



عنوان دوره آموزشی

آشنایی با روش‌های آزمایشگاهی سرولوژی، خطاها و

روشهای آزمایش در بخش سرولوژی

بهار ۱۴۰۰

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

گروه‌های هدف

تکنسین، کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

اساس آزمایش های سرولوژی

روش های انجام آزمایشات سرولوژی

آزمایشات روتین سرولوژی

آزمایشات اختصاصی سرولوژی

بیماری های خود ایمنی

مدت دوره آموزشی:

۱۰ ساعت

ارزشیابی

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند، یک ارزشیابی از شرکت کنندگان به صورت تست‌های چهار گزینه‌ای بعمل خواهد آمد.

فهرست

عنوان دوره آموزشی	۱
سرولوژی	۸
عوامل مؤثر بر واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن	۸
انواع واکنش‌های سرولوژی	۹
منحنی رسوب	۱۰
اندازه‌گیری رسوب یا پراکندن نوری	۱۱
تکنیک‌های انتشار ایمنی غیرفعال	۱۲
تکنیک‌های الکتروفورز	۱۳
منابع خطا در الکتروفورز	۱۴
آگلوتیناسیون	۱۵
مراحل آگلوتیناسیون	۱۶
انواع واکنش‌های آگلوتیناسیون	۱۷
- تست آنتی گلوبولین مستقیم	۲۱
- تست آنتی هیومن آنتی گلوبولین غیرمستقیم	۲۱
منابع خطا در تست کومبس	۲۲
کنترل کیفی	۲۲
واکنش‌های مثبت و منفی کاذب در انجام تست‌های آگلوتیناسیون	۲۳
واکنش‌های مثبت کاذب	۲۳
واکنش‌های منفی کاذب	۲۴
سنجش‌های ایمنی لیپل شده	۲۵
خصوصیات بخش‌های لیپل شده	۲۶
بخش‌های رقابتی در برابر بخش‌های غیررقابتی	۲۶
آنتی‌بادی‌ها	۲۶
استانداردها یا کالیبراتورها	۲۷
تکنیک‌های جداسازی	۲۷
شناسایی لیپل	۲۷
کنترل کیفی	۲۷
رادایمونواسی	۲۸
مزایا و معایب روش رادایمونواسی	۲۹
روش (RAST) Radio Allegro Sorbent Test	۲۹
روش (RIST) Radio Immuno Sorbent Test	۲۹
روش‌های ایمونواسی آنزیمی	۳۰

۳۰ روش آنزیم ایمنونواسی هموزن
۳۰ روش آنزیم ایمنونواسی هتروژن
۳۱ روش آنزیم ایمنونواسی هتروژن یا الایزا
۳۱ انواع روش‌های جداسازی و فازهای جامد مورد استفاده
۳۲ فاز جامد
۳۳ آنزیم‌ها و سوبستراها
۳۴ سیستم آویدین- بیوتین
۳۴ Coating کوتینگ
۳۶ Washing شستشو
۳۶ Blocking مسدود کردن
۳۷ نمونه‌های مورد ارزیابی
۳۷ محلول کونژگه
۳۷ محلول سوبسترا و کروموزن
۳۸ محلول متوقف‌کننده (Stop solution)
۳۸ اندازه‌گیری شدت رنگ
۳۸ استانداردها و کالیبراتورها
۳۹ شرایط سنجش
۴۰ معرف‌ها
۴۰ تقسیم‌بندی انواع الایزا
۴۴ روش انجام الایزا
۴۵ منابع خطا در روش الایزا
۴۷ رفع مشکل در تست‌های الایزا
۵۴ نکات پیشنهادی در مورد برخی تکنیک‌های الایزا
۵۴ شستشو (Washing)
۵۵ شستشوی دستی (Manual Washing)
۵۵ شستشو با دستگاه‌های شستشوی پلیت یا استریپ
۵۹ اثر هوک (Hook effect)
۶۰ اثر لبه (Edge effect)
۶۰ تکنیک ایمنوفلورسانس (Immuno Fluorescent Assay (IFA))
۶۵ منابع خطا، نقاط ضعف و قوت ایمنوفلورسانس
۶۷ سنجش‌های ایمنی کمی لومینسانت (Chemiluminescent Immunoassays)
۷۰ کاربرد کمی لومینسانس در آزمایشات ایمنولوژیک
۷۲ مزایا و معایب و خطاها در روش کمی لومینسانس

۷۳ تکنولوژی‌های جدید استفاده از نشانگرها
۷۳ تکنیک LOCI (Luminescent Oxygen Channeling Immuno assay)
۷۳ تکنیک SQUID (Superconducting Quantum Interference Device)
۷۴ تکنیک Q Dots (Quantum Dots)
۷۴ تکنیک تقویت سیگنال (Signal Amplification Technology)
۷۴ تکنولوژی نشانگر مغناطیسی (Magnetic Labeling Technology)
۷۵ فلورواایمونواسی زمان معین (Time- Resolved Fluroimmuno assay)
۷۵ تکنولوژی DNA Chip- DNA Micro array
۷۶ هیبریداسیون در جای فلورسانس یا FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
۷۷ بروز خطا در روش‌های هیبریداسیون
۷۷ تکنیک فلوسایتومتری (Flow Cytometry)
۷۸ اجزاء دستگاه فلوسایتومتری
۷۸ سیلان‌شناسی (Fluidics)
۷۸ منبع نور
۷۹ نورشناسی Optics
۸۰ بخش الکترونیکی دستگاه جهت دریافت اطلاعات و آنالیز اطلاعات
۸۱ خلاصه‌ای از روش کار با فلوسایتومتری
۸۲ کاربرد بالینی فلوسایتومتری
۸۲ منابع خطا، مزایا و معایب روش فلوسایتومتری
۸۳ بیماری‌های خودایمن (Autoimmune disease)
۸۵ لوپوس اریتماتوس سیستمیک
۸۵ تشخیص آزمایشگاهی لوپوس اریتماتوز سیستمیک
۸۶ آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای
۸۷ آنتی‌بادی‌های آنتی فسفولیپیدی
۸۷ آرتریت روماتوئید
۸۹ تشخیص آزمایشگاه آرتریت روماتوئید
۹۰ بیماری‌های خودایمن تیروئید
۹۰ تست‌های آزمایشگاهی بیماری‌های خودایمن تیروئید
۹۲ دیابت ملیتوس نوع I
۹۲ تست‌های آزمایشگاهی بیماری دیابت خودایمنی
۹۳ سایر بیماری‌های خودایمنی
۹۳ بیماری مالیتهیل اسکروزیس MS

۹۴	تشخیص آزمایشگاهی بیماری MS
۹۵	بیماری میاستنیا گراویس MG
۹۵	تشخیص آزمایشگاهی بیماری MG
۹۵	سندرم گود پاسچر
۹۶	تشخیص آزمایشگاهی سندرم گود پاسچر
۹۶	تست آنتی‌بادی ضد کروماتین
۹۷	تست آنتی‌بادی ضد DNA
۹۷	تست آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن شیره هسته Anti-ENA
۹۷	آنتی‌بادی‌های ضد غشای پایه گلومرولی
۹۸	آنتی‌بادی ضد میتوکندری AMA
۹۸	آنتی‌بادی ضد میوکاردا AMA
۹۸	آنتی‌بادی سیتوپلاسمیک ضد نوتروفیلی ANCA
۹۹	تست ANA
۹۹	آنتی‌بادی ضد سلول پاریتال APCA
۱۰۰	آنتی‌بادی ضد اسکلودرمی
۱۰۰	آنتی‌بادی ضد عضله صاف ASMA
۱۰۰	آنتی‌بادی ضد اسپرما توزوئید
۱۰۱	آنتی‌بادی ضد AA-(Ro)، ضد SS-B (La) و ضد SS-C
۱۰۱	آنتی‌بادی‌های گلیادینی، Endomysial و آنتی‌بادی‌های ترانس گلوتامیناز بافتی
۱۰۲	درمان
۱۰۳	منابع

سرولوژی

سرولوژی به کلیه آزمایشات و مطالعاتی گفته می‌شود که بر روی سرم انسان یا حیوان خونگرم انجام می‌گیرد. آزمایش‌های سرولوژی بالینی، یکی از روش‌های سریع و آسان در تشخیص بیماری‌ها می‌باشند. اساس همه آزمایش‌های سرولوژی، واکنش آنتی‌بادی اختصاصی با آنتی‌ژن مربوطه می‌باشد. آنتی‌ژن مورد نظر می‌تواند باکتری، ویروس، گلبول قرمز، پروتئین، هورمون و یا مواد دیگر باشد. اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن، واکنشی اختصاصی، دو طرفه و برگشت‌پذیر بوده، زیرا در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن، پیوندهای ضعیف مانند پیوندهای هیدروفوب، هیدروژنی، یونی و واندروالسی مشارکت دارند.

عوامل مؤثر بر واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن

در واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، عوامل مختلفی تأثیر داشته از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ۱- میل اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن (اویدیتی Avidity)، هر چه قدرت اتصال یا میل پیوندی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن بیشتر باشد، کمپلکس آنتی‌بادی و آنتی‌ژن مشکل‌تر از یکدیگر جدا می‌شوند.
- ۲- pH محیط، مناسب‌ترین pH برای واکنش‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن ۷/۲ یا همان pH فیزیولوژیک بدن انسان می‌باشد. در pH‌های بالاتر (بازی) و یا پایین‌تر (اسیدی) اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن ضعیف می‌باشد. در میان کلاس‌های مختلف آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌بادی IgD نسبت به pH اسیدی بسیار حساس بوده و شکل طبیعی خود را از دست می‌دهد.
- ۳- قدرت یونی محیط، واکنش بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در محیط فاقد یون (مانند آب مقطر) صورت نمی‌گیرد. از طرفی، قدرت یونی زیاد نیز باعث رسوب آنتی‌بادی و آنتی‌ژن پروتئینی می‌شود. استفاده از سرم فیزیولوژی ۰/۱۵ مولار (۹ گرم NaCl در ۱ لیتر آب مقطر) برای رقیق کردن سرم بیمار و واکنش‌های سرولوژی، بسیار مناسب است.
- ۴- دما، مناسب‌ترین دما برای واکنش‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، دمای ۳۷°C (دمای فیزیولوژیک بدن انسان) می‌باشد. در دمای بالاتر از ۵۶°C به مدت ۳۰ دقیقه، آنتی‌بادی‌های IgE و IgD و همچنین کمپلمان سرم،

خواص بیولوژیکی خود را از دست داده و در دمای بالاتر از 70°C تمام کلاس‌های آنتی‌بادی ساختار خود را از دست می‌دهند.

۵- زمان، اتصال مولکول‌های آنتی‌بادی به آنتی‌ژن، معمولاً سریع و در عرض چند ثانیه صورت می‌گیرد. ولی برای تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و مشاهده واکنش، احتیاج به مدت زمانی مشخص دارد، این مدت برای هر روش آزمایش و نوع آزمایش متفاوت است.

اگر آنتی‌بادی از کلاس IgM باشد مولکول آنتی‌ژن درشت بوده و زمان مشاهده کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی کوتاه‌تر از زمانی است که آنتی‌بادی از کلاس IgG باشد.

IgM ساختمان پنتامری داشته یعنی از ۵ مونومر تشکیل شده و بنابراین از نظر تئوری دارای ۱۰ ناحیه اتصال به آنتی‌ژن یا پاراتوپ می‌باشد. در صورتی که IgG و سایر آنتی‌بادی‌های موجود در سرم تنها ۲ پاراتوپ وجود دارد.

۶- غلظت آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، اولین بار هایدلبرگ و همکارانش نشان دادند که غلظت آنتی‌بادی اختصاصی و آنتی‌ژن مربوطه باید با یکدیگر متناسب باشد تا تمامی آنتی‌بادی موجود در محیط به آنتی‌ژن مجاور متصل شده و حداکثر واکنش سرولوژی صورت گیرد.

انواع واکنش‌های سرولوژی

پرسیپیتاسیون: در پرسپیتاسیون آنتی‌ژن محلول به آنتی‌بادی محلول متصل و کمپلکس نامحلولی ایجاد می‌کند که قابل رؤیت می‌باشد. پرسپیتاسیون اولین بار در سال ۱۸۹۷ توسط Kraus کشف شد.

آگلوتیناسیون: در آگلوتیناسیون آنتی‌ژن‌های ذره‌ای (particulate) مثل سلول‌ها، در مقابل آنتی‌بادی اختصاصی مجتمع شده و کمپلکس‌های درشت‌تری ایجاد می‌کند.

فلوکولاسیون: اگر در واکنش سرولوژی آنتی‌ژن به صورت ذرات کلوئیدی باشد مانند کاردیولیپین عضله قلب گاو مانند آزمایش RPR برای تشخیص بیماری سیفیلیس واکنش را فلوکولاسیون گویند.

افینیتی (Affinity): اتصال اولیه محل‌های اتصال روی آنتی‌بادی با اپی‌توپ‌های اختصاصی (قسمت‌هایی از آنتی‌ژن که قدرت اتصال و همچنین قدرت تحریک سیستم ایمنی را بیشتر از بقیه ذره آنتی‌ژن دارند) روی

یک آنتی ژن به دو خصوصیت آنتی بادی یعنی افینیتی و اویدیتی بستگی دارد. افینیتی، نیروی اولیه جذب بین یک Fab روی مولکول آنتی بادی و یک اپی توپ یا شاخص واحد روی آنتی ژن مربوطه می باشد. این کار توسط چند پیوند غیر کووالان شامل پیوندهای یونی، پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای هیدروفوبی و نیروهای واندروالسی صورت می گیرد. فاصله بین آنتی ژن و آنتی بادی باید به قدری کم باشد تا این اتصال صورت گیرد و این فاصله تقریباً 1×10^{-7} mm باید باشد.

اویدیتی Avidity: جمع همه نیروهای جاذبه بین یک آنتی ژن و یک آنتی بادی را نشان می دهد. این حالت مستلزم قدرتی است که با آن آنتی بادی چند ظرفیتی به یک آنتی ژن چند ظرفیتی متصل می شود و اندازه اتصال کلی یک کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی می باشد. اویدیتی بالا، افینیتی پایین را جبران می کند. اتصال آنتی ژن - آنتی بادی برگشت پذیر بوده و شرایط ایده آل در آزمایشگاه بالینی، داشتن آنتی بادی با افینیتی بالا یا نیروی اولیه جذب بالا و اویدیتی بالا نشانگر قدرت اتصال بالا است. هرچه مقادیر و کمپلکس های آنتی ژن - آنتی بادی تشکیل شده بیشتر باشند، تست حساس تر است.

منحنی رسوب

ناحیه تعادل: علاوه بر افینیتی و اویدیتی آنتی بادی، رسوب به مقادیر نسبی آنتی ژن و آنتی بادی موجود نیز بستگی دارد. حداکثر میزان بهینه (optimal) رسوب در ناحیه تعادل رخ می دهد که در آن تعداد محل های چند ظرفیتی آنتی ژن و آنتی بادی تقریباً برابرند. در هر دو طرف ناحیه تعادل، به علت افزایش آنتی ژن یا آنتی بادی رسوب کاهش می یابد.

پروزون Prozone: در افزایش میزان آنتی بادی پدیده پروزون روی داده و در آن آنتی ژن فقط با یک یا دو مولکول آنتی بادی ترکیب می شود و بسیاری از مولکول های آنتی بادی به صورت آزاد در محلول باقی می ماند.

پست زون Post zone: در شرایطی که مقدار آنتی ژن زیاد باشد پدیده پست زون رخ می دهد که در این حالت نیز شبکه ای تشکیل نشده و واکنش های منفی کاذب در هر دو مورد می تواند روی دهد.

واکنش منفی کاذب در پرورزون به علت غلظت بالای آنتی‌بادی رخ می‌دهد و برای رفع این واکنش منفی کاذب با رقیق کردن آنتی‌بادی و انجام دوباره تست می‌توان نتیجه درستی به دست آورد.

