توسط دستگاه قرائت کننده مخصوصی خوانده شده و محاسبات لازم بر روی داده های بدست آمده انجام می گیرد

اساس تست Sandwich ELISA برای اندازه گیری سیتوکین

در روش الایزای ساندویچی مولکول اندازه گیری شده در واقع در بین دو مولکول مختلف آنتی بادی قرار میگیرد (ساندویچ میشود) مثلا این روش را در مورد اندازه گیری سایتوکاین اینترفرون گاما شرح میدهیم:

سلول های طحالی گرفته شده از موش های دریافت کننده واکسن در اثر تحریک با آنتی ژن اختصاصی در محیط کشت تکثیر پیدا خواهند کرد برای تعیین اینکه غالب سلول های تکثیر یابنده از نوع Th1 هستند یا Th2 باید پروفیل سیتوکینی در محیط کشت مشخص شود بدین منظور تعیین مقدار سیتوکین های IL-4 و IFN-g ترشح شده توسط سلول ها در محیط کشت مد نظر قرار میگیرد.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

چنانکه در شکل زیر مشخص شده است در این روش آنتی بادی منوکلونال ضد آنتی ژن به کف plate چسبانده میشود سپس فرصت داده میشود تا آنتی ژن (در این تحقیق سیتوکین IL-4 و IFN-g) به آن متصل شود در مرحله بعدی آنتی بادی پلی کلونال ضد آنتی ژن اضافه میشود که متصل به آنزیم پراکسیداز HRP است و اضافه شدن سوبسترا همراه با کروموژن منجر به ایجاد محصول رنگی میشود که توسط دستگاه ELISA Reader قرائت میگردد چون در این روش آنتی ژن در بین دو آنتی بادی قرار میگیرد لذا به ساندویچ مشهور شده است. تصویر زیر گویای این شباهت است.

نتیجه گیری :

در ابتدای نیمه ی قرن بیستم ، محصول ایمنی همورال یعنی آنتی بادی ها یکی از نقاط عطف در مقوله ی روش های سنجش را بوجود آوردند . آنتی بادیها با اتصال ویژه به آنالیتی که بر ضد آنها تهیه شده اند ، به عنوان ابزاری مناسب برای سنجش های ویژه و سریع در اختیار محققان قرار گرفتند . روش هایی که از آنتی بادیها به عنوان فاکتور شناساگر بهره می گیرند ، روش های سنجش ایمنی نام دارند .

تمامی سنجش های ایمنی که بر اساس واکنش تعادلی و غیر کووالانسی بین ایمونوگلوبولین و آنالیت ها بنا شده اند ، در اصل از مهمترین روش های سنجش اتصال لیگاند به شمار می آیند . بر هم کنش آنتی بادی با آنالیت عمدتاً از نوع هیدروژنی و واندروالس است . این بر هم کنش ناشی از مکمل بودن شکل فضایی ناحیه متغیر آنتی بادی با بخشی از ساختمان آنالیت می باشد . اغلب ، آنتی بادی های پلی کلونالی که در سنجش های ایمنی بکار می روند از نوع IgG هستند .

بر هم کنش میان آنالیت و آنتی بادی فیزیکی است ، یعنی تغییر شیمیایی در ساختمان آنالیت یا آنتی بادی بوجود نمی آید . به هر حال واکنش ویژه میان آنالیت و آنتی بادی اساس کلیه روش های سنجش ایمنی می باشد . به منظور ردیابی واکنش مذبور از سیگنال دهنده های مختلفی بهره گرفته اند . مثلاًاستفاده از ماده ی رادیو اکتیو سنجش های RIA، IRMA و استفاده از سیگنال دهنده های آنزیمی سنجش های EIA ، IEMA را بوجود آورده است .

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

شناسایی آنالیت ، اولین مرحله در این نوع سنجش محسوب می شود . این عمل توسط آنتی بادی انجام می پذیرد . به عبارتی ، جزء لا ینفک هر سنجش ایمنی واکنش میان آنتی ژن و آنتی بادی است . در محدوده ی معینی از غلظت آنتی ژن و آنتی بادی انجام واکنش منجر به تشکیل رسوب قابل رویت (قبل یا بعد از رنگ آمیزی) می گردد . اما در اغلب موارد ، قبل و بعد از انجام واکنش آنتی ژن و آنتی بادی تغییر قابل مشاهده ای وجود ندارد ، به همین دلیل وجود سیستم نشانه گذاری ضروری به نظر می رسد . نوع طبقه بندی سنجش های ایمنی آنزیمی بر اساس نوع نشاندار سازی است .

همانطو که اشاره شد در این روش نیز می توان جهت ردیابی واکنش ، آنتی ژن و ِیا آنتی بادی را با آنزیم نشاندار ساخت . به عمل نشاندار سازی ، کونژوگاسیون و به مولکول آنزیم دار ، کونژوگه ی آنزیمی نیز می گویند . چنانچه آنتی ژن کونژوگه گردد روش را EIA(Enzyme Immuno Assay) گویند و اگر آنتی بادی کونژوگه گردد روش را IEMA(Immuno Enzymo Meteric Assay) می نامند .

اساس روش EIA، رقابت میان آنتی ژن کونژوگه و آنتی ژن آزاد در نمونه مورد سنجش بر سر اتصال به آنتی بادی است . در اینجا میزان کمپلکس آنزیم دار با آنتی ژن آزاد رابطه معکوس دارد . لذا می توان بسته به نیاز آنتی بادی های پلی و یا مونو کلونال استفاده کرد . البته در برخی سنجش ها آنتی بادی های الیگو کلونال پاسخ بهتری ایجاد می کنند . چنانچه چند نوع آنتی بادی مونو کلونال را با هم مخلوط کنیم ، مجموعه حاصله را آنتی بادی الیگو کلونال می باشد

- سادگی نشان دار کردن
- سرعت بیشتر واکنش
- افزایش حساسیت
- محدوده ی وسیع تر از غلظت آنالیت
- ویژگی بالاتر
- مقاومت بیشتر در برابرشرایط آزمایش

برخی از مزایای روش های سنجش ایمنی آنزیم دار نسبت به سنجش ایمنی رادیو اکتیو :

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- عدم وجود خطر تشعشع
- امکان اتوماسیون
- قیمت ارزانتر دستگاه ها
- سرعت خوانش بالا
- معرف های ارزان
- امکان افزایش حساسیت روش
- نیمه عمر طولانی کیت های آنزیمی

- **متغیر ها قبل از سنجش**
- **متغیر های وابسته به نمونه**
- **تاثیر معرف ها (Reagents Effect)**
- **تاثیر پروتئین ها:**
- **پروتئین های هورمون گیر داخلی:**

تمامی عواملی که قبل از انجام آزمایش و زمان انتخاب نوع نمونه ، شیوه نمونه گیری نگهداری و ارسال آن بر نتیجه سنجش تاثیر داشته باشند را متغیر های قبل از سنجش گویند

این متغیر ها بر دو نوع هستند: ۱ – متغیر های وابسته به بیمار ۲ – متغیر های وابسته به نمونه

توجه داشته باشید که عواملی مانند زمان نامناسب نمونه گیری یا فاکتور های محیطی مانند سیگار کشیدن هر چند که آزمایش را تحت تاثیر قرار می دهند اما به عنوان عامل مداخله گر نیستند .

محکم بستن یا طولانی شدن مدت تورنیکت بر روی وریدها باعث افزایش فشار و خروج مایعات از وریدها به فضای میان بافتی گردیده ، غلظت برخی از آنالیت ها را افزایش می دهد مثلاً این شرایط باعث ۵٪ افزایش در میزان پروتئین فرد می شود و به تبع آنها لیگاندهای متصل به آنها نیز افزایش میابد .

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

ماهیت نمونه : تقریباً تمام سنجش های ایمنی از سرم به عنوان نمونه مورد بررسی استفاده می کنند . در مواردی که بیمار نیاز به آزمایشاتی مانند CBC دارد وجود پلاسما آزمایشگر را تشویق می کند تا از نمونه گیری مجدد پرهیز کند و از پلاسما به عنوان نمونه مورد سنجش استفاده نماید . هر چند در اغلب سنجش های ایمنی تفاوتی میان نتایج سرم و پلاسما وجود ندارد اما به هر حال با توجه به تفاوت زمینه (Matrix) این دو نمونه ، اعتبار جایگزینی پلاسما به جای سرم باید اثبات شده باشد .