در پدیده پُست‌زون به دلیل زیادی آنتی‌ژن نیز نتایج کاذب به دست آمده که با اندازه‌گیری مجدد آن بعد از یک هفته و تکرار آن می‌تواند نتایج دقیق‌تری به دست آورد. اگر در این شرایط تست منفی گردد، بعید است که بیماران آنتی‌بادی خاص را داشته باشد.

اندازه‌گیری رسوب یا پراکندن نوری

۱- توریدومتری (اندازه‌گیری رسوب یا پراکندن نوری):

رسوب دادن یکی از ساده‌ترین روش‌های نشان دادن واکنش بین آنتی‌ژن - آنتی‌بادی است. چون بیشتر آنتی‌ژن‌ها چند ظرفیتی بوده و می‌توانند در حضور آنتی‌بادی مربوطه تجمع حاصل نمایند. وقتی محلول‌های حاوی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مخلوط شوند کدورت اولیه یا رسوب قابل مشاهده است. این کدورت به وسیله توریدومتری (کدورت‌سنجی) اندازه‌گیری می‌شود. اندازه‌گیری کدورت یک محلول، شناسایی آن در خط مستقیم با نور متلاقی قرار داده شده و جمع‌آوری آن نور بعد از تجمع یافتن می‌باشد. کاهش شدت نور به علت انعکاس، جذب یا پخش آن اندازه‌گیری می‌شود. پراکنده شدن نور با سایز، شکل و غلظت مولکول‌های موجود در محلول متناسب است. اندازه‌گیری این نور به توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر یا یک آنالیزور خودکار انجام می‌گیرد.

۲- نفلومتری:

در این روش نوری که از یک سوسپانسیون می‌گذرد در زاویه خاصی از پرتو نور متلاقی، پخش می‌شود. مقدار نور پخش شده، شاخص غلظت محلول است. نفلومترها پراکندگی نور را در زاویه بین ۱۰ تا ۹۰ درجه اندازه‌گیری می‌کند. پایین‌ترین حد تشخیص $1-10 \text{ mg/L}$ بوده هر چند از این روش برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن استفاده می‌شود، ولی معمولاً برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی بیشتر کاربرد دارد. از این روش برای اندازه‌گیری پروتئین‌های سرمی و تعداد مقدار ایمونوگلوبولین‌هایی مانند IgG , IgM , IgA , IgE و زنجیره‌های سبک کاپا و لامبدا استفاده می‌گردد.

تکنیک‌های انتشار ایمنی غیر فعال

رسوب کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی در یک محیط پایه مانند ژل آگار (که یک پلی‌ساکارید پیچیده با وزن مولکولی بالا که از نوعی جلبک دریایی به دست می‌آید) پروسه انتشار را می‌توان بررسی و باندهای رسوبی را مشاهده نمود. بعد از افزودن واکنشگرها به ژل و ترکیب آنتی‌ژن- آنتی‌بادی به وسیله انتشار رخ می‌دهد. میزان انتشار تحت تأثیر اندازه ذرات، دما، چسبناکی ژل قرار می‌گیرد. غلظت آگار ۱/۵ تا ۳ درصد موجب انتشار بیشتر و حداکثری واکنشگرها می‌شود.

۱- انتشار ایمنی شعاعی:

در این روش آنتی‌بادی به داخل آگاروز در یک لوله آزمایش وارد شده، که قبلاً آنتی‌ژن در بالای لوله قرار گرفته و زمانی که آنتی‌ژن به داخل ژل حرکت کند، رسوب دیده می‌شود، این تکنیک امروزه تغییر یافته که به نام ایمنی شعاعی یا Radial Immunodiffusion در آزمایشگاه‌های بالینی استفاده می‌شود. در این تکنیک آنتی‌بادی به طور یکنواخت در ژل پایه توزیع شده و آنتی‌ژن به یک چاهک در ژل اضافه می‌شود. هنگامی که آنتی‌ژن به بیرون از چاهک پخش می‌شود، ترکیب آنتی‌ژن- آنتی‌بادی به نسبت‌های متغیر رخ داده تا به ناحیه تعادل برسد و شبکه ثابتی در ژل تشکیل شود. منطقه حلقه ایجاد شده مقدار غلظت آنتی‌ژن است و با یک منحنی استاندارد به دست آمده با استفاده از آنتی‌ژن‌های با غلظت شناخته شده مقایسه می‌شود.

۲- انتشار دوگانه اختزلونی:

در این روش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به طور مستقل در یک محیط نیمه جامد در دو جهت افقی و عمودی پخش می‌شوند. با افزودن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به چاهک‌ها بعد از یک دوره انکوباسیون ۴۸-۱۲ ساعته در یک محفظه مرطوب با حرکت رو به جلو آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، خط رسوبی تشکیل می‌شود. الگوهای نامنظم رسوبی ممکن است از زیاد پر شدن چاهک‌ها، نامنظم بودن سوراخ چاهک‌ها، انکوباسیون غیرسطح، خشک شدن ژل، زمان ناکافی، آلودگی قارچی یا باکتریایی ژل ایجاد شود.

تکنیک‌های الکتروفورز تیک

انتشار می‌تواند با الکتروفورز ترکیب شود. الکتروفورز مولکول‌ها را زمانی که در یک میدان الکتریکی قرار داده شوند مطابق بار الکتریکی‌شان جدا کند.

۱- ایمونوالکتروفورز موشکی:

این روش در سال ۱۹۶۰ ابداع گردید. این روش مشابه ایمونودیفیوژن شعاعی (RID) بوده که آنتی‌بادی در ژل توزیع شده و آنتی‌ژن در چاهک‌های ایجاد شده در ژل قرار داده می‌شود. فقط به جای این که اجازه دهیم انتشار در میزان خودش رخ دهد برای تسهیل حرکت آنتی‌ژن در آگار، از الکتروفورز استفاده می‌شود. به دلیل تغییر غلظت آنتی‌ژن با شروع انتشار رسوب آنتی‌ژن شروع شده و تشکیل مجدد رسوب خط رسوبی به شکل مخروط شبیه به موشک یا راکت، این تکنیک به نام راکت ایمونوالکتروفورز نامیده می‌شود. pH در این روش نقش مهمی داشته، pH به گونه‌ای انتخاب می‌شود که آنتی‌بادی‌ها در ژل با $pH = 8/6$ برای تعیین ایمونوگلوبین‌ها استفاده می‌شود.

۲- ایمونوالکتروفورز:

تکنیک انتشار دوگانه‌ای است که برای تقویت نتایج، جریان الکتروفورز با آن ترکیب می‌شود. این روش در سال ۱۹۵۳ توسط Williams و Grabar معرفی شد. از سرم برای بررسی مقدار آنتی‌ژن و جدا کردن بخش‌های پروتیین اصلی الکتروفورز استفاده می‌شود. سپس در ژل موازی با خط جدایی، یک حفره ایجاد می‌شود که آنتی‌سرم در حفره قرار داده شده و ژل به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه می‌شود. انتشار دوگانه در گوشه‌های سمت راست جدایی الکتروفورز رخ داده و خطوط رسوبی جایی که ترکیب اختصاصی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی رخ می‌دهد، ایجاد می‌شود. این خطوط یا قوس‌ها برای تشخیص اختلالات از نظر شکل، شدت و محل با خطوط یا قوس‌های سرم کنترل سالم مقایسه می‌شوند. این تکنیک یک روش کیفی و نیمه کمی است و در آزمایشگاه‌ها برای تشخیص میلوماها، ماکروگلوبولینمیای والدنشرتم، لنفومای بدخیم و اختلالات لنفوپرولیفراتیو استفاده می‌شود.

۳- ایمونوفیکساسیون الکتروفورز:

این روش مشابه ایمونوالکتروفورز بوده و به جای استفاده از آنتی سرم در حفره، مستقیماً در سطح ژل به کار می‌رود. به این علت از آگاروز یا استات سلولز استفاده می‌شود. در این روش به علت بالا بودن دقت و زمان کوتاه‌تر، واکنش در کمتر از یک ساعت رخ می‌دهد.

در اکثر موارد از یک آنتی‌بادی شناخته شده برای بررسی حضور یک آنتی‌ژن ناشناخته روی ژل استفاده می‌شود. رسوب‌های ایمنی در مکانی تشکیل می‌شوند که ترکیب اختصاصی آنتی‌ژن- آنتی‌بادی رخ دهد. این روش در تعیین آنتی‌بادها با غلظت کم موجود در سرم، ادرار یا مایع نخاعی مفید می‌باشد. از مایع نخاعی جهت تشخیص مالتیپل اسکلروزیس، از نمونه ادرار برای تشخیص پروتئین‌های بنس جونز استفاده می‌شود. یکی از بهترین سازگاری‌های شناخته شده این تکنیک، وسترن بلات بوده که به عنوان یک تست تأییدی برای تشخیص آنتی‌بادی ضد HIV-1 استفاده می‌شود.

منابع خطا در الکتروفورز

در همه تکنیک‌های الکتروفورتیک منابع خطا مشابه هم بوده:

۱) از مهم‌ترین خطاها کاربرد جریان الکتریکی می‌باشد. در صورت بروز این خطا نمونه‌ها در ژل جریان نیافته یا از همدیگر جدا نمی‌شوند. اگر جریان به اندازه کافی قوی نباشد ممکن است جدا شدن ناقص رخ داده و همچنین اگر جریان خیلی قوی باشد گرمای ایجاد شده ممکن است پروتئین‌ها را دناتوره کند.

۲) pH نادرست بافر و زمان نامناسب الکتروفورز همچنین مانع از جدایی صحیح باندها می‌گردد.

۳) غلظت‌های نامناسب آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی نیز از تشکیل شبکه و رسوب بارز جلوگیری کرده و از موارد خطا در این روش می‌باشد. غلظت هر یک از موارد زیاد باشد واکنش قابل رؤیتی حاصل نخواهد شد.

۴) پر کردن نامناسب چاهک با آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی (کم یا زیاد ریختن) نیز در ایجاد مناسب باندها اختلال ایجاد می‌کند.

۵) نمونه سرم، ادرار یا مایع نخاعی مورد آزمایش باید تازه بوده و از تبخیر شدن نمونه‌ها با پوشاندن سطح ظرف نمونه جلوگیری گردد. این امر نیز می‌تواند نتایج نامناسبی را به دست آورد.

۶) در استفاده از پلاسما به دلیل داشتن فیبرینوژن ممکن است به ماتریکس ژل چسبیده و در همه طرح‌های ژل یک باند اضافی ایجاد کند.

۷) در صورت نگهداری نمونه‌ها، باید در دمای $8-2^{\circ}\text{C}$ تا ۷۲ ساعت به صورت دربسته صورت گیرد.

۸) در صورت تهیه ژل به صورت دستی حتماً رقت آن به صورت دقیق تهیه گردد. در صورت استفاده از بسته ژل به صورت آماده این مورد به ندرت رخ می‌دهد.

۹) مدت زمان برقرای ولتاژ همانند دستورالعمل باید صورت گیرد، مدت زمان کم یا بیشتر می‌تواند در ایجاد باندها و جریان یافتن باندها اختلال ایجاد کند.

۱۰) در هر دوره کاری (RUN) حتماً از کنترل نرمال و سایر کنترل‌ها استفاده گردد.

آگلوتیناسیون

در روش‌های آگلوتیناسیون از آنتی‌ژن‌های ذره‌ای استفاده می‌شود. آگلوتیناسیون یک پروسه سه مرحله‌ای است:

مرحله اول: حساس‌سازی

مرحله دوم: تشکیل شبکه

مرحله سوم: تقویت تشکیل شبکه

انواع ذرات شرکت‌کننده در چنین واکنش‌هایی عبارتند از اربیتوسیت‌ها، سلول‌های باکتریایی، ذرات لاتکس (ذرات لاتکس: ذراتی از جنس پلی‌استیرن به اندازه ۵-۳ میکرون) می‌باشد. هر ذره باید چند شاخص آنتی‌ژنی داشته تا بتوانند توسط پل‌های آنتی‌بادی با شاخص‌های آنتی‌ژنی روی ذرات دیگر به طور متقاطع متصل شوند. در حال حاضر واکنش‌های آگلوتیناسیون کاربردهای وسیعی در تشخیص آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها دارند.

انجام این تست‌ها ساده بوده و به راحتی با چشم قابل مشاهده است. واکنش‌های آگلوتیناسیون به چند دسته تقسیم می‌شوند: مستقیم، پاسیو یا غیرمستقیم، پاسیو معکوس، مهار آگلوتیناسیون و کوآگلوتیناسیون.

مراحل آگلوتیناسیون

۱- حساس سازی

در این مرحله یک آنتی بادی شاخص آنتی ژنی روی یک آنتی ژن متصل شده و بدین ترتیب آنتی ژن و آنتی بادی می توانند با هم ترکیب می شوند. حساس سازی به ماهیت مولکول آنتی بادی بستگی داشته و کلاس ایمنوگلوبولین نیز در این امر مهم می باشد. مثلاً IgM ده ظرفیتی ۷۰۰ برابر کارآمدتر از IgG دو ظرفیتی در آگلوتیناسیون می باشد. بنابراین آنتی بادی های کلاس IgM آگلوتین های قوی تر هستند.

۲- تشکیل شبکه

در این مرحله ترکیبات آنتی ژنی- آنتی بادی بازآرایی انجام داده طوری که آنتی بادی از طریق یکی از محل های خود به آنتی ژن متصل و از طریق محل دیگر اتصال خود که آزاد می باشد، به یک شاخص آنتی ژنی روی یک مولکول آنتی ژن دیگر متصل شده و بدین ترتیب یک شبکه تشکیل و یک واکنش قابل رؤیت ایجاد می شود. این مرحله به شرایط محیطی مانند قدرت یونی محیط، pH، دما و غلظت نسبی آنتی ژن و آنتی بادی وابسته است.

۳- تقویت تشکیل شبکه

برای تشکیل شبکه یا ایجاد واکنش آگلوتیناسیون قابل رؤیت، بار سطحی باید کنترل شوند. یکی از راه های انجام این کار، کاهش قدرت یونی بافر با استفاده از محلول نمکی با قدرت یونی پایین است. همچنین افزودن آلبومین در غلظت های ۳۰-۵ درصد موجب خنثی شدن بار سطحی و نزدیک شدن مولکول ها (مانند گلبول قرمز) به یکدیگر می گردد.

تکنیک های دیگر که آگلوتیناسیون را تقویت می کند شامل افزایش ویسکوزیته، استفاده از آنزیم، سانتریفیوژ کردن، تغییر دما و یا pH می باشد.

با افزودن موادی مانند دکستران یا پلی اتیلن گلیکول (PEG) می‌توان ویسکوزیتی را افزایش داد. این ماده می‌تواند عوامل هیدراتاسیون اطراف سلول را کاهش داده و آنتی‌بادی‌ها را به هم نزدیک کرده تا به یکدیگر متصل شوند.

از آنزیم‌هایی مانند بروملین، پاپائین، ترپسین نیز برای تقویت آگلوتیناسیون استفاده می‌گردد.

با سانتریفیوژ کردن می‌توان تماس سلول-سلول را افزایش داده و آگلوتیناسیون را تشدید نمود.

بهترین مقدار pH زمانی است که $pH = 6/5 - 7/5$ باشد. در این pH بیشتر واکنش‌ها، ترکیب مناسب آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را ایجاد می‌کند.

انواع واکنش‌های آگلوتیناسیون

واکنش‌های آگلوتیناسیون آسان بوده و نیازی به تجهیزات پیچیده‌ای ندارند. واکنش آگلوتیناسیون در آزمایشات سرولوژی به فراوانی جهت تشخیص و شناسایی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی استفاده می‌شود. معمولاً بیشتر تست‌های آگلوتیناسیون کیفی بوده ولی برای به دست آوردن نتایج نیمه کمی، تهیه رقت باید صورت گیرد.