استفاده از پلاسمایی که از لیتیم هپارین (Li . Hep) به عنوان ضد انعقاد در مورد آن استفاده شده در اکثر موارد قابل قبول است اما در مورد پلاسمایی که از EDTA به عنوان ضد انعقاد استفاده کرده اند باید با احتیاط بیشتری رفتار شود . آلودگی نمونه ها می تواند منشا خطا در سنجش باشد .

وجود غلظت های بالای هموگلوبین در نمونه های همولیز با بر هم کنش پروتئینی در به تعادل رسیدن واکنش آنتی ژن _ آنتی بادی تداخل ایجاد کرده ، زمان به تعادل رسیدن را افزایش می دهد .

اغلب آنالیت ها پایداری خوبی دارند و حتی اگر گویچه های خونی از سرم جدا نشوند می توان بسته به نوع آنالیت چند روز این نمونه را در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری نمود . به عنوان مثال هورمون های ، TSH ، FT4 ، PRL ، LH ، FSH و PSA در نمونه سرمی به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد پایدار می مانند .

قدرت یونی و PH بافر ها بسیار مهم است . خصوصاً زمانی که از آنتی بادی های مونوکلونال با PH ایزوالکتریک بین ۵ تا ۹ استفاده می شود . استفاده از PH و قدرت یونی مناسب ، اتصال غیر ویژه به جداره ظرف واکنش را به حداقل می رساند . معمولاً در بافرها از مقدار کمی پروتئین و دترژانت برای کاهش اتصال غیر ویژه بهره گرفته می شود و این عمل به افزایش دقت کمک می کند . استفاده از جابجا کننده ها (Displacers) سبب جدا شدن مولکول های آنتی بادی با اتصال ضعیف می شود . از آنجائیکه آنتی بادی ها معمولاً با پیوند غیر کووالانس به سطوح جامد متصل می شوند ، استفاده از مقادیر کنترل شده دترژان به کم شدن اتصالات غیر ویژه کمک می کند اما اگر میزان آن از حد معینی بیشتر شود سبب دناتوره شدن آنتی بادی ها و جدا شدن آنها از سطوح جامدی می شود که بر روی آن تثبیت شده اند.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

برخی از دترژانت ها به دلیل مسیر واکنش سنتزشان ، حاوی پراکسیدهایی می باشند که قادر به تخریب واکنش آنتی ژن _ آنتی بادی هستند . از آنجائیکه محیط های بافر اغلب برای رشد میکروارگانیسم ها بسیار مناسب هستند ، در صورتیکه ترکیبات نگهدارنده به محیط افزوده نشود مورد هجوم ساپروفیت ها و باکتری ها قرار می گیرند اما باید مراقب بود که برخی از این نگهدارنده ها مانند آزید سدیم در بخش های ایمنی آنزیمی که از پراکسیداز ها استفاده می کنند ، مهار کننده محسوب می شوند

مهمترین پروتئین هایی که سبب تداخل در برخی از سنجش های ایمنی می شوند ،عبارتنداز آلبومین ، فاکتور روماتوئید ، کمپلمان ، لیزوزیم و فیبرینوژن .

اینگونه پروتئین های هورمون گیر با غلظت های متفاوت در تمام سرم ها و پلاسما ها وجود داشته ، می توانند منشا تداخل در سنجش های ایمنی باشند . هم نوع و هم غلظت این پروتئین ها تحت تاثیر عوامل ارثی و اکتسابی قرار دارند . از میان این پروتئین ها آلبومین اهمیت زیادی دارد چرا که هم بیشترین غلظت را داشته و هم به طیف وسیعی از آنالیت ها از جمله هورمون ها متصل می گردد . برخی از پروتئین های هورمون گیر عبارتند از :