واکنش‌های آگلوتیناسیون متنوع بوده و بسته به ذره مورد استفاده در واکنش بین آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی که به آن متصل می‌شود طبقه‌بندی می‌گردد.

۱- آگلوتیناسیون مستقیم (Direct Agglutination)

وقتی آنتی‌ژن‌ها به طور طبیعی روی یک ذره وجود دارند، آگلوتیناسیون مستقیم رخ می‌دهد. نمونه آن تست ویدال است که یک تست غربال سریع برای تعیین احتمالی تب تیفوئید می‌باشد. آنتی‌ژن‌های استفاده شده در این روش شامل آنتی‌ژن‌های O (سوماتیک) و H (فلاژلی) می‌باشد.

اگر واکنش آگلوتیناسیون با سلول‌های قرمز خون انجام شود به آن هماگلوتیناسیون گفته می‌شود. بهترین مثال در این مورد تعیین گروه‌های خونی ABO می‌باشد. آنتی‌سرم‌های نوع IgM برای تعیین حضور یا عدم حضور آنتی‌ژن‌های A و B استفاده می‌شود. در حال حاضر کیت‌های هماگلوتیناسیون برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس مانند ویروس هپاتیت A، هپاتیت B، هپاتیت C و HIV نوع I و II وجود دارد.

۲- آگلوتیناسیون پاسیو یا غیرمستقیم (Passive Agglutination)

در این روش ذراتی مانند اریتروسیت‌ها، لاتکس، ژلاتین، سیلیکات استفاده شده که روی این ذرات با آنتی‌ژن پوشانده می‌شود. مزیت این روش در این است که استحکام، یکسانی و ثبات ایجاد شده و واکنش به راحتی با چشم قابل رؤیت می‌باشد.

اندازه ذرات از ۷-۸ میکرون بسته به روش استفاده از ذرات متفاوت می‌باشد و کوچک‌ترین اندازه معمولاً مربوط به ذرات لاتکس می‌باشد (۳-۵ میکرون).

در صورت استفاده از گلبول‌های قرمز بسیاری از آنتی‌ژن‌های پلی‌ساکاریدی به طور خودبه‌خود جذب گلبول‌های قرمز شده و احتمال بروز واکنش متقاطع به خصوص با آنتی‌بادی‌های هتروفیل می‌گردد.

در سال ۱۹۹۵ سینگر و پلوتز به طور اتفاقی دریافتند که IgG معمولاً به سطح ذرات لاتکس پلی‌استیرین جذب شده در حالی که موادی چون پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های باردار توسط این ذرات جذب نمی‌شوند.

ذرات لاتکس ارزان و نسبتاً پایدار بوده و در معرض واکنش‌های متقاطع با آنتی‌بادی‌های دیگر قرار نمی‌گیرند و تعداد زیادی از مولکول‌های آنتی‌ژن به ذرات لاتکس می‌توانند متصل شوند بنابراین تعداد محل‌های اتصال به آنتی‌ژن زیاد است.

از تست‌های آگلوتیناسیون غیرمستقیم برای شناسایی فاکتور روماتوئید، آنتی‌بادی ضد هسته موجود در بیماری لوپوس اریتماتوز، آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن استرپتوکوک A، آنتی‌بادی‌های ضد تریپونما پالیدوم و برخی آنتی‌بادی‌های ضد تعدادی از ویروس‌ها مانند روبلا، واریسلا، سیتومگال استفاده می‌شود. از این تست بیشتر جهت غربال موارد قید شده استفاده می‌گردد.

۳- آگلوتیناسیون پاسیو معکوس (Reverse Passive Agglutination)

در این تکنیک به جای آنتی‌ژن، آنتی‌بادی به ذره حامل متصل می‌شود. آنتی‌بادی واکنشگر بوده و باید طوری متصل شود که نقاط فعال آن رو به بیرون باشد. این نوع تست اغلب برای شناسایی آنتی‌ژن‌های میکروبی استفاده می‌گردد. امروزه کیت‌های متعددی برای شناسایی سریع آنتی‌ژن‌های عوامل عفونی مانند

استرپتوکوکوس گروه B، استافیلوکوکوس اورئوس، نایسریا مننژایتیدس، استرپتوکوک گروه A و B، هموفیلوس انفلولانزا، ویبریوکلرا موجود می‌باشد.

تست‌های سریع (Rapid) آگلوتیناسیون بیشترین کاربرد را در تشخیص آنتی‌ژن‌های محلول در ادرار، سرم و مایع نخاعی دارند. اساس این تست‌ها یکسان بوده، ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی‌بادی با نمونه بیمار دارای آنتی‌ژن مورد نظر واکنش می‌دهند. استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال تا حد زیادی از واکنش متقاطع جلوگیری می‌نماید.

از تست‌های آگلوتیناسیون پاسیو معکوس در شناسایی برخی ویروس‌ها مانند روتا ویروس و آدنو ویروس روده‌ای در کودکان مفید بوده و همچنین از این روش برای اندازه‌گیری سطح داروها، هورمون‌ها، پروتئین‌های پلاسمایی نظیر هاپتوگلوبین و CRP نیز استفاده می‌گردد.

در این واکنش‌ها فاکتور روماتوئید (RF) مثبت کاذب ایجاد می‌کند چون با هر آنتی‌بادی IgG واکنش می‌دهد، بنابراین این مورد باید گزارش شود.

آگلوتیناسیون پاسیو: آنتی‌ژن به ذره حامل متصل شده و اگر بیماری آنتی‌بادی داشته باشد، آگلوتیناسیون رخ می‌دهد.

آگلوتیناسیون پاسیو معکوس: آنتی‌بادی به ذره حامل متصل شده و اگر بیماری آنتی‌ژن داشته باشد آگلوتیناسیون رخ می‌دهد.

۴- مهار آگلوتیناسیون (Agglutination Inhibition)

واکنش‌های مهار آگلوتیناسیون براساس رقابت بین آنتی‌ژن‌های ذره‌ای و محلول برای محل‌های محدود ترکیب با آنتی‌بادی می‌باشد و عدم آگلوتیناسیون نشانه واکنش مثبت است. معمولاً در این واکنش از هاپتن‌هایی که با پروتئین‌ها کمپلکس شده‌اند و به دنبال آن کونژگه هاپتن- کریر به یک ذره کاربر متصل می‌شود، استفاده می‌گردد. نمونه بیمار با مقدار محدود آنتی‌بادی واکنشگر واکنش داده که برای هاپتن تست شده، سپس ذرات شناساگری که همان هاپتن مورد اندازه‌گیری در سرم را دارند به آن اضافه می‌گردد. اگر در نمونه بیمار هاپتن آزادی وجود نداشته باشد، آنتی‌بادی می‌تواند با ذرات کاریب ترکیب و آگلوتیناسیون قابل رؤیتی ایجاد

کند. در این تست با این که آگلوتیناسیون نشانه واکنش منفی است، ولی نشانگر آن است که بیمار هاپتن کافی برای مهار واکنش ثانویه ندارد و آنتی ژن یا آنتی بادی می توانند به ذرات متصل شوند.

حساسیت واکنش توسط اویدیتی خود آنتی بادی تعیین می شود. این تست برای سنجش مقادیر کم آنتی ژن بسیار حساس می باشد. شناسایی برخی داروها مانند کوکائین یا هروئین مثال هایی از این تست های خیلی حساس مهار آگلوتیناسیون می باشند.

مهار آگلوتیناسیون: آنتی بادی شناساگر به نمونه بیمار اضافه شده اگر در نمونه بیماری آنتی ژن وجود داشته باشد ترکیب آنتی ژن- آنتی بادی رخ می دهد. اگر ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی ژن اضافه شده آگلوتیناسیون ایجاد نکند نشانه یک تست مثبت می باشد. اگر در نمونه بیمار آنتی ژنی وجود نداشته باشد آنتی بادی شناساگر با ذرات لاتکس ترکیب شده و آگلوتیناسیون ایجاد می گردد که نشانه یک تست منفی است.

۵- کو آگلوتیناسیون (Coagglutination)

در این روش از باکتری ها به عنوان ذرات بی جان (ساکن) استفاده می شود که آنتی بادی به آن ها متصل می شود.

معمولاً از استافیلوکوکوس اورئوس در این تست ها استفاده می شود زیرا بر سطح بیرونی خود پروتئینی به نام پروتئین A داشته که آن هم در قسمت F_c مولکول های آنتی بادی را جذب می کند. نقاط فعال به سمت بیرون بوده و می توانند با آنتی ژن اختصاصی واکنش دهند. این ذرات نسبت به ذرات لاتکس پایداری بیشتری داشته و به تغییرات قدرت یونی مقاوم تر می باشند. از این تست ها برای شناسایی استرپتوکوک ها، نایسریا مننژایتیدیس، نایسریا گونوره، ویبریوکلرا ۱۳۹ و هموفیلوس انفولانزا استفاده می شود.

۶- آگلوتیناسیون به واسطه آنتی گلوبولین

تست آنتی گلوبولین انسانی معروف به تست کومبس (Coombs) تکنیکی که با اتصال به آنتی بادی دوم، آنتی بادی غیر آگلوتینه کننده را شناسایی می کند. این تست کاربری زیادی در بانک خون داشته و جزء اصلی

تست آنتی‌بادی ضد گلوبولین انسانی می‌باشد که با استفاده از تکنیک‌های هیبریدوما در حیوانات ساخته می‌شود. چنین آنتی‌بادی با بخش Fc آنتی‌بادی انسانی متصل به سلول‌های قرمز خون واکنش داده و آگلوتیناسیون رخ می‌دهد. به دلیل این که آنتی‌گلوبولین انسانی قادر به ایجاد پل بین سلول‌هایی که IgG دارند، نیست با افزودن آنتی‌هیومن آنتی‌گلوبولین پل مابین این ذرات ایجاد و در صورت تشکیل آگلوتیناسیون، مشاهده آن امکان‌پذیر می‌گردد.

تست کومبس به دو نوع تقسیم می‌شود، مستقیم و غیرمستقیم.

- تست آنتی گلوبولین مستقیم

تست آنتی گلوبولین مستقیم برای نشان دادن اتصال آنتی‌بادی یا کمپلمان به سلول‌های قرمز خون یک فرد در شرایط *in vivo* استفاده می‌شود. از این تست برای شناسایی آنمی همولیتیک خود ایمن، بیماری همولیتیک نوزادان، حساس‌سازی سلول‌های قرمز خون با حضور برخی داروها و واکنش در یک انتقال خون ناسازگار کاربرد دارد.

به این تست مستقیم گفته می‌شود چون سلول‌های قرمز خون مستقیماً در این تست استفاده می‌شود و برای خارج کردن هر گونه آنتی‌بادی اضافی از محیط که به طور اختصاصی به گلبول‌های قرمز نچسبیده‌اند، با سرم فیزیولوژی شستشو داده سپس مستقیماً سلول‌های قرمز خون را با آنتی‌بادی ضد IgG یا اجزاء کمپلمان مجاور می‌نماییم. آنتی‌هیومن آنتی گلوبولین اضافه شده به محیط می‌تواند مابین سلول‌های قرمز خون پل ایجاد کرده و باعث ایجاد آگلوتیناسیون قابل رؤیت شود. تست مثبت نشانه وجود واکنش ایمنی است.

- تست آنتی هیومن آنتی گلوبولین غیرمستقیم

این تست برای بررسی حضور یک آنتی‌بادی خاص در بیمار استفاده می‌شود. این تست یک پروسه دو مرحله‌ای بوده که در آن ابتدا سلول‌های قرمز خون با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده تا آنتی‌بادی‌های متصل نشده برداشته شوند، سپس با افزودن آنتی‌هیومن آنتی گلوبولین واکنش قابل رؤیتی در واکنش به دلیل وجود آنتی‌بادی اختصاصی متصل شده به سلول‌های قرمز روی می‌دهد.

از این تست برای وجود ناسازگاری‌های انتقال خون، ناسازگاری خون جنین و مادر در هنگامی که مادر Rh^- و جنین Rh^+ بوده، کنترل حضور آلو آنتی‌بادی در سرم استفاده می‌شود. این تست در دمای $37^{\circ}C$ صورت گرفته و پس از شستشوی سلول‌های قرمز خون آنتی هیومن آنتی گلوبولین اضافه و بعد از سانتریفیوژ کردن لوله‌ها از نظر آگلوتیناسیون بررسی می‌گردد.

منابع خطا در تست کومبس

- ۱- خوب شسته نشدن سلول‌های قرمز (شستشوی دفعات کم سلول‌ها)
 - ۲- سانتریفیوژ نامناسب و عدم رعایت مدت زمان سانتریفیوژ کردن (زمان کم یا زیادتر)
 - ۳- افزودن مقدار نامناسب آنتی هیومن آنتی گلوبولین (کم یا زیاد ریختن معرف) یا اضافه نکردن معرف آنتی هیومن آنتی گلوبولین
 - ۴- استفاده از آنتی هیومن آنتی گلوبولین که تاریخ مصرف آن گذشته
 - ۵- غلظت نامناسب سلول‌های قرمز خون (کم یا زیاد برداشتن حجم سلول قرمز)
 - ۶- رقت نامناسبی از سرم فیزیولوژی استفاده شده (اگر رقت سرم فیزیولوژی تهیه شده کم باشد سبب لیز سلول‌ها می‌گردد).
- برای جلوگیری از روی دادن موارد خطا در این تست توصیه می‌گردد همراه انجام تست حتماً از نمونه کنترل کیفی نیز استفاده گردد.

کنترل کیفی

اگر چه انجام واکنش‌های آگلوتیناسیون ساده بوده اما تفسیر باید به دقت صورت گیرد. استاندارد بودن تکنیک به غلظت آنتی‌ژن، زمان انکوباسیون، دما، رقت و روش خواندن بستگی دارد. احتمال واکنش متقاطع و آنتی‌بادی مداخله‌کننده در تست نیز وجود داشته باشد بنابراین برای جلوگیری از واکنش متقاطع می‌توان از آنتی‌بادی منوکلونال ضد یک شاخص خاص استفاده کرد. آنتی‌بادی هتروفیل و فاکتور روماتوئید دو آنتی‌بادی مداخله‌کننده‌ای هستند که موجب بروز نتیجه مثبت کاذب می‌شوند.

فاکتور روماتوئید با هر IgG موجود، واکنش خواهد داد و در تست‌های آگلوتیناسیون پاسیو معکوس یک مداخله‌گر محسوب می‌شود. این مورد را با افزودن یک پروناز Pronase یا عامل احیاءکننده مانند ۲ مرکاپتو اتانول به محیط نتایج مثبت کاذب را به علت وجود فاکتور روماتوئید IgM را کم کرد.

استفاده از سرم کنترل‌های مثبت و منفی در تست‌های آگلوتیناسیون ضروری است.

همه تست‌ها باید مطابق دستورالعمل و روش کار کارخانه سازنده تست آزمایش انجام گیرد.

مزایای واکنش‌های آگلوتیناسیون عبارتند از: سرعت، حساسیت نسبی، زمان کوتاه‌تر، مقرون به صرفه بودن، ارزان بودن و راحتی انجام تست، عدم نیاز به تجهیزات گران، استفاده از نمونه‌های حاوی میکروارگانیسم غیرزنده، انجام تست‌ها بر روی کارت یا اسلاید، لوله یا پلیت‌ها که به راحتی قابل انجام و قابل حمل می‌باشد.

لازم به ذکر است که تست آگلوتیناسیون ابزاری برای غربال هستند و نتیجه منفی، حضور بیماری یا آنتی‌ژن را منتفی نمی‌کند.

اگر مقدار آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی کمتر از مقدار حساسیت سیستم تست باشد احتمال به دست آوردن نتایج منفی کاذب وجود دارد.