۱) گلوبولین تیروکسین گیر

۲) گلوبولین کورتیکو استروئید گیر

۳) گلوبولین گیرنده هورمون جنسی

۴) آلبومین

۵) پره آلبومین

۶) ترنسفرین

یکی از رایج ترین و کارامد ترین روش های جدا سازی در سنجش های ناهمگون استفاده از فاز جامد یا تثبیت یکی از کمپلکس می باشد . با تثبیت آنتی ژن یا آنتی بادی ، کمپلکس به فاز جامد متصل می ماند ، لذا با شستشوی ساده مولکول سیگنال دهنده آزاد از محیط خارج می شود . تاکنون از فاز های جامد متعددی استفاده شده است :

۱) دانه های (Beads) پلی استیرن

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

۲) لوله های پلی استیرنی با چاهک های (Wells) مربوطه

۳) سلولز

۴) نایلون

۵) ذرات مغناطیسی

روش های فوق بسیار ساده و عملی می باشند اما جذب غیر اختصاصی مولکول نشاندار یکی از مشکلات اصلی می باشد که خوشبختانه با استفاده از محلول های شستشو گر حاوی املاح دترژانت این مشکل نیز تا حدود زیادی برطرف شده و در مواردی تثبیت آنتی بادی با کاهش فعالیت آن همراه است . این موضوع کاربرد این روش را کمی محدود می سازد .

عوامل ایجاد کننده خطا و مشکلات احتمالی

عوامل قبل از انجام آزمایش

- محکم بستن و یا طولانی بسته بودن گارو در زمان نمونه گیری
- تاثیر ضد انعقادها هنگام استفاده از پلاسما (EDTA روی آنزیم آلکالین فسفاتاز)
- نمونه همولیز (افزایش Hb و باقی ماندن آن در محیط بعداز شستشودر سنجش هایی که از آنزیم پراکسیداز استفاده میشود تداخل ایجاد میکند)
- نمونه لیپمیک باعث کدر شدن و شیری شدن سرم میشود
- نمونه ایکتریک (سرم زرد تیره – بیلی روبین بعنوان دترژنت عمل کرده – واکنش با قسمتهای هیدروفوب آنتی ژن و آنتی بادی)
- تاثیر مواد نگهدارنده (اثر سدیم آزاید روی آنزیمهای پراکسیداز)
- **عوامل حین انجام آزمایش**
- مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد زمینه در میکروپلیت
- مقادیر پایین کنترل مثبت یا جذب نوری پایین

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- تمام پلیت مثبت تفسیر شود (در تمام چاهکها محلول دارای رنگ است)
- واکنش مثبت کاذب
- قدرت تکرار پذیری ضعیف یا عدم هماهنگی در جذب نوری دو چاهک دارای نمونه یکسان
- حساسیت ضعیف
- جذب نوری بالا استانداردها و یا کنترل منفی
- نمونه با جذب نوری خارج از محدوده استانداردها
- جذب نوری پایین نمونه ها ، کنترل ها و استانداردها
- کنترل مثبت یا منفی خارج از محدوده تعیین شده توسط بروشور کیت
- خروج استریپ ها از قاب نگهدارنده آنها
- تغییر رنگ کروموژن
- تغییر رنگ مخلوط کروموژن و سوبسترا قبل از افزودن به محیط واکنش
- تغییر رنگ محلول متوقف کننده واکنش
- عدم بروز واکنش رنگی در میکروپلیت پس از افزودن سوبسترا و انکوباسیون آن

No Signal or Weak Signal

- حذف یکی از معرف های کلیدی نظیر کنژوگه در روش اجرائی کار

این حذف منجر به سیگنال منفی (عدم واکنش) می گردد. افت تیتر کنژوگه (غیر فعال شدن کنژوگه) یا کاهش اثر ترکیب سوبسترا و کروموژن که معمولا به دلیل آلودگی معرف ها یا در انتهای مصر ف هر کیت در مراکزی که تعداد نمونه کم بوده و کیت مکررا و در چندین نوبت مورد استفاده قرار می گیرد باعث سیگنال منفی می شود.

- خروج از کالیبر ابزارهای حجمی برداشت نمونه و استاندارد

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

این مسئله منجر به کاهش سیگنال نهائی می گردد به عنوان مثال اگر از منحنی استاندارد ذخیره شده در حافظه دستگاه استفاده نمائیم و ابزار حجمی در حین کار از کالیبر خارج گردد به دلیل اینکه تست و استاندارد در هر ردیف کاری همزمان گذاشته نمی شوند در صورت کاهش برداشت حجم نمونه درسیگنال مربوط به تست ها کاهش و ضعف ایجاد می گردد و نتایج منفی کاذب یا مثبت کاذب بسته به نوع منحنی حاصل می نماید.

- خراش در کف پلیت ها می تواند منجر به کاهش سیگنال شود
- کاهش زمان انکوباسیون یا دمای انکوباسیون

بر خلاف دستور العمل کیت منجر به کاهش سیگنال می گردد که به دلیل کاهش تعداد ترکیب های اتصالی نهائی می باشد.

- شستشو بیش از تعداد دفعات تعریف شده

شستشوی زیاد و یا استفاده از بافر با PH نامناسب یا دچار آلودگی باکتریال و قارچی منجر به دفع واکنش های اختصاصی ایمن کمپلکس و نهایتا افت و کاهش سیگنال یا رنگ نهائی می گردد.

- کاربرد فیلتر نامناسب در الایزا منجر به کاهش سیگنال می گردد

شروع انجام تست الایزا بدون انتظار جهت به دمای اتاق رساندن معرف ها و پلیت های کیت الایزا از جمله عوامل شایع افت سیگنال و کاهش رنگ می باشد

حرارت پائین محیط کار بخش الایزا خراب بودن سیستم گرمایش آزمایشگاه منجر به افت سیگنال و رنگ دهی واکنش و بسته به واکنش غیر رقابتی یا رقابتی منجر به افت یا افزایش کاذب مقادیر تست ها می گردد (خصوصا در شرایط که تست ها بدون استاندارد همزمان خوانده شوند)

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

High Background

- آلودگی چاهک به چاهک نمونه بیماران به دلیل مجاورت با کنترل مثبت یا استاندارد یا نمونه مثبت مجاور
- افزایش زمان انکوباسیون یا دمای انکوباسیون

انکوبه کردن بیش از حد یا در دمای بالا بر خلاف دستور العمل کیت منجر به افزایش سیگنال می گردد که به دلیل افزایش تعداد ترکیب های اتصالی نهائی می باشد

- شستشو کمتر از تعداد دفعات تعریف شده

این مسئله و یا استفاده از بافر با PH نامناسب یا دچار آلودگی باکتریال و قارچی منجر به عدم دفع واکنش های غیر اختصاصی و نهایتا افزایش سیگنال یا رنگ نهائی می گردد

- کاربرد فیلتر نامناسب در الایزا منجر به افزایش سیگنال می گردد

حرارت بالا محیط کار بخش الایزا خراب بودن سیستم سرمایش آزمایشگاه خصوصا در مناطق گرم و مرطوب شمال یا جنوب کشور منجر به تغییر سیگنال و رنگ دهی واکنش و بسته به واکنش غیر رقابتی یا رقابتی منجر به افت یا افزایش کاذب مقادیر تست ها می گردد (خصوصا در شرایطی که تست ها بدون استاندارد همزمان خوانده شوند)

- افزایش غلظت و تیتر کنژوگه

افزایش غلظت کنژوگه کیت الایزا به دلیل تبخیر یا تغلیظ (باز ماندن درب ظرف کنژوکه به مدت طولانی در حرارت اطاق در چند نوبت مکرر) یا اشتباه کارخانه سازنده در تعیین تیتر مناسب تبخیر و تغلیظ نمونه های استاندارد کیت به دلیل باز ماندن طولانی درب ویال استاندارد ها در چند نوبت مکرر.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- آلودگی پیپت و دیسپنسر مورد استفاده برای سوبسترا با معرف کنژوگه / عمدتا به دلیل اشتباه پرسنلی و استفاده مشترک از یک پیپت است
- آلودگی سوبسترا به یون های فلزی و اکسیدان ها یا مجاورت با نور که منجر به تشکیل رنگ زمینه ای آبی پر رنگ (پس از اختلاط سوبسترا و کروموژن) قبل از مجاورت با پلیت می گردد (جهت سوبسترا و کروموژن تیمیدین متیلن بلو)

منابع خطا شایع در روش ELISA

حداکثر زمان مجاز جهت نگه داری خون کامل جدا نشده در ۳۷ درجه ۵ دقیقه می باشد (زمان طولانی تر علاوه بر تخریب ساختار پروتئینی برخی هورمون ها و آ نالیت های حساس منجر به آزاد سازی برخی فاکتور های سرمی در محیط شده که منجر به افزایش کاذب جذب می گردد.