واکنش‌های مثبت و منفی کاذب در انجام تست‌های آگلوتیناسیون

واکنش‌های مثبت کاذب

- ۱- زیاد سانتریفیوژ کردن: رسوب ته لوله محکم بوده و حتی با تکان دادن سوسپانسیون به سختی قابل مشاهده می‌باشد. برای تصحیح سرعت و زمان مناسب مورد استفاده قرار گیرد.
- ۲- آلوده بودن وسایل شیشه‌ای: اسلایدها کاملاً تمیز شسته نشده و اثر چربی دست، گرد و خاک، ته‌مانده معرف‌های دوره قبلی در صورت خوب شسته نشدن اسلایدها، باقی ماندن مقداری از مواد شوینده مانند دترجنت‌ها در صورت خوب آبکشی نشدن اسلایدها.
- ۳- آگلوتیناسیون خودبه‌خودی: توده شدن سلول‌ها بدون افزودن آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن اختصاصی به دلیل عدم شستشوی کافی سلول‌های قرمز، وجود ذرات فیبرینوژن در سرم، خراب شدن معرف‌ها، عدم تکان دادن کافی معرف (آنتی‌ژن‌ها).

۴- سالیان (سرم فیزیولوژی) نگهداری شده به مدت طولانی در بطری‌های شیشه‌ای احتمال وارد شدن سیلیکاهای کلئیدال به سالیان وجود داشته و برای نگهداری سالیان ظرف‌های پلاستیکی توصیه می‌شود.

۵- واکنش متقاطع: بهتر است برای جلوگیری از بروز واکنش متقاطع از آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی استفاده کرد.

۶- حضور فاکتور روماتوئید: خارج کردن فاکتور روماتوئید از محیط به توسط مواد احیاءکننده

۷- حضور آنتی‌بادی هتروپیل: این حالت موقعی رخ می‌دهد که از سلول‌های قرمز خون به عنوان ذره کریر استفاده شود.

۸- تأخیر در خواندن تست اسلاید: آنتی‌ژن خشک شده ممکن است مشابه آگلوتیناسیون به نظر آید. بنابراین رعایت مدت زمان قید برای هر تست حتماً رعایت شده و بلافاصله بعد از آگلوتیناسیون خوانده شود.

۹- بررسی تست‌های اسلایدی در زیر چراغ مطالعه به دلیل ایجاد گرما و طولانی شدن بررسی اسلاید زیر چراغ احتمال ایجاد آگلوتیناسیون مثبت کاذب را موجب می‌شود.

واکنش‌های منفی کاذب

۱- سانتیفریوژ کردن کمتر از مدت زمان مورد نیاز: در این حالت مدت زمان کافی جهت واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی وجود نداشته و زمان کافی جهت به هم نزدیک شدن و انجام واکنش صورت نمی‌گیرد.

۲- عدم شستشوی کافی سلول‌ها به خصوص در تست آنتی گلوبولین، آنتی‌بادی‌های اضافی از محیط خارج نمی‌شوند.

۳- نگهداری نامناسب معرف‌ها: عدم استفاده از دمای مناسب قید شده بر روی معرف‌ها، قرار دادن معرف در فریزر و یا دمای اتاق در مدت طولانی موجب خراب شدن معرف‌ها می‌گردد.

۴- دمای نامناسب انکوباسیون: دمای کم یا بالاتر از مورد نیاز موجب عدم همراهی آنتی‌ژن با آنتی‌بادی می‌گردد.

۵- زمان ناکافی انکوباسیون: زمان نامناسب برای انکوباسیون به خصوص زمان کم منجر به عدم همراهی آنتی‌ژن با آنتی‌بادی می‌گردد.

۶- پدیده پروزون Prozone: مقدار آنتی‌بادی زیادتر از مقدار آنتی‌ژن بوده و باید برای رفع این حالت آنتی‌بادی مورد استفاده رقیق شده و تست دوباره انجام شود.

۷- عدم افزودن معرف آنتی گلوبولین یا افزودن مقدار ناکافی از آنتی گلوبولین این حالت در آزمایش آنتی گلوبولین مستقیم و غیرمستقیم بیشتر رخ می‌دهد.

۸- عدم رساندن کلیه معرف و نمونه‌ها به دمای اتاق که در این صورت به دلیل سرد بودن معرف‌ها واکنش کند و با تأخیر رخ خواهد داد.

۹- استفاده از حجم‌های نامناسب یا کم از معرف‌ها یا نمونه‌ها که در این صورت واکنش مناسب رخ نخواهد داد.

سنجش‌های ایمنی لیبل شده

نیاز به سنجش‌های سریع، اختصاصی و حساس به منظور تعیین حضور مولکول‌های بیولوژیکی فعال در آزمایشگاه بالینی هر روز بیشتر احساس می‌شود بنابراین بخش‌های ایمنی لیبل شده برای آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌هایی طراحی شده‌اند که اندازه کوچک داشته یا غلظت خیلی کمی دارند. در این روش هورمون‌ها، داروها، تومورمارکرها، ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی اندازه‌گیری می‌شود. در این روش به ماده‌ای که اندازه‌گیری می‌شود آنالیت گفته می‌شود. آنالیت به مولکول‌هایی متصل می‌شوند که به طور اختصاصی با آن‌ها واکنش می‌دهند که این ماده معمولاً آنتی‌بادی‌ها هستند. یک واکنشگر، آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی طوری با یک مارکر لیبل می‌شود که بتوان مقدار اتصال را کنترل کرد. بخش‌های ایمنی لیبل شده، اندازه‌گیری‌های کمی سریع بسیاری از مواد مهم نظیر آنتی‌ژن‌های ویروسی مانند HIV را ممکن می‌سازد.

خصوصیات بخش‌های لیبل شده

بخش‌های رقابتی در برابر بخش‌های غیررقابتی

در متدهای معمول آزمایشگاهی از لیبل‌های فلورسنت، رادیواکتیور، لومینانت و آنزیمی استفاده می‌گردد. اصول همه این تکنیک‌ها یکسان بوده و برای همه بخش‌های لیبل شده دو قالب اصلی وجود دارد: رقابتی و غیررقابتی

۱- در یک بخش ایمنی رقابتی، همه واکنشگرها همزمان مخلوط شده و آنتی‌ژن لیبل شده با آنتی‌ژن لیبل نشده بیمار برای تعداد محدود نقاط اتصال به آنتی‌بادی رقابت می‌کند. مقدار لیبل متصل شده با غلظت آنتی‌ژن لیبل شده نسبت عکس دارد. این بدین معنی است که هر چه لیبل بیشتری وجود داشته باشد، آنتی‌ژن موجود در نمونه کمتر است.

۲- در یک سنجش ایمنی غیررقابتی معمول، آنتی‌بادی اغلب به نام آنتی‌بادی گیرنده (Capture antibody) اول به طور غیرفعال به یک فاز جامد جذب می‌شود. سپس آنتی‌ژن ناشناخته بیمار با آنتی‌بادی واکنش داده و توسط آن گرفته می‌شود. پس از شستشو برای برداشتن آنتی‌ژن متصل نشده، آنتی‌بادی دوم لیبل شده به واکنش اضافه می‌شود. در این حالت مقدار لیبل اندازه‌گیری شده با مقدار آنتی‌ژن بیمار متناسب است. لازم به ذکر است که در هر دو نوع سنجش، لیبل نباید واکنشگری مولکول را تغییر دهد. مواد رادیواکتیو، آنزیم‌ها، ترکیبات فلورسنت و مواد لومینانس همگی به عنوان لیبل استفاده می‌شدند.

آنتی‌بادی‌ها

در هر بخش، آنتی‌بادی استفاده شده باید افینیتی بالایی برای آنتی‌ژن مورد نظر داشته باشد. بنابراین هر چه افینیتی آنتی‌بادی برای آنتی‌ژن بیشتر باشد، مقدار آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی بیشتر و اتصال اختصاصی‌تری جهت اندازه‌گیری، وجود دارد. حساسیت نهایی سنجش ایمنی در واقع تا حد زیادی به مقدار افینیتی بستگی دارد. آنتی‌بادی استفاده شده باید برای هر آنتی‌ژن موجود در واکنش کاملاً اختصاصی بوده و این امر با کشف آنتی‌بادی‌های منوکلونال فراهم شده که توانایی شناسایی مقدار کم آنالیت با درستی زیاد را امکان‌پذیر می‌سازد.

استانداردها یا کالیبراتورها

استانداردها یا کالیبراتورها آنالیت‌های لیبل نشده‌ای که در غلظت‌های مشخصی از ماده مورد اندازه‌گیری تهیه می‌شوند. مقادیر متفاوتی از استانداردها به مخلوط‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن اضافه می‌شوند تا اثر خود را روی اتصال واکنشگر لیبل شده، نشان دهد. سپس به توسط ابزاری این اطلاعات را مقایسه و نمودار رسم (نمودار خطی نیست) شده غلظت آنالیت ناشناخته را تعیین می‌کند.

تکنیک‌های جداسازی

در بیشتر بخش‌های واکنش رخ داده بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی باید مرحله‌ای برای جداسازی آنالیت واکنشگر از آنالیت غیرواکنشگر وجود داشته باشد. برای حل این مورد معمولاً از یک حامل سطح جامد استفاده می‌شود. برای این منظور از موادی چون لوله‌های آزمایش پلی استیرن، پلیت‌های میکروتیتر، مهره‌های شیشه‌ای یا پلی استیرن، مهره‌های مغناطیسی و غشاهای سلولزی استفاده می‌شود. با جذب فیزیکی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی به این سطوح و هنگامی که اتصال اختصاصی روی دهد این کمپلکس به سطح جامد می‌چسبند. بخش‌های متصل نشده به توسط روش‌هایی مانند سانتریفیوژ کردن، استفاده از فیلتر و یا شستشو دادن، آنالیت‌های متصل نشده از محیط خارج می‌شوند.

شناسایی لیبل

مرحله انتهایی مشترک بین همه روش‌های بخش ایمنی، شناسایی آنالیت لیبل شده است. این سیستم‌ها شامل شمارش رادیواکتیویته، اندازه‌گیری لیبل‌هایی مانند آنزیم‌ها، مواد فلورسنس یا اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود.

کنترل کیفی

در اندازه‌گیری آنالیت‌ها به دلیل وجود مقدار بسیار کم این آنالیت در محیط، لازم است که حتماً از روش‌های کنترل کیفی به همراه سنجش نیز استفاده شود. برای کم کردن خطاهای تصادفی، انجام تست باید کنترل گردد. باید از نمونه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت، نمونه شاهد به همراه سنجش استفاده گردد.

رادایوایمونواسی

در اواخر سال ۱۹۵۰ برای اولین بار روش سنجش ایمنی با مواد رادیواکتیو یا رادیوایمونواسی (RIA) توسط Berson و Yalow ابداع شد. در ابتدا از این روش جهت تعیین سطح کمپلکس انسولین-آنتی انسولین در بیماران دیابتی استفاده می‌شد. در این روش از یک ماده رادیواکتیو به عنوان لیبل استفاده می‌گردد. عناصر رادیواکتیو ذراتی هستند که خودبه‌خود تخریب و ماده و انرژی از آن ساطع می‌گردد. چند لیبل رادیواکتیو مانند ^{131}I ، ^{125}I ، ^3H در سنجش‌ها به کار رفته ولی ^{125}I بیشتر از بقیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ^{125}I نیمه عمر ۶۰ روزه داشته و به راحتی وارد مولکول‌های پروتئین می‌شود، اشعه گاما ساطع شده توسط دستگاه گاما کانتور شناسایی و مقادیر بسیار کم رادیواکتیو توسط دستگاه گاما کانتور به راحتی قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

اساس در روش RIA ابتدا به صورت اتصال رقابتی بوده و آنالیت شناسایی شونده برای تعداد محدود محل‌های اتصال روی یک آنتی‌بادی با افینیتی بالا با یک آنالیت رادیو لیبل رقابت می‌کند. اگر غلظت آنالیت رادیواکتیو زیاد باشد همه محل‌های اتصال روی آنتی‌بادی اشغال خواهند شد. اگر در نمونه بیمار آنتی‌ژن وجود داشته باشد برخی از نقاط اتصال با آنالیت لیبل نشده اشغال می‌شود و مقدار لیبل رادیواکتیو متصل شده کاهش یافته و زمانی که آنتی‌ژن‌های رادیو لیبل متصل و آزاد، جدا و شستشو داده شوند، مقدار لیبل در فاز متصل به طور غیرمستقیم متناسب با مقدار آنتی‌ژن بیمار است.

محدودیت‌های شناسایی بخش‌های رقابتی تا حد زیادی توسط افینیتی آنتی‌بادی تعیین می‌شوند. این محدودیت‌ها 10 fmol/L یا $600,000$ مولکول در یک حجم نمونه $100\ \mu\text{L}$ محاسبه می‌شوند.

در روش RIA، آنتی‌ژن لیبل شده برای تعداد محدود نقاط اتصال روی آنتی‌بادی فاز جامد با آنتی‌ژن موجود در نمونه رقابت می‌کند. اگر در نمونه بیمار مقدار آنتی‌ژن خیلی کم باشد در این حالت رادیواکتیویتی فاز جامد بالا بوده و برعکس اگر در نمونه بیمار مقدار آنتی‌ژن بیشتری وجود داشته باشد رادیواکتیویتی فاز جامد نسبت به مقدار آنتی‌ژن متصل در نمونه کاهش می‌یابد.

مزایا و معایب روش رادیوایمونواسی

RIA تکنیک بسیار حساس و دقیقی برای اندازه‌گیری مقادیر کم آنالیت‌ها با اندازه کوچک بوده، از این روش بیشتر جهت تشخیص و اندازه‌گیری هورمون‌ها، تومور مارکرها، پروتئین‌های مختلف مانند آلفا فیتوپروتئین، CEA و IgE، ویتامین‌ها، داروها مانند دیگوکسین و مشتقات باربیتورات‌ها، آنزیم‌هایی مانند پپسین و تریپسین، اتو آنتی‌بادی‌ها، هاپتن‌ها و سایتوکاین‌ها استفاده می‌شود.

حتی در برخی از تکنیک‌های پیشرفته‌تر با حساسیت بسیار بالا می‌توان غلظت‌هایی در محدوده ng/mL یا حتی کمتر را نیز سنجید.

از معایب روش RIA هزینه بالای تجهیزات و معرف‌ها، نیمه عمر پایین ترکیبات رادیو لیبل و از همه مهم‌تر مشکلات مربوط به دفع پسماندهای مواد رادیو لیبل که موجب آلودگی محیط‌زیست و همچنین احتمال آلودگی کادر و خطر سلامتی برای افراد وجود دارد. امروزه از این تکنیک به دلیل ابداع روش‌های حساس‌تر با آلودگی کمتر، ارزان و کاربرد راحت‌تر، کمتر استفاده می‌شود.

روش Radio Allegro Sorbent Test (RAST)

این تست در سال ۱۹۶۸ برای اولین بار توسط Wide و همکارانش جهت تشخیص آنتی‌بادی IgE اختصاصی ضد آلرژن ابداع شد. این تست جز تست‌های نسل اول تشخیص آلرژی بوده جهت غربالگری در بیماران مبتلا به آلرژی به خصوص افرادی که واکنش شدید پوستی نشان می‌دادند، استفاده می‌شد. امروزه این روش تقریباً منسوخ شده است.

روش Radio Immuno Sorbent Test (RIST)

این تست نیز یکی از روش‌های اندازه‌گیری IgE توتال سرم است که از یک فاز جامد که در آن آنتی‌بادی ضد IgE انسانی به آن متصل است، استفاده می‌شود.

روش‌های ایمنونواسی آنزیمی

در روش آنزیم ایمنونواسی EIA از نشانگرهای آنزیمی استفاده شده که پس از واکنش با سوبسترای مناسب تولید محصولی که معمولاً کروموفوریک هستند، استفاده می‌گردد. براساس نیاز یا عدم نیاز به مرحله جداسازی و فاز واکنش، این روش‌ها به دو گروه هتروژنوس و هموژنوس تقسیم می‌شوند.