- ✓ نمونه حتی الامکان نبایست همولیز / لیپمیک یا ایکتریک باشد دلیل آن تداخل رنگ اضافی در واکنش رنگ سنجی الایزا ریدر است
- ✓ نمونه های هورمون یا سایر آنالیت ها حداکثر تا ۴۸ ساعت بدون شرایط انجماد در یخچال ۲-۸ درجه قابل نگهداری است و در زمان های بالای ۴۸ ساعت بهتر است در فریزر نگهداری شود.

ذوب و فریز مکرر نمونه منجر به کاهش سطح هورمون های سرم خصوصا هورمون های تیروئیدی می گردد لذا بهتر است اگر نمونه سرم در چند ردیف کاری نیاز به ذوب دارد در چند ویال فریز و در هر نوبت یک ویال دفریز گردد در ضمن نمونه سرم که از فریزر خارج می گردد به دلیل شیب غلظتی که در ته لوله حاصل شده است بایستی به خوبی قبل از استفاده میکس گردد و به حرارت اطاق رسانده شود.

- ✓ اجزا کیت پس از خروج از یخچال الزاما بایستی به حرارت اطاق و تعادل دمائی با محیط برسد. دمای پایین با کاهش سرعت واکنش انزیمی منجر به ایجاد جذب های غیر یکنواخت خصوصا در استریپ های ابتدائی پلیت می گردد
- ✓ رطوبت محیط کار ایمونواسی بایستی کمتر از 70 درصد باشد.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- ✓ اسیدی یا قلیائی شدن بافر (به دلیل الودگی قارچی یا باکتریال) منجر به افزایش یا کاهش کاذب جذب می گردد و PH اپتیمال پروسه فعالیت آنزیمی را از بین می برد لذا تهیه تازه به تازه بافر مورد نیاز در هر ردیف کاری قابل توصیه می باشد
- ✓ دمای محیط آزمایشگاه بایستی ۲۰ تا ۲۵ درجه باشد و با دماسنج دقیق روزانه کنترل و ثبت گردد . دمای بالا محیط افزایش کاذب جذب و بالعکس حاصل می نماید
- ✓ تغییرات دمائی مجاز انکوباتور ۳۷ درجه ۲± درجه باشد

خطای ناشی از شوک حرارتی به پلیت در آنزیم ایمونو اسی Edge effect (اثر لبه ای)

اثر لبه ای (می باشد که در قسمت مجاور درب انکوباتور 37 درجه و در مجاورت پنجره ها بر روی میز کار هورمون شناسی ممکن است بر روی پلیت رخ داده و منجر به ایجاد جذب های غیر یکنواخت در استریپ های شوک خورده و سایر استریپ می گردد(شوک سرمائی یا گرمائی) لذا قابل توصیه می باشد پلیت ها درعمق انکوباتور قرار داده شود و میز کار هورمون در مجاور پنجره یا سیستم های سرمایش و گرمایش نباشد

- ✓ ایجاد حباب هوا در چاهک های پلیت مانع تماس کامل کنژوکه و سرم یا بروز جذب های غیر یکنواخت می گردد
- ✓ استفاده از پارافیلم یا کاور چسبنده مناسب در سطح پلیت در هر مرحله از انکوباسیون الزامی بوده و مانع تبخیر و حضور گرد و غبار در محیط حساس واکنش انزیمی می گردد . تبخیر معرف ها منجر به بروز افزایش کاذب جذب نوری می گردد
- ✓ قرار دادن پلیت در تاریکی پس از اضافه نمودن سوبسترا و کروموژن الزامی است و مانع بروز واکنش جذب اضافی و کاذب می گردد
- ✓ کنترل معرف های کیت الایزا قبل از مصرف الزامی است که شامل:
- ✓ کنترل سلامت معرف سوبسترا و کروموژن با اختلاط حجم مساوی از کنژوکه و مخلوط سوبسترا و کروموژن در یک لوله نو جداگانه است که بایستی با تغییر رنگ سریع به رنگ آبی همراه باشد