در ایمنونواسی هتروژن پس از انجام واکنش ایمنی هیچ تغییری در فعالیت ماده نشاندار متصل به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی رخ نمی‌دهد و نیاز به روش‌های جداسازی فیزیکی جهت جدا کردن آنالیت‌های نشاندار از غیر نشاندار است، اما در روش‌های هموژن پس از وقوع واکنش فعالیت ماده نشاندار تغییر می‌کند در واقع فعالیت آنزیم کاهش یافته و نیازی به فرآیند جداسازی نمی‌باشد.

روش آنزیم ایمنونواسی هموژن

این روش‌ها حساسیت کمتری از روش‌های هتروژن داشته ولی سریع‌تر و آسانتر بوده و به راحتی اتوماسیون می‌شوند و نیاز به مرحله شستشو ندارند. این روش برای اندازه‌گیری آنالیت‌ها با وزن مولکولی کم مانند هورمون‌ها و اندازه‌گیری داروها در سرم و ادرار به کار می‌روند. اساس روش ایمنونواسی هموژن بر مبنای تغییر فعالیت آنزیمی است که در آن آنتی‌ژن با آنزیم به گونه‌ای نشاندار می‌شود که با اتصال آنتی‌بادی به شاخص‌های آنتی‌ژنی موجود در مولکول آنتی‌ژن جایگاه فعال آنزیم مسدود شده و به دنبال آن فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. که این کاهش فعالیت قابل اندازه‌گیری است. حساسیت در این روش حدود میکروگرم در میلی‌لیتر است.

روش آنزیم ایمنونواسی هتروژن

به روش‌های EIA هتروژن، به طور کلی و اصطلاحاً الایزا ELISA گویند که مخفف Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay می‌باشد.

در حالت کلی روش‌های هتروژن دارای ویژگی‌های زیر می‌باشند:

۱- یکی از اجزای واکنش آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی به فاز جامد متصل است.

۲- واکنش مابین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی اثری بر فعالیت آنزیم نداشته و در نتیجه در هر حالتی چه کونژگه آزاد بوده یا غیرآزاد، آنزیم با اثر بر سوبسترا می‌تواند محصول تولید کند.

۳- در طی مراحل آزمایش به عمل شستشو washing نیاز بوده تا آنالیت‌های آزاد و غیرباند شده از آنالیت‌های متصل به فاز جامد جدا شوند.

به طور کلی EIA هتروژن را می‌توان به اشکال رقابتی Competitive، غیررقابتی Non Competitive، ساندویچ یا capture assay مستقیم و غیرمستقیم طراحی کرد.

روش آنزیم ایمنونواسی هتروژن یا الایزا

الایزا یک تکنیک بیوشیمیایی است که بیشتر در ایمنولوژی جهت تشخیص آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن در یک نمونه به کار می‌رود. در این روش ایمنولوژیک کمی، واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط Engvall و Perlam این روش مطرح شد و امروزه به عنوان یک روش بسیار دقیق و کارآمد در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تحقیقاتی نقش ویژه‌ای را ایفا می‌کند. از این روش در تشخیص بیماری‌های عفونی مانند HIV، HBV، HCV، توکسوپلاسما، سرخک، سرخچه و بسیاری از بیماری‌ها به کار می‌رود. همچنین در تشخیص آلرژن‌ها در محیط و مواد غذایی، اندازه‌گیری اتو آنتی‌بادی‌ها در بیماری‌های اتوایمیون مانند لوپوس، آرتریت روماتوئید، اندازه‌گیری توکسین‌ها، غربالگری اهداکنندگان خون از نظر بیماری‌های عفونی و مسری، اندازه‌گیری سطح هورمون‌ها در سرم و مایعات بدن کاربرد بسیار وسیعی دارد.

انواع روش‌های جداسازی و فازهای جامد مورد استفاده

در روش‌های ایمنونواسی، مرحله جداسازی علاوه بر جدا کردن ماده نشان‌دار آزاد از اتصال یافته، باعث جداسازی آنزیم‌های اندوژن از نمونه نیز می‌گردد، که ممکن است در اندازه‌گیری تداخل ایجاد کند. جهت جداسازی استفاده از فاز جامد رایج‌ترین روش بوده و اتصال آنتی‌بادی و یا آنتی‌ژن به فاز جامد از طریق جذب سطحی غیرفعال یا کووالان صورت می‌گیرد. آنتی‌بادی‌هایی که به این سطوح اتصال می‌یابند به نام

Immunsorbent یا Immunoabsorbent نامیده می‌شوند. به دلیل متصل بودن آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن به فاز جامد جداسازی به سادگی صورت می‌پذیرد. جداسازی جز آزاد از متصل در انواع مختلف از طریق شستشو انجام شود. فاز جامد در تکرارپذیری، صحت و حساسیت تست دخالت دارد. سادگی روش باعث افزایش روزافزون استفاده از این روش می‌باشد.

فاز جامد

اتصال مناسب آنتی‌بادی به سطح جامد در طی مدت نگهداری و زمان سنجش باید به دقت صورت گیرد تا از کاهش حساسیت و دقت تست جلوگیری گردد.

پلی استیرن و انواع دیگر مواد پلاستیکی مانند پروپیلن و پلی‌وینیل کلراید شایع‌ترین انواع فاز جامد بوده که مورد استفاده قرار می‌گیرند. زیرا فرآیند کوتینگ (Coating) که همان اتصال آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی به فاز جامد است، در آن‌ها به سادگی و سهولت صورت می‌پذیرد. پلی‌وینیل کلراید از شفافیت کافی برخوردار نیست بنابراین کمتر استفاده می‌شود. پلی استیرن قدرت چسبندگی کمتری داشته اما شفافیت بسیار بالایی دارد به این دلیل بیشتر از بقیه مواد پلاستیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فازهای جامد پلاستیکی به اشکال مختلف لوله، چاهک، بیدهای پلاستیکی وجود دارند. از دیگر فازهای جامد مورد استفاده در ایمونواسی غشاهای نیترو سلولزی و پلی‌وینیل دی فلوراید می‌باشد. در حال حاضر پلیت‌های Micro titer در الایزا کاربرد بیشتری دارند و رایج‌ترین نوع فاز جامد مورد استفاده می‌باشند. این پلیت‌ها به صورت پلیت‌های حاوی ۴۸، ۹۶ و ۲۰۰ چاهک وجود داشته ولی پلیت حاوی ۹۶ چاهک بیشترین کاربرد را دارد. همچنین این چاهک‌ها به انواع مختلف و به اشکال تخت، گرد یا V شکل وجود دارند. در قرائت به وسیله چشم چاهک‌های V شکل و یا ته‌گرد مناسب بوده ولی در قرائت فتومتریک باید از چاهک با ته تخت U شکل استفاده شده است. اغلب فازهای جامد در روش الایزا هیدروفوبیک بوده بنابراین توانایی برهمکنش ثانویه هیدروفوب حتی زمانی که واکنش اولیه به صورت کووالان باشد فراهم می‌شود. از فواید اتصال کووالان می‌توان به اتصال بیشتر پروتئین، کنترل دقیق‌تر کوتینگ، پایداری بیشتر اتصالات کووالان، به حداقل رساندن میزان پروتئین مورد نیاز جهت کوتینگ (حذف یا به حداقل رساندن پدیده چند لایه‌ای شدن Multilayer) اشاره کرد. همچنین از

ایجاد اتصالات اتفاقی جلوگیری خواهد شد. در اتصالات کووالان، اتصال در نقاط کمی روی داده و بنابراین اثر Gulliver که سبب تخریب پروتئین‌های بزرگ در اثر اتصال به فاز جامد ایجاد می‌شود، نیز اتفاق نمی‌افتد. با اتصال پروتئین به فاز جامد احتمال تغییر شکل فضایی و به دنبال آن تغییر ماهیت آن وجود دارد و زمانی که غلظت معرف کم است این تغییرات بیشتر اتفاق می‌افتد. این تغییر ساختار را به توسط جذب همزمان Coabsorbe با آلبومین یا یک پروتئین غیراختصاصی دیگر تا حدودی بهبود بخشید. پروتئین‌ها در pH ایزوالکتریک دارای حداکثر جذب هیدروفوبیک بوده و استفاده از یک بافر بی‌کربنات با pH معادل ۹/۶ که باعث آشکار شدن برخی گروه‌های هیدروفوب پروتئین در فاز مایع می‌شود برای کوتینگ در روش الایزا بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آنزیم‌ها و سوبستراها

آنزیم‌های مورد استفاده در الایزا باید از پایداری بالا، اختصاصیت خیلی زیاد، عدم تداخل با مهارکننده‌های داخل سیستم باشند.

از آنزیم‌های متعددی در روش الایزای هتروژن استفاده می‌شود از جمله پراکسیداز، الکلان فسفاتاز، β -D- گالاکتوزیداز، گلوکز اکسیداز، اوره‌آز، استیل کولین استراز.

از آنزیم‌های مورد استفاده در روش الایزای هموژن می‌توان به لیزوزیم، مالات دهیدروژناز و گلوگر ۶- فسفاتاز اشاره کرد. اما به طور متداول در کیت‌های تجاری الایزا از پراکسیداز و آلکلان فسفاتاز استفاده می‌شود. پراکسیداز رایج‌ترین آنزیم‌ها بوده و از منبع گیاهی که نوعی ترب کوهی است، به دست می‌آید به همین دلیل این آنزیم به نام Horse Redish Peroxidase (HRP) نامیده می‌شود. از رایج‌ترین سوبستراهای مورد استفاده می‌توان به TMB یا تترامتیل بنزیدین و OPD یا ارتوفنیل دی آمین اشاره کرد. لازم به ذکر است استفاده از TMB ارجحیت دارد.

جهت کونژگاسیون با آنزیم HRP می‌توان از طریق اتصال متقاطع آمین- تیول توسط معرف‌های دو عملکردی چون SMCC و SMH (جهت اتصال گروه آمین آنزیم و گروه تیول Fab آنتی‌بادی) و همچنین روش کونژگاسیون با گلوکار آلدهید یا اکسیداسیون پیرووات استفاده کرد. از آنزیم‌های رایج دیگر در روش الایزا آلکلان فسفاتاز بوده که از مخاط روده گاو و همچنین باکتری E. coli تهیه می‌شود و اندیکاتور آن ۴

نیتروفلن می‌باشد. سوپسترای معمول در معرف آلکالن فسفاتاز، آنزیم پارانیتروفنیل فسفات (PNPP) در بافر دی اتانول یک مولار حاوی ۰/۵ میلی مول کلرید منیزیم در pH حدود ۹/۸ می‌باشد.

سیستم آویدین - بیوتین

سیستم آویدین - بیوتین امروزه کاربرد وسیعی پیدا کرده و خصوصیت آن میل ترکیبی بسیار بالا است که آویدین و بیوتین برای تشکیل کمپلکس با هم دارند. بیوتین یک ویتامین است که چهار مولکول آن می‌تواند به یک مولکول تترامراز پروتئین آویدین (استرپتاویدین) متصل شود. به طور معمول در سیستم‌های تشخیص آویدین با آنزیم نشاندار می‌شود و آنتی‌بادی با بیوتین باند شده که اصطلاحاً آنتی‌بادی بیوتین‌نیل نامیده می‌شود. از این سیستم تقویت سیگنال به ویژه در کیت‌های الیزای تحقیقاتی مانند بخش ساتیوکاین‌ها استفاده می‌شود.

کوتینگ Coating

این مرحله شامل اتصال معرف‌های ایمنی (آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی) به فاز جامد می‌باشد. استفاده از پلی وینیل کلراید، پلی استیرن و پلی پروپیلن به صورت پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به عنوان فاز جامد در الیزرا به کار می‌رود. میزان اتصال معرف‌های ایمنی به فاز جامد یک مقدار بهینه (optimal) دارد که پس از مدت زمان مناسب انکوباسیون رخ می‌دهد. معمولاً در هنگام کوتینگ میزان اتصال ماده ایمنی کوت شده به تدریج به یک حد ماکزیمم رسیده و سپس با ادامه زمان کاهش می‌یابد. به طور کلی مقدار آنتی‌بادی جذب شده به سطح پلی استیرن با مقدار آنتی‌بادی اضافه شده به چاهک تا غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر یک رابطه خطی دارد.

در روش‌های ساندویچی و یا رقابتی معمولاً آنتی‌بادی به فاز جامد متصل شده و برای سنجش آنتی‌ژن به کار می‌رود و برای سنجش یک آنتی‌بادی در نمونه از اتصال آنتی‌ژن به فاز جامد استفاده می‌شود.

آنتی‌بادی‌ها یا آنتی‌ژن‌های مورد استفاده قبل از مرحله کوتینگ باید توسط یک فیلتر ۰/۲ میکرون برای خارج ساختن تجمع‌های پروتئین فیلتر شوند. جهت پی بردن به غلظت مناسب آنتی‌بادی در فرآیند کوتینگ

از تیتراسیون آنتی‌بادی استفاده می‌شود که بالاترین جذب نوری در کمترین غلظت، مناسب‌ترین گزینه می‌باشد.

از جمله روش‌های کوتینگ روش مستقیم یا غیرکووالان یا همان روش جذب غیرفعال می‌باشد که در آن مولکول‌ها به صورت غیرکووالان و غیرفعال به صورت خودبه‌خودی جذب فاز جامد موردنظر می‌شوند. روش دیگر روش غیرمستقیم بوده که اتصال آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن به فاز جامد از طریق یک آنتی‌بادی ثانویه مانند آویدین یا پروتیین A یا G استرپتوکوک یا استافیلوکوک صورت می‌گیرد. کارایی این روش از روش مستقیم به خصوص برای آنتی‌بادی مونوکلونال بیشتر است.

در روش اتصال کووالان سطح پلیت به طور شیمیایی فعال گردیده مثلاً سطوح پلی استیرن طی تماس با گلوتر آلدئید دارای خاصیت اتصال به ایمونوگلوبین‌ها می‌شود. در روش اتصال کووالان کوتینگ، سطح یکنواختی در کف چاهک ایجاد شده که باعث افزایش دقت تست می‌گردد. از معایب این روش کاهش پایداری و استفاده از مواد پرخطر به عنوان اتصال‌دهنده می‌باشد.

به طور تقریبی مقدار مناسب آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی برای کوتینگ در هر سیستم غلظتی در محدوده ۱۰-۱ میکروگرم پروتیین در میلی‌لیتر و با حجمی برابر ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک است که یک محدوده مناسب برای اشباع سطوح پلی استیرن در یک پلیت الیزا است.

بافرهای رایج مورد استفاده در فرآیند کوتینگ:

- بافر کربنات- بی کربنات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 9/6$

- بافر تریس هیدروکلراید ۲ میلی‌مولار با $\text{pH} = 8/5$

- بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7/2$

- رایج‌ترین بافر مورد استفاده در کوتین فازهای جامد پلی استیرن بافر کربنات- بی کربنات می‌باشد.

کوتینگ در حرارت 37°C به مدت ۱-۲ ساعت صورت گرفته و یا در دمای اتاق حداقل به ۳ ساعت زمان نیاز دارد ولی کوتینگ به صورت overnight (انکوباسیون به مدت یک شب) دقت کوتینگ را بسیار افزایش می‌دهد. کوتینگ در دمای 4°C به زمان ۱۶-۲۴ ساعت نیاز داشته که بهترین دقت ممکنه را در کوتینگ به همراه دارد و عمدتاً در کارخانجات تولیدکننده کیت‌های الیزا از این روش استفاده می‌شود. در

فرآیند کوتینگ در 37°C امکان ایجاد اثر حاشیه‌ای Edge effect وجود داشته که به علت اختلاف درجه حرارت بین چاهک‌های کناری و مرکزی پلیت، به طور غیرمنتظره‌ای جذب نوری این چاهک‌ها تفاوت دارد.