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- ✓ کنترل ماکروسکوپی معرف های کیت به لحاظ کودرت ناشی از الودگی قارچی یا باکتریال و یا حضور جسم خارجی در معرف ها الزامی است. ظهور رنگ ابی در محلول کروموژن بی رنگ قبل از واکنش نهائی نشانه الودگی کروموژن به مواد اکسیدان و غیر قابل مصرف بودن آن می باشد
- ✓ تهیه محلول سوبسترا بیش از حد مورد نیاز و ماندن ان در محیط ازمایشگاه منجر به الودگی قارچی باکتریال معرف و بی اثر شدن معرف می گردد لذا محلول آماده به کار سوبسترا کروموژن بایستی حداکثر یک ساعت قبل از مصرف تهیه گردد و در تاریکی نگه داری گردد.
- ✓ ممانعت از تماس مستقیم دست با محلول کروموژن که حاوی حلال متانول و دی متیل سولفوکساید می باشد که سمیت داشته و دارای جذب پوستی می باشد
- ✓ میکس کردن آرام و زماندار کالیبراتور ها و نمونه ها قبل از شروع کار الزامی است
- ✓ با توجه به تغییر شرایط محیطی و پرسنلی در هر ردیف کاری استفاده از کالیبراتور ها در هر ردیف کاری الزامی است و استفاده از منحنی ذخیره شده در دستگاه صرفا جهت موارد ضروری و در صورت عدم دسترسی به کالیبراتورهای کیت قابل توجیه می باشد . استفاده از منحنی ذخیره کالیبراسیون از مهمترین منابع خطا های سیستماتیک در روش های ایمونو اسی می باشد.
- ✓ جابجائی لیبل ها در کالیبراتور در هنگام مونتاژ کیت ها امکان پذیر بوده و از علل مشاهده منحنی های غیر معتبر می باشد.
- ✓ در بوروشور کیت ها توصیه می گردد در اولین ردیف کاری استاندارد ها (کالیبراتور ها) دوپلیکیت (مضاعف) گذاشته شود تا ضریب دقت و صحت منحنی حاصل بالا برود
- ✓ در صورت عدم همخوانی کانال های سمپلر مولتی کانال(۸ کاناله) یا رسوب نمک در یکی از شاخه های سمپلرمولتی کانال یا واشر احتمال بروز جذب های غیر یکنواخت در نمونه ها و استاندارد های مضاعف وجود دارد
- ✓ زمان خیس خوردن soaking Time زمان خیس خوردن در فواصل شستشو بایست حداقل ۲۰ و حداکثر ۴۰ ثانیه باشد تا منجر به دفع اتصالات غیر اختصاصی از مجاور اتصالات اختصاصی گردد.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

- ✓ عدم تکان دادن پلیت(حداقل ۲۰ ثانیه) پس از اضافه نمودن محلول اسیدی توقف دهنده واکنش منجر به عدم اختلاط کامل اسید با معرف ها و عدم توقف کامل واکنش آنزیمی و در نهایت پیشرفت واکنش انزیمی در پایان کار و تغییرجذب نمونه ها و استاندارد ها و شیب منحنی کالیبراسیون در زمان های مختلف می گردد
- ✓ توجه به اینکه مسیر خوانش و عبور نور در میکرو پلیت الایزا از بالا به پایین است پاک نکردن کف پلیت قبل از خوانش نهائی با الایزا ریدر منجر به ظهور جذب های غیر یکنواخت می گردد خصوصا آلودگی کف پلیت به چربی سطحی پوست دست یا بافر سرریز شده و خشک شده یا الودگی سطح میز کار
- ✓ فاکتور روماتوئیدی مثبت در بیمار منجر به بروز نتیجه مثبت کاذب در تست های الایزا می گردد لذا گرفتن شرح حال و انجام یک تست روماتوئید فاکتور در افراد مشکوک کمک کننده می باشد .
- ✓ آلودگی چاهک به چاهک Well to well contamination ناشی از سرعت بالای

تخلیه یا تخلیه عمودی محلول به داخل میکرو پلیت می باشد یا به دلیل پرکردن بیش از حد بافر داخل چاهک ها می باشد . تکنیک صحیح تخلیه به طور مایل و چسبیده به جدار جانبی و فوقانی چاهک می باشد . جهت جلوگیری الودگی چاهک به چاهک در تست های کیفی یا کمی توصیه می گردد کنترل منفی ابتدا ریخته شود و سپس کنترل مثبت ریخته شود در ضمن تست مجاور کنترل مثبت به طور مضاعف و در انتهای پلیت مجددا ریخته شود .