شستشو Washing

شستشو یک مرحله ساده اما بسیار حساس در انجام الایزا می‌باشد که به دنبال انجام مرحله کوتینگ به منظور حذف اتصالات غیراختصاصی انجام می‌گیرد. عمل شستشو با خالی کردن چاهک و افزودن محلول شستشو به داخل چاهک انجام می‌شود که حداقل ۳ تا ۵ بار این عمل تکرار می‌شود. محلول مورد استفاده رایج بافر فسفات سالین یا تریس بافر سالین ۰/۱ مولار با $\text{pH } 7/4$ بوده که حاوی درصد مشخصی از یک دترجنت می‌باشد. پر کردن چاهک‌ها با محلول شستشو طی مدت زمان کوتاهی مابین ۳۰ ثانیه الی ۵ دقیقه صورت گرفته که اصطلاحاً Soak time گویند.

مسدود کردن Blocking

پس از انجام کوتینگ و شستشو، قسمت‌هایی از فاز جامد خالی مانده که مکان مناسبی جهت اتصال عوامل غیراختصاصی در طی انجام آزمایش است، جهت مسدود کردن این جایگاه‌ها لازم است پس از انجام عمل کوتینگ از یک ماده دیگر جهت پر کردن این فضاهای خالی استفاده شود. مواد بلوک کننده شامل پروتئین‌ها، مواد غیر پروتئینی و دترجنت‌ها بوده که از این میان پروتئین‌ها از همه موارد مؤثرتر می‌باشد. مواد پروتئینی به کار رفته در فرآیند بلاکینگ آلبومین سرم گاو (BSA)، کازئین، ژلاتین، شیر خشک بدون چربی و اوآلبومین هستند که BSA رایج‌ترین ماده در این امر می‌باشد. از مواد غیر پروتئینی بلوک کننده می‌توان به پلی وینیل الکل، پلی وینیل پیرولیدون و از دترجنت‌های بلوک کننده به توئین ۲۰ و تراتیون ۱۰۰-x اشاره کرد.

در کیت تجاری فرآیند کوتینگ و بلاکینگ در چاهک‌ها انجام شده و پلیت‌ها به صورت آماده برای مصرف در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی آماده مصرف می‌باشد.

نمونه‌های مورد ارزیابی

از تست‌های الایزا برای اندازه‌گیری آنالیت‌ها در نمونه‌های محلول استفاده می‌شود. محدوده سنجش در اغلب روش‌ها حدود ۱۰۰۰-۱ نانوگرم در میلی‌لیتر است. در نمونه‌هایی با غلظت بالاتر، رقیق کردن نمونه‌ها ضروری است. بافر رقیق‌کننده برای هر بخش متفاوت بوده اما می‌توان از استاندارد صفر هر کیت به عنوان رقیق‌کننده استفاده کرد. پرمصرف‌ترین بافر در سنجش‌های ایمنی بافر فسفات سالین (PBS) بوده ولی بافر کربنات، بافر بورات، بافر تریس سالین و بافر سیترات از دیگر بافرهای مورد استفاده در روش‌های الایزا می‌باشد.

محلول کونژگه

این محلول حاوی آنالیت اختصاصی متصل به آنزیم است و رقت کونژگه مورد استفاده نیز همانند کوتینگ (Coatnin) با تیتراسیون مشخص می‌شود و اصولاً از بالاترین رقتی که بالاترین جذب نوری را دارد، استفاده می‌شود.

واکنش‌های الایزا برحسب نوع آنالیت نشان‌دار به دو دسته تقسیم می‌شود. اگر آنتی‌ژن با آنزیم کونژگه شده، همراه باشد به نام EIA (Enzyme Immunometric Assay) و اگر آنتی‌بادی با آنزیم کونژگه همراه باشد به نام IEMA (Immuno Enzyme Metric Assay) نامیده می‌شود. از مزایای IEMA نسبت به EIA، سهولت نشاندارسازی، افزایش ویژگی، حساسیت بیشتر، کاهش زمان انکوباسیون و کاهش اثر هوک می‌باشد. همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد غالباً از پراکسیداز ترب کوهی یا HRP و به میزان کمتری از آنزیم آلکان فسفاتاز (ALP) جهت کونژگه کردن آنالیت استفاده می‌شود.

محلول سوبسترا و کروموژن

هر آنزیم سوبسترای مخصوصی داشته و معمولاً با آنزیم کونژگه روی آن ایجاد رنگ می‌کند. از جمله مهم‌ترین سوبستراها می‌توان به OPD و TMB برای آنزیم پراکسیداز و PNPP برای آنزیم آلکان فسفاتاز می‌توان اشاره کرد. در برخی از کیت‌های تجاری، سوبسترا و کروموژن یک محلول واحد بوده اما در برخی دیگر به صورت ویال‌هایی از محلول‌های جداگانه به نام سوبسترای A و B وجود دارند. در مواردی که آنزیم HRP دارای دو سوبسترای A و B است، برای این آنزیم سوبسترای A همان کروموژن بوده که می‌تواند

TMB و OPD باشد. همچنین پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترای B این آنزیم عمل کرده و به محض مجاورت با آنزیم به سرعت تجزیه می‌گردد. این ماده در برابر نور حساس بوده و خودبه‌خود تجزیه می‌گردد، به همین علت محلول در ویال‌های تیره رنگ نگهداری می‌گردد. اگر چه جدا بودن سوبسترای A و B از همدیگر میزان پایداری آن‌ها را افزایش می‌دهد، اما سوبسترای تک مرحله‌ای نیز دارای پایداری مناسب هستند.

محلول متوقف‌کننده (Stop solution)

با توجه به این که واکنش آنزیمی و تولید رنگ محصول رنگی با گذشت زمان به مرور بیشتر می‌شود، لازم است پس از طی شدن زمان خاص واکنش متوقف شود. محلول متوقف‌کننده یا بلوکر بسته به نوع آنزیم کونژگه متفاوت بوده مثلاً اگر کونژگه HRP باشد از محلول متوقف‌کننده اسیدی مانند اسید سولفوریک یا اسید کلریدریک استفاده می‌شود. پس از افزودن محلول متوقف‌کننده رنگ حاصله از توقف واکنش زرد بوده و در صورتی که کونژگه مورد معرف ALP باشد از محلول متوقف‌کننده قلیایی مانند NaOH استفاده می‌شود که رنگ حاصله قهوه‌ای خواهد بود.

اندازه‌گیری شدت رنگ

در مرحله آخر آزمون‌های الایزا شدت رنگ ایجاد شده مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بدین منظور از دستگاهی به نام الایزا ریدر ELISA Reader استفاده می‌شود. در واقع اصول کار این دستگاه مشابه اسپکتروفتومتر است. با این تفاوت که در الایزا ریدر به جای کوت در اسپکتروفتومتر، از چاهک استفاده شده، دقت الایزا ریدر به مراتب از اسپکتروفتومتر بیشتر است و این دستگاه تفاوت‌های بسیار کم در رنگ چاهک‌ها و در نتیجه تفاوت‌های بسیار کم جذب نوری نمونه‌ها را با دقت بیشتری تشخیص و اندازه‌گیری می‌کند.

استانداردها و کالیبراتورها

در داخل کیت‌های الایزا تعدادی استاندارد با غلظت‌های مختلف وجود دارد. استانداردها در واقع محلول‌هایی با غلظت مشخص از یک ماده خاص مشابه جز مجهول سرم بوده و بر مبنای آن‌ها غلظت پارامتر سرمی اندازه‌گیری

می‌شود. این حالت تا حدی مشابه روش‌های رنگ‌سنجی بیوشیمی و اندازه‌گیری پارامترهای سرمی به کمک فتومتر با اسپکتروفتومتر با استفاده از استاندارد مربوط به هر تست می‌باشد. با این تفاوت که در روش الایزا چندین استاندارد به جای یک استاندارد وجود داشته و استفاده از چندین استاندارد موجب افزایش دقت آزمایش در روش‌های ایمنونواسی می‌گردد.

تمامی مراحل آزمایشی که بر روی نمونه سرم انجام می‌شود، عیناً به طور همزمان روی نمونه‌های استاندارد نیز انجام شده و جذب نوری تمامی استانداردها اندازه‌گیری می‌شود. منحنی براساس غلظت استانداردها رسم شده که بر روی محور غلظت و بر روی محور دیگر، جذب نوری مربوطه برده می‌شود. بدین ترتیب غلظت سرمی مجهول با استفاده از این منحنی استاندارد محاسبه می‌شود. تعداد استاندارد براساس طراحی کیت شرکت سازنده متفاوت بوده و معمولاً بین ۴ تا ۸ عدد استاندارد با غلظت‌های مختلف از حداقل صفر تا یک غلظت حداکثر وجود دارد. امروزه دستگاه‌های خوانشگر (الایزا ریدر) به طور خودکار منحنی استاندارد را با استفاده از جذب نوری استانداردها رسم می‌کنند. دستگاه پس از خوانش چاهک مربوطه به هر نمونه بیمار، عدد جذب نوری را روی منحنی استاندارد برده و نهایتاً غلظت نهایی مجهول موردنظر را به صورت عددی نمایش می‌دهد.

منحنی استاندارد بسته به نوع روش الایزا به دو صورت می‌باشد:

- منحنی صعودی (Ascending): در این حالت شیب منحنی رو به بالا بوده و جذب نوری با غلظت استاندارد نسبت مستقیم دارد و هر چه غلظت استاندارد بالا باشد جذب نوری آن نیز بیشتر می‌باشد.

- منحنی نزولی (Descending): در این حالت شیب منحنی رو به پایین بوده و جذب نوری با غلظت استاندارد نسبت عکس دارد.

شرایط سنجش

چند فاکتور در شرایط سنجش دخالت داشته از جمله درجه حرارت، انکوباسیون، زمان و مدت انکوباسیون، مخلوط کردن معرف‌ها، شستشو.

معرفها

معرفها دارای مواد نگه‌دارنده مانند سدیم آزایدیو یا تیمرسال (مریتولات) بوده و امروزه از ماده‌ای به نام ProLin ۳۰۰ استفاده می‌شود که از دو محلول نامبرده جهت نگه‌داری مناسب‌تر است. محلول شستشو معمولاً حاوی PBS و توئین ۲۰ و تیمرسال می‌باشد. در این محلول PBS نقش تنظیم pH و توئین ۲۰ نقش کاهش اتصالات غیراختصاصی و تیمرسال از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند.

تقسیم‌بندی انواع الایزا

سه روش اصلی اساس تمامی الایزها را تشکیل می‌دهند و عبارتند از الایزای مستقیم، الایزای غیرمستقیم، الایزای ساندویچ. روش الایزای رقابتی یا مهاری از روش‌های نسبتاً جدیدتر بوده و به منظور افزایش سرعت، دقت و حساسیت طراحی شده‌اند.

۱- الایزای مستقیم

الایزای مستقیم ساده‌ترین شکل الایزا بوده که در آن نمونه حاوی آنالیت در بافر مناسب رقیق شده و طی یک دوره انکوباسیون در کف چاهک کوت شده و پس از مراحل شستشو، آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن مکمل نشان‌دار به سیستم اضافه می‌شود. در صورت وجود آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر در نمونه سیگنال مناسب ایجاد می‌شود.

۲- الایزای غیرمستقیم

امروزه روش‌های غیررقابتی مانند الایزای غیرمستقیم کاربرد بیشتری پیدا کرده و در این روش بیشتر برای تعیین و اندازه‌گیری آنتی‌بادی اختصاصی یا تیتراسیون آنتی‌بادی در نمونه استفاده می‌شود. در این روش آنتی‌ژن در چاهک کوت شده با افزودن نمونه رقیق شده که حاوی آنتی‌بادی مورد ارزیابی است به آن اضافه و انکوبه می‌شود. پس از شستشو چاهک‌ها از یک آنتی‌بادی ثانویه (آنتی هیومن گلوبولین) نشاندار شده با آنزیم استفاده می‌شود که معمولاً بر علیه F_c آنتی‌بادی مورد ارزیابی است. برحسب این که چه کلاسی از آنتی‌بادی مدنظر است نوع آنتی‌هیومن گلوبولین نیز متفاوت بوده مثلاً جهت سنجش IgG آنتی‌هیومن IgG و جهت

اندازه‌گیری IgA از آنتی‌هیومن IgA استفاده می‌شود. یک مرحله دیگر شستشو انجام شده و بعد از افزودن سوبسترا، سیگنال موردنظر که به صورت ایجاد رنگ می‌باشد، اندازه‌گیری می‌شود. از الایزای غیرمستقیم جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما، سرخجه، CMV، هلیکوباکتر پیلوری از کلاس‌های IgM، IgA و IgG در سرم، غربالگری آنتی‌بادی‌های HIV، هپاتیت B، C و A استفاده می‌شود.

۳- الایزای ساندویچ (Sandwich ELISA)

این روش خود به دو دسته تقسیم می‌شود:

الف- روش Antigen capture

در این روش یک آنتی‌ژن در بین دو آنتی‌بادی اختصاصی اما متفاوت از هم ساندویچ می‌شود. لایه اول و سوم آنتی‌بادی و لایه دوم در قسمت وسط که آنتی‌ژن است مابین این دو لایه قرار می‌گیرد. این روش از شایع‌ترین روش‌های الایزا به شمار می‌شود. لایه اول آنتی‌بادی معمولاً آنتی‌بادی مونوکلونال بوده که برای به دام انداختن آنتی‌ژن در سطح چاهک‌های الایزا کوت می‌شود (Capture antibody)، آنتی‌بادی دوم که در لایه سوم وجود دارد معمولاً آنتی‌بادی پلی‌کلونال بوده که با آنزیم کونژگه به عنوان نشانگر عمل می‌کند (Detecting antibody) و نهایت فعالیت آنزیمی آن متناسب با مقدار آنتی‌ژن موجود در نمونه سرم است. لازم به ذکر است که آنتی‌ژن مورد استفاده باید دارای حداقل دو اپی‌توپ متفاوت بوده تا قادر به اتصال به هر دو آنتی‌بادی باشد.

از روش الایزای Capture assay جهت شناسایی آنتی‌ژن‌هایی که اپی‌توپ‌های متعدد دارند مانند سایتوکاین‌ها، هورمون‌های HCG، TSH، LH، FSH، PSA و پلی‌پپتیدها، آنتی‌بادی‌ها، تومورمارکرها و شناسایی میکروارگانیزم‌ها به خصوص عوامل ویروسی، روشی مناسب می‌باشد. استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال در این روش آن را به یک سیستم بسیار حساس تبدیل کرده و شناسایی مقادیر بسیار اندکی توسط این روش به راحتی صورت می‌گیرد.

ب- روش Antibody capture

این روش نیز خود به دو دسته تقسیم می‌گردد:

در نوع Direct Ab capture آنتی‌بادی اختصاصی موجود در نمونه به روش سنجش ساندویچ ارزیابی شده، بدین ترتیب که یک آنتی‌ژن در لایه اول چاهک کوت شده و لایه دوم برای به دام انداختن آنتی‌بادی اختصاصی می‌باشد که این آنتی‌بادی متصل شده از طریق بازوی F_{ab} خود می‌تواند به آنتی‌ژن نشاندار (کونژگه) متصل شود.

در نوع Indirect Ab capture در این سیستم پس از به دام افتادن آنتی‌بادی توسط آنتی هیومن گلوبولین کوت شده در ته چاهک متصل و از آنتی‌ژن اختصاصی آن آنتی‌بادی که با آنزیم نشاندار شده است جهت سنجش آنتی‌بادی مورد نظر استفاده می‌شود. در این سیستم آنتی‌هیومن گلوبولین متصل به سطح جامد لایه اول، آنتی‌بادی مورد پخش موجود در نمونه لایه دوم و آنتی‌ژن اختصاصی نشاندار شده در لایه سوم قرار دارد.

۴- الایزای رقابتی یا مهارى

در این روش چنانچه از هر دو آنالیت نشاندار و غیرنشاندار به طور همزمان استفاده شود به آن الایزای رقابتی گویند و در صورتی که ابتدا آنالیت غیرنشاندار و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشانداره اضافه گردد روش را مهارى Blocking می‌نامند.

اگر الایزای رقابتی به منظور بخش آنتی‌ژن باشد در این حالت آنتی‌بادی اختصاصی در کف چاهک کوت می‌شود و اگر الایزای رقابتی جهت بخش آنتی‌بادی باشد از آنتی‌ژن اختصاصی در کف چاهک کوت خواهد شد.