- ✓ اثر قلابی یا تله ای Hook effect

همان پدیده پروزون در واکنش های ایمونواسی می باشد که به دلیل غلظت بسیار بالا انتی ژن بروز کرده و منجر به بروز جواب های منفی کاذب (بینابینی) می گرد د خصوصا در تست های کمی فریتین AFP/ TSH/ PSA/CA 125 اثر قلابی یا تله ای به دلیل پرشدن کلیه انتی ژن بایندینگ سایت ها ی کنژوگه توسط انتی ژن های فراوان موجود در محیط می باشد که به عبارتی با نوترالیزه کردن انتی ژن مانع تماس انتی ژن با آنتی بادی کف پلیت می گردد.

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

راه پیشگیری از اثر قلابی در کیت های الایزا :

- اضافه نمودن یک مرحله شستشو قبل از افزودن آنتی بادی نهائی (ثانویه)
- استفاده اولیه از رقت مناسب برای نمونه های سرم با استفاده از رقیق کننده
- خود کیت و در صورت عدم دسترسی استفاده از سرم افراد نرمال .

جذب زمینه ای بالای پلیت High back ground noise

زمانی که جذب بافر فسفات در چاهک (به تنهائی) بیش از ۰.۱ باشد می توان با اضافه کردن یک تا دو نوبت شستشو اضافی این اثر زمینه ای را ازبین برد در صورتی که جذب کنترل منفی کیت بالا باشد میتوان سایت های غیر اختصاصی را حذف و جذب نموده تا جواب های مناسب بدست آوریم.

- ✓ تنظیم فیلتر دستگاه توسط فیلتر خاکستری (گری فیلتر) در سه طول موج پایین و متوسط و بالا توسط شرکت پشتیبان (شش ماهه یا سالانه) منجر به افزایش اعتماد به صحت طول موج های اندازه گیری در الایزا ریدر می گردد.
- ✓ جهت کنترل تکرار پذیری فتومتر می توان از یک محلول رنگی یکنواخت و پایدار مثل دی کرومات پتاس در میکروپلیت استفاده نمود و دریافت جذب های یکنواخت نشانه سلامت سیستم نوری فتومتر است (در غیر این صورت جذب های غیر یکنواخت بدست می آید.

رانش در سنجش (DRIFT)

- ✓ رانش عبارت است از اختلاف غلظت حاصل از یک نمونه واحد در موقعیت های مختلف، یک پلیت در یک نوبت کاری، بهترین راه شناسائی رانش استفاده دوپلیکیت کنترل یا نمونه از قبل تعیین شده در ابتدا و انتهای پلیت در یک ردیف کاری می باشد. دلایل اصلی رانش در سنجش :

۱- شایعترین علت دریفت یا رانش سنجش تعداد آزمایش بالا در یک ران یا ردیف کاری می باشد به نحوی که بین افزودن محلول ها فاصله زمانی طولانی وجود داشته باشد.

۲- ناهمگونی بین چاهک ها

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118

۳- عدم رعایت ترتیب در ریختن ریژنت ها از ابتدا تا انتها پلیت

۴- سرد بودن معرف ها در هنگام شروع به کار منجر به اختلاف دما اولین چاهک با آخرین چاهک و رانش در سنجش می گردد

۵- مخلوط نشدن معرف ها در زمان ریختن به چاهک ها

۶- واکنش کند و سریع محلول متوقف کننده نهائی جهت توقف نهائی واکنش

تهران، خیابان ازادی، قبل از متروی استاد معین، خیابان مردی، پلاک ۱۱ واحد ۲
www.kushanzist.com 021 6638 1732
info@kushanzist.com 0921 8724 118