۵- روش MEIA (Micro Particle Enzyme Immuno Assay)

در این روش از بیدهای کوچک (معمولاً به اندازه یک میلی‌متر) که با آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی پوشیده شده‌اند، در یک سوسپانسیون مایع استفاده می‌شود. در این روش فاز جامد پارتيكل‌هایی هستند که به صورت کووالان با آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی باند شده‌اند. مزیت این ذرات کوچک در این است که می‌توان در سطح نسبتاً وسیع

آن‌ها غلظت زیادی از آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی را کوت کرده و نتایج واکنش در زمان بسیار کوتاهی (حدود ۱۵ تا ۳۰ دقیقه) قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

امروزه از روش MEIA در آنالیزورهای اتومات استفاده شده و حساسیت آن ۱۰ حتی ۱۰۰۰ برابر روش‌های قدیمی می‌باشد.

۶- روش ایمنونواسی سریع (Rapid Immuno Assay)

روش آسان و سریع با نتایج قابل تکرار که دارای حساسیت بالا و به صورت روش‌های نیمه کمی در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تست‌ها به صورت یکبار مصرف در یک کارتریج پلاستیکی طراحی شده‌اند که حاوی یک غشاء نیترو سلولزی بوده و به راحتی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را می‌توان بر آن ایمونوبلیزه کرد. جریان سریع نمونه و سطح وسیع غشاء باعث افزایش سرعت و حساسیت این نوع واکنش‌های الایزا می‌شود.

۷- روش الایز پات (ELIS Pot)

یک تکنیک ایمنی بسیار حساس که جهت ردیابی یک آنالیت ترشح شده از یک سلول خاص مانند سایتوکاین‌ها و آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود. حساسیت ELIS Pot در حد RT-PCR بوده که در این روش به جای mRNA، پروتئین ترشح شده از سلول بررسی می‌شود.

برای بررسی ترشح یک پروتئین از یک سلول خاص، سلول را در یک پلیت الایزا که در کف آن آنتی‌بادی ضد آن پروتئین کوت شده، کشت می‌دهند. در صورت ترشح پروتئین از سلول، به آنتی‌بادی کوت شده در ته پلیت متصل می‌شود. با شستشوی پلیت سلول از محیط خارج شده سپس آنتی‌بادی نشاندار علیه آن پروتئین در کف پلیت به دام افتاده، اضافه می‌شود. بعد از انکوباسیون و شستشوی چاهک‌ها سوبسترا به چاهک اضافه می‌شود. در این روش از سوبستراهایی استفاده می‌شود که رنگ‌های غیرمحلول ایجاد کرده و در محل واکنش به صورت نقاط رنگی رسوب می‌کنند. ظاهر شدن این نقاط رنگی در کف پلیت نشان‌دهنده حضور پروتئین موردنظر می‌باشد. نقاط ایجاد شده توسط دستگاه ریدر شمارش شده و تعداد آن‌ها متناسب با تعداد سلول‌های تولید کننده پروتئین موردنظر می‌باشد.

روش انجام الایزا

- ۱- کیت مورد استفاده و کلیه وسایل و محلول‌های مورد نیاز باید بعد از خارج کردن از یخچال به دمای اتاق برسد (حداقل ۳۰ دقیقه صبر نمایید).
- ۲- بروشور داخل کیت به دقت مطالعه و روش انجام کار دقیقاً مطابق آن انجام گیرد.
- ۳- نمونه‌های سرم بعد از خارج کردن از یخچال باید به دمای اتاق رسیده و در صورت فریزر شدن نمونه‌ها پس از ذوب آن‌ها و رسیدن به دمای اتاق، به آرامی تکان داده شوند تا یک نمونه سرمی یکنواخت ایجاد شود.
- ۴- اگر نمونه‌های سرم نیاز به رقیق شدن داشته باشند، توسط محلول رقیق‌کننده داخل کیت به نسبت قید شده در روش کار، رقیق گردد.
- ۵- به تعداد نمونه‌ها، استاندارد و کنترل‌ها چاهک در نظر گرفته شده و بقیه چاهک به داخل بسته آلومینیومی یا پلاستیکی به همراه بسته رطوبت‌گیر برگردانده و کاملاً در آن محکم می‌گردد.
- ۶- از نمونه‌ها، استاندارد و کنترل به مقدار مورد نیاز به داخل چاهک افزوده و بسته به دمای مورد نیاز در 37°C یا دمای اتاق RT انکوبه می‌شود.
- ۷- مدت زمان لازم انکوباسیون توسط دستورالعمل کیت رعایت می‌گردد، در اولین مرحله انکوباسیون اجازه می‌دهیم که در صورت وجود آنتی‌بادی موجود در سرم بیمار با آنتی‌ژن ته چاهک یک کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی ایجاد کند.
- ۸- اولین مرحله شستشو چاهک به توسط محلول wash (که به صورت محلول غلیظ می‌باشد و باید آن را به نسبت مورد نیاز و مطابق دستورالعمل کیت با آب مقطر رقیق گردد) و به تعداد ۳ تا ۶ بار شستشو مطابق دستورالعمل کیت انجام گیرد.
- ۹- به دلیل این که مقدار بسیار کمی از محلول واش و حباب‌ها در کف چاهک‌ها باقی می‌ماند نیاز است که با عمل tapping این مواد از محیط خارج شود. این عمل را با زدن پلیت بر روی یک کاغذ صافی یا دستمال کاغذی انجام می‌دهیم.
- ۱۰- محلول کونژگه به مقدار قید شده در دستورالعمل به داخل چاهک اضافه می‌شود.

- ۱۱- دومین مرحله انکوباسیون به جهت قرار گرفتن آنزیم کونژگه بر روی کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی ایجاد شده مطابق مرحله قبلی، صورت می گیرد.
- ۱۲- دومین مرحله شستشو را انجام می دهیم.
- ۱۳- مرحله tapping را انجام می دهیم.
- ۱۴- افزودن محلول سوپسترا (کروموژن یا TMB) به چاهکها به مقدار مورد نیاز، در این مرحله باید پلیت در تاریکی قرار داده شود زیرا محلول سوپسترا به نور حساس می باشد.
- ۱۵- بعد از زمان مورد نیاز از محلول متوقف کننده یا stop (اسید سولفوریک) به چاهک افزوده تا هم واکنش متوقف شده و هم رنگ ایجاد شده آبی در مرحله قبل به رنگ زرد تبدیل شود. رنگ زرد ایجاد شده جهت خوانش جذب نوری چاهکها در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد نیاز است.
- ۱۶- پلیت جهت اندازه گیری و خوانش جذب نوری نمونهها توسط دستگاه الایزا ریدر، داخل دستگاه قرار داده شده و جذب نوری چاهکها خوانده می شود.
- ۱۷- منحنی استاندارد براساس غلظت آنها توسط الایزا ریدر خوانده شده و در دستگاههای اتوماتیک، منحنی رسم می شود. نمودار رسم شده Point to Point بوده و جذب نور استانداردها روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها روی محور افقی (X) برده شده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورده، سپس با بردن جذب نوری هر نمونه روی نمودار غلظت آن محاسبه می شود.

منابع خطا در روش الایزا

- ۱- استفاده از نمونههای سرمی لیزیا شیلو میکرون
- ۲- استفاده از نمونه سرم کمتر یا بیشتر از مقدار مورد نیاز
- ۳- کالیبر نبودن سپمتر یا دیسپنسر مورد استفاده
- ۴- برداشت نمونه رقیق شده کمتر یا بیشتر از مورد نیاز
- ۵- عدم تهیه رقت مناسب از سرم به توسط محلول رقیق کننده
- ۶- عدم رسیدن دمای نمونهها، محتویات کیت و محلول واش به دمای اتاق

۷- خارج کردن پلیت و چاهک‌ها قبل از رسیدن به دمای اتاق، در این حالت به دلیل خنک بودن سطح چاهک‌ها و تفاوت دما بین چاهک‌ها و دمای اتاق سریعاً یک لایه نازک بخار در ته چاهک‌ها تشکیل شده که مانع از تماس کامل بین آنتی‌ژن‌های ته چاهک و آنتی‌بادی موجود در نمونه سرم می‌گردد و کمپلکس تشکیل شده مقدار واقعی کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی نمی‌باشد.

۸- انکوباسیون پلیت به مدت کمتر یا بیشتر از زمان مورد نیاز

۹- شستشوی نامناسب، مانند عدم تهیه رقت مناسبی از محلول واش، غلیظ یا رقیق بودن محلول واش

۱۰- عدم انجام tapping به طور کامل که مقداری محلول واش و حباب‌های بسیار کوچک در ته چاهک باقی مانده مانع از قرارگیری کامل کونژگه بر روی کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی می‌شود.

۱۱- عدم رعایت زمان در هر مرحله از انکوباسیون، کم یا بیشتر بودن زمان انکوباسیون موجب به دست آوردن جذب نوری نادرست می‌گردد.

۱۲- استفاده از کیت‌ها و محلول‌های تاریخ گذشته

۱۳- استفاده از کیت‌ها یا محلول‌هایی که زنجیره سرد از مرحله تولید، انتقال، مصرف آن رعایت نشده است.

۱۴- بعد از افزودن محلول متوقف‌کننده باید جذب نوری چاهک در عرض چند دقیقه خوانده شود، طولانی شدن زمان خوانش به دلیل کاهش رنگ، جذب نوری دقیق خوانش نخواهد بود.

۱۵- عدم رعایت ریزش حجم مناسب در هنگام شستشو به داخل چاهک‌ها

۱۶- عدم رعایت Soak time در هنگام شستشو، بعد از اضافه شدن محلول واش به داخل چاهک‌ها در موقع شستشو باید یک مدت زمان حدود ۱۰ تا ۶۰ ثانیه محلول واش داخل چاهک باقی مانده تا عمل شستشو به طور مناسب صورت گیرد. عدم رعایت این زمان موجب می‌شود که شستشو و خارج شدن مواد باند نشده به طور مناسب صورت نگیرد.

۱۷- ضعیف شدن منبع نوری دستگاه الیزا ریدر

۱۸- عدم استفاده از فیلترهای مناسب که خوانش را با مشکل روبه‌رو می‌سازد.

۱- مقادیر بالای کنترل منفی و یا بک‌گراند بالا	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<ul style="list-style-type: none"> • در هنگام عملیات شستشو از سرریز شدن محلول شستشو از چاهک‌های پلیت به یکدیگر اجتناب کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • آلوده شدن چاهک‌های کنترل منفی با کنترل مثبت
<ul style="list-style-type: none"> • پیپت و یا لوله‌های سمپلر و نوک سمپلرها را چک کنید و در صورت وجود قطرات باقی مانده از قبل و یا مواد خشک شده در آن‌ها باید تعویض شوند. • همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهک‌ها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید. • برای هر نمونه برداری از نوک سمپلر جدید استفاده کنید. • توجه داشته باشید که نوک سمپلر به اندازه کافی بلند باشد تا نمونه‌ها با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکنند. • تست را با مواد کیت تازه تکرار کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • آلوده شدن ویال کنترل منفی
<ul style="list-style-type: none"> • در هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده‌های آنزیم کنژوگه از چاهک‌ها خارج شده‌اند. • تمامی نمونه‌ها و مواد را در مرکز کف چاهک‌ها بریزید و از تماس نوک سمپلر با دیواره و لبه چاهک‌ها بپرهیزید. • دوباره شستشو را تکرار کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کنترل منفی با آنزیم کنژوگه
<ul style="list-style-type: none"> • این مورد مربوط به تولیدکننده کیت می‌باشد و ممکن است عملیات بلاکینگ و یا سایر پروسه‌های جلوگیری کننده از مداخله آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی خوب صورت نگرفته باشد. 	<ul style="list-style-type: none"> • اتصالات غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها
<ul style="list-style-type: none"> • این مورد نیز مربوط به تولیدکننده می‌باشد و باید با تولیدکننده کیت تماس حاصل شود. 	<ul style="list-style-type: none"> • واکنش مستقیم کنژوگه با مواد کف چاهک‌ها

۲- مقادیر پایین کنترل مثبت یا ابزوربنس‌های پایین

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
-------------	---------------

<ul style="list-style-type: none"> • در زمان تست مواد داخل کیت به دمای اتاق رسانده نشده‌اند 	<ul style="list-style-type: none"> • مطمئن شوید که تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده‌اند (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد)
<ul style="list-style-type: none"> • مقدار نمونه‌برداری پایین است (کمتر از مقدار لازم) 	<ul style="list-style-type: none"> • مطمئن شوید که نوک سمپلرها خوب و محکم فیت شده‌اند. • لوله سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند. کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید و در صورت عدم کالیبره بودن آنها باید کالیبره شوند.
<ul style="list-style-type: none"> • محلول کروموژن - سوبسترا به درستی تهیه نشده است 	<ul style="list-style-type: none"> • محلول کروموژن سوبسترا را درست قبل از استفاده آماده کنید. • طرز تهیه محلول کروموژن - سوبسترا را در پروتوکول کیت به دقت مطالعه کرده و به آن عمل کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی کنترل مثبت به باکتری 	<ul style="list-style-type: none"> • مجدداً تست را با اجزاء یک کیت جدید تکرار کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است 	<ul style="list-style-type: none"> • کالیبراسیون تایمر را چک کنید. • تایم انکوباسیون را ثبت کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت 	<ul style="list-style-type: none"> • عملکرد صحیح نم‌گیر داخل کیسه پلیت را بررسی کنید. • استریپ‌هایی که مصرف نمی‌شوند را در کیسه پلیت قرار داده و در آن را محکم ببندید. • زمان باز کردن درب کیسه پلیت را در بار اول بر روی کیسه پلیت ثبت کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • دمای ناصحیح در مدت انکوباسیون 	<ul style="list-style-type: none"> • دمای انکوباتور و یا اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) را بررسی کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • دمای اتاق برای انکوباسیون سوبسترا خیلی پایین است. 	<ul style="list-style-type: none"> • دمای محیط کار را بررسی کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • شدت شستشو زیاد است 	<ul style="list-style-type: none"> • شدت فشار شستشو در سیستم شستشو را کاهش دهید.
<ul style="list-style-type: none"> • مواد کیت قبل از استفاده خوب مخلوط نشده‌اند 	<ul style="list-style-type: none"> • مواد را قبل از استفاده خوب مخلوط کنید.
<ul style="list-style-type: none"> • در خلال انجام تست چاهک‌ها خشک شوند 	<ul style="list-style-type: none"> • تمام مراحل انجام تست را بدون وقفه انجام دهید.
<ul style="list-style-type: none"> • ضعف یا خرابی محلول متوقف‌کننده واکنش 	<ul style="list-style-type: none"> • افزودن محلول متوقف‌کننده واکنش سالم شدت رنگ را افزایش داده و باعث تثبیت رنگ می‌شود
<ul style="list-style-type: none"> • افزودن ناکافی آنزیم کنزوگه غلیظ به محلول رقیق‌کننده برای ایجاد محلول آماده کار 	<ul style="list-style-type: none"> • کنزوگه را دوباره با صحت کامل تهیه کنید. • به طرز تهیه صحیح در پروتوکول کیت مراجعه کنید.

۳- تمام پلیت دارای OD مثبت است یا در تمام خانه‌های پلیت رنگ ظاهر شده است

دلائل احتمالی	تصحیح ایراد
---------------	-------------

<ul style="list-style-type: none"> • در هنگام شستشو چاهکها را تا نزدیک به انتها پر کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • حجم غیرکافی از محلول شستشو به کار گرفته شده و سوبسترا با ذرات باقی مانده آنزیم کنزوگه در چاهکها واکنش داده
<ul style="list-style-type: none"> • محلول رقیق شده کنزوگه و طرز تهیه کنزوگه را چک کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • استفاده از آنزیم کنزوگه خیلی قوی
<ul style="list-style-type: none"> • سرم را حرارت ندهید. 	<ul style="list-style-type: none"> • وجود برخی فاکتورهای سرمی در سرم حرارت دیده
<ul style="list-style-type: none"> • لوله سمپلر را برای وجود ذرات مایع یا خشک شده بازرسی کنید. • نوک سمپلر به حد کافی بلند باشد که مایع با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند. 	<ul style="list-style-type: none"> • محلول سوبسترا با کنزوگه آلوده شده
<ul style="list-style-type: none"> • محلول سوبسترا را پس از انقضاء تاریخ مصرف استفاده نکنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • محلول سوبسترا تازه نیست
<ul style="list-style-type: none"> • بعد از افزودن محلول متوقف کننده واکنش حداکثر تا ۳۰ دقیقه ابزوربنسها را بخوانید. 	<ul style="list-style-type: none"> • پلیت قبل از خواندن ابزوربنس مدت زیادی مانده باشد
<ul style="list-style-type: none"> • ظروف را قبل از استفاده چک کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • ظرف محتوی سوبسترا آلوده و کثیف است
<ul style="list-style-type: none"> • پس از ریختن محلول سوبسترا پلیت را در یک محل تاریک قرار دهید. 	<ul style="list-style-type: none"> • در خلال انکوباسیون سوبسترا، پلیت در مقابل نور قرار گرفته

۴- واکنشهای مثبت کاذب

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
-------------	---------------

<ul style="list-style-type: none"> • قبل از استفاده از دستگاه واشر آن را خوب چک کنید تا مطمئن شوید درست کار می‌کند، کالیبراسیون و تعمیرات روتین را مبذول دارید. 	<ul style="list-style-type: none"> • شستشوی غیرکافی • مسدود شدن کانال‌های واشر الایزا
<ul style="list-style-type: none"> • آنزیم کنژوگه را با دقت در مرکز کف چاهک‌ها اضافه نموده و از تماس نوک سمپلر با دیواره‌ها و لبه‌های چاهک‌ها بپرهیزید، در موارد استفاده از سیستم‌های اتوماتیک باید سمپلینگ، بالانس و دقت آن‌ها مرتباً چک شوند. • لوله سمپلر را جهت عدم وجود ذرات مایع و یا خشک شده خارجی بازرسی کنید و از نوک سمپلر بلند استفاده نمایید تا مایع با نوک لوله سمپلر مجاور نشود. 	<ul style="list-style-type: none"> • آلوده شدن چاهک‌ها با آنزیم کنژوگه • پاشیدن شدن آنزیم کنژوگه به لبه چاهک‌های دیگر در هنگام ریختن آنزیم کنژوگه • آلوده شدن سوپسترا به آنزیم کنژوگه
<ul style="list-style-type: none"> • نمونه را قبل از استفاده سانتریفوژ نمایید. 	<ul style="list-style-type: none"> • وجود گلبول‌های قرمز در نمونه
<ul style="list-style-type: none"> • پلیت را با برچسب یا کاور مخصوص پلیت پوشانیده و در انکوباتور ۳۷ درجه و یا بالاتر قرار دهید تا از تبخیر مواد درون چاهک‌ها جلوگیری شود. 	<ul style="list-style-type: none"> • تبخیر نمونه یا آنزیم کنژوگه در خلال انکوباسیون ۳۷ درجه یا بالاتر
<ul style="list-style-type: none"> • قبل از استفاده از کیت تمام محلول‌ها و اجزای کیت را به صورت ماکروسکوپی از نظر وجود قارچ و یا مواد زائد دیگر بررسی کنید، ظروف باید تمیز باشند و همینطور از نظر وجود خود پاک‌کننده‌ها بر روی آن‌ها باید بررسی شوند تا عاری از آن‌ها باشند. 	<ul style="list-style-type: none"> • وجود قارچ در محلول‌هایی نظیر محلول شستشو و یا سایر اجزای کیت
<ul style="list-style-type: none"> • از روی دستور کار کیت یک محلول کنژوگه آماده کار تازه بسازید. 	<ul style="list-style-type: none"> • غلظت بالای آنزیم کنژوگه در محلول رقیق‌کننده
<ul style="list-style-type: none"> • دمای اتاق یا انکوباتور را چک کرده و در میزان مورد نظر کالیبره کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • دمای انکوباسیون بالا

۵- قدرت تکرار پذیری ضعیف یا دوپلیکیت ناهمخوان

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
-------------	---------------

• حباب در چاهک‌ها	• برای از بین بردن حباب‌ها از سوزن یا شیء نوک تیز استفاده کنید (برای هر چاهک از یک سوزن جدا استفاده کنید)
• اشتباه در تقسیم مواد و نمونه‌ها (دیسپنسینگ)	• دستگاه دیسپنسر را چک نمایید.
• اثر انگشت بر روی پلیت	• با محلول شستشو اثر انگشت را پاک کرده و سپس پلیت را خشک کنید.
• عدم ردیف بودن چاهک‌ها در پلیت	• چاهک‌ها را به صورت مرتبی ردیف کنید.
• تکنیک شستشوی ضعیف یا غلط	• هر چاهک را تا نزدیک لبه بالا با محلول شستشو پر کنید، اجازه ندهید که محلول شستشو سرریز شده و وارد چاهک‌های دیگر شود، پس از خالی کردن محلول شستشو پلیت را خوب خشک کنید.

۶- حساسیت ضعیف

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
• استفاده از کالیبراتورهایی با منشاء سرم‌های غیرانسانی	• تست را با کالیبراتورهایی که منشاء سرم انسانی دارند تکرار کنید.
• در تهیه آنزیم کنژوگه آماده کار از مقدار مناسب و کافی آنزیم کنژوگه غلیظ در محلول رقیق‌کننده آن استفاده نشده	• با استفاده از پروتوکول کیت یک محلول آماده کار آنزیم کنژوگه تازه درست کنید.
• اشتباه در سمپلینگ آنزیم کنژوگه آماده کار	• کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید.
• زمان انکوباسیون ناکافی	• تست را دوباره با زمان انکوباسیون مناسب تکرار کنید.
• دما در حدی نیست که سازنده کیت پیشنهاد کرده، پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد	• تست را طبق دستور پروتوکول و بدون وقفه‌های اضافی انجام دهید

۷- ابزوربنس کالیبراتورها (استانداردها) بالاست

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
---------------	-------------

<ul style="list-style-type: none"> • تست را طبق دستور پروتوکول و بدون وقفه‌های اضافی انجام دهید. 	<ul style="list-style-type: none"> • پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی در دمای بالاتر از آنچه سازنده کیت سفارش کرده باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد
<ul style="list-style-type: none"> • کالیبراسیون سمپلرها را بازرسی کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • مقادیر کافی از نمونه‌ها را در چاهک‌ها ریخته نشده

۸- نمونه، ابزوربنس خارج از رنج کالیبراتورها دارد	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<ul style="list-style-type: none"> • نمونه را با کالیبراتور صفر رقیق کرده و تست را تکرار کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • غلظت در نمونه بسیار بالاست

۹- کلیه ابزوربنس‌ها پایین است	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<ul style="list-style-type: none"> • زمان واکنش سوپسترا با آنزیم کنژوگه را افزایش دهید (البته با هماهنگی سازنده کیت) پیشنهاد می‌شود دمای آزمایشگاه را بین ۲۰ تا ۲۵ درجه حفظ کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • دمای اتاق زیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد است

۱۰- کنترل از رنج خارج است	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<ul style="list-style-type: none"> • تست را با یک کنترل جدید تکرار کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • آلودگی کنترل
<ul style="list-style-type: none"> • تست را با کالیبراتورهای جدید تکرار کنید. 	<ul style="list-style-type: none"> • آلودگی کالیبراتورها

۱۱- استریپ‌ها از نگهدارنده آن‌ها در پلیت خارج می‌شوند	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی

<ul style="list-style-type: none"> • تجربه ناکافی تکنسین 	<ul style="list-style-type: none"> • در هنگام خشک کردن پلیت باید آن را محکم در دست گرفت و بر دو طرف آن فشار آورد تا استریپ‌ها از هلدرد خود خارج نشوند.
---	---

۱۲- استریپ‌ها در هلدرد فیت نمی‌شوند	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<ul style="list-style-type: none"> • جهت نامناسب استریپ‌ها و یا هلدرد نامناسب 	<ul style="list-style-type: none"> • جهت استریپ‌ها را ۱۸۰ درجه تغییر دهید و یا از هلدرد مناسب استفاده نمایید.

۱۳- کروموژن آبی رنگ شده است	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<ul style="list-style-type: none"> • آلوده شده است 	<ul style="list-style-type: none"> • از کروموژن تازه استفاده کنید.

۱۴- بعد از ترکیب کروموژن و سوپسترا محلول آبی رنگ می‌شود	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<ul style="list-style-type: none"> • آلوده شده‌اند 	<ul style="list-style-type: none"> • از کروموژن و سوپسترای تازه استفاده کنید.

۱۵- محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution) زرد رنگ شده	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<ul style="list-style-type: none"> • آلوده شده است 	<ul style="list-style-type: none"> • از محلول تازه استفاده کنید.

۱۶- رسوب و ذرات سیاه در چاهک‌ها قبل از خواندن ابزوربنس	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<ul style="list-style-type: none"> • واکنش آنزیم کنژوگه و سوپسترا بیش از ۳۰ دقیقه به طول انجامیده 	<ul style="list-style-type: none"> • تست را تکرار کرده و زمان واکنش آنزیم کنژوگه و سوپسترا را کاهش دهید.

۱۷- حتی پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون سوپسترا رنگی ظاهر نمی‌شود	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<ul style="list-style-type: none"> • نسبت‌های نامناسب از کروموژن 	<ul style="list-style-type: none"> • محلول تازه با نسبت‌های صحیح درست کنید.

و سوپسترا ترکیب شده‌اند	
• سوپسترا خراب شده است	• با تولیدکننده تماس بگیرید.

۱۸- رنگزایی با سرعت زیادی حادث می‌شود	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
• غلظت آنزیم کنژوگه بالاست	• می‌توان تیت‌های مختلف را از آنزیم کنژوگه چک کرد تا بهترین تیت به دست آید و یا با سازنده کیت تماس گرفت
• آنزیم کنژوگه آلوده شده است	• مطمئن شوید که ظروف و وسایل مورد استفاده آلوده نبوده‌اند.

۱۹- رنگزایی با تأخیر و با سرعت کم حادث می‌شود	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
• نمونه‌ها به دمای اتاق نرسیده‌اند	• قبل از انجام تست نمونه‌ها را به دمای اتاق برسانید.
• آنزیم کنژوگه ضعیف است	• طرز تهیه آن را دوباره چک کنید، تست را با محلول آنزیم کنژوگه دوباره آماده شده تکرار کنید.
• برخی نگهدارنده‌ها اثر منفی در فعالیت آنزیم دارند (مانند اثر بازدارنده سیدم آزاید بر آنزیم پراکسیداز)	• از استفاده از نگهدارنده‌های بازدارنده بپرهیزید.
• دمای پایین آزمایشگاه و یا دمای پایین سوپسترا	• دمای آزمایشگاه و سوپسترا را چک کنید (دما باید بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد باشد)

نکات پیشنهادی در مورد برخی تکنیک‌های الایزا

شستشو (Washing)

عملیات شستشو جهت جدا کردن ترکیبات باند شده به کف چاهک‌ها از آن‌هایی که متصل نشده‌اند صورت می‌گیرد، این عمل با خالی کردن مایع داخل چاهک‌ها و ریختن مایع شستشو به داخل آن‌ها انجام می‌شود

که معمولاً حداقل باید سه بار این عمل را تکرار کرد، محلولی که جهت شستشو استفاده می‌گردد باید دارای شرایط خاصی باشد مثلاً باید شرایط ایزوتونیکی ایجاد نماید تا بر پیوند آنتی‌ژن و آنتی‌بادی اثر سوء نداشته باشد، یکی از بهترین محلول‌ها که بیشترین استفاده را جهت شستشو در الایزا دارد محلول PBS می‌باشد (آب معمولی به علت این که دارای شرایط یکسان و استیل در مشخصاتی چون pH، مولاریته و... نمی‌باشد مایع چندان خوبی جهت شستشو نیست). گاهی در برخی از محلول‌های شستشو از برخی دترجنت‌ها استفاده می‌گردد (مانند Tween) تا قدرت شستشوی محلول افزایش یابد، باید توجه داشت که در صورت استفاده از دترجنت‌ها در محلول شستشو باید دقت شود که این دترجنت اثر سوئی بر روی آنتی‌ژن‌ها نداشته باشد (مانند اثر دناتورسیون)، در ضمن در موارد استفاده از دترجنت در محلول شستشو احتمال به وجود آمدن حباب در هنگام ریختن محلول شستشو در چاهک‌ها وجود دارد که این حباب‌ها می‌توانند از تماس محلول با کف چاهک ممانعت کرده و در نتیجه عملیات شستشو را در آن نواحی مختل کنند لذا باید از تشکیل حباب در چاهک‌ها در هنگام شستشو به شدت اجتناب ورزید.

شستشوی دستی (Manual Washing)

در شستشوی دستی پلیت، مهم‌ترین نکته این است که تمام نقاط چاهک‌ها در تماس با محلول شستشو قرار گیرند و نباید هیچ‌گونه حباب هوایی ایجاد شود.

شستشو با دستگاه‌های شستشوی پلیت یا استریپ

در این دستگاه‌ها سیکل‌های متعدد شستشو قابل برنامه‌ریزی است و این دستگاه‌ها باید به صورت روتین مورد معاینه قرار گیرند تا کارکرد آن‌ها دائماً مورد تأیید واقع شود زیرا ممکن است اشکالات خاصی که در آن‌ها ایجاد می‌شود مانع شستشوی صحیح گردند (مانند مسدود شدن کانال‌های شستشو).

نکاتی مهم در شستشو

- مراحل تهیه محلول شستشو را به دقت انجام دهید.
- صحت عمل دستگاه شستشو را روزانه و به صورت روتین چک کنید.

- از طراز بودن سطح پلیت در هنگام شستشو اطمینان حاصل کنید.
- مطمئن شوید که چاهک‌ها در هنگام شستشو کاملاً پر می‌شوند (در هنگام پر شدن چاهک‌ها سطح گنبدی مایع قابل مشاهده می‌باشد).
- از خروج باقی‌مانده‌های کنژوگه در هنگام شستشو اطمینان حاصل کنید.
- در هنگام شستشو از سرریز شدن محلول شستشو و ورود آن به چاهک‌های مجاور بپرهیزید.
- در دستگاه واشر فشار شستشو را کاهش داده و از فشارهای بالا استفاده نکنید.
- در هنگام شستشو باید طبق دستور کیت به تعداد دفعاتی که ذکر شده عملیات شستشو را انجام داد.
- بین هر مرحله شستشو پس از ریختن محلول شستشو ۲۰ ثانیه وقفه ایجاد کنید.
- در هنگام خالی کردن و یا آسپیره کردن محلول شستشو اطمینان حاصل کنید که تمامی آن خارج می‌شود.

- پس از اتمام مراحل شستشو یا برگرداندن پلیت بر روی کاغذ نم‌گیر ذرات باقی‌مانده را خارج کنید.

نکاتی مهم در سمپلینگ

- سمپلرها را طبق دستور سازنده آن‌ها مرتباً کالیبره کنید.
- از تماس نوک سمپلر از دیواره یک چاهک به چاهک دیگر بپرهیزید.
- از پاشیده شدن نمونه‌ها و سایر محلول‌ها به اطراف و سایر چاهک‌ها بپرهیزید.
- از خارج کردن محلول‌های باقی‌مانده در نوک سمپلر با فوت کردن بپرهیزید.
- برای هر نمونه یا محلول از نوک سمپلر جدید استفاده کنید.
- لوله سمپلر را جهت وجود قطرات و یا مواد خشک شده خشک کرده و در صورت وجود آن‌ها را پاک کنید.
- از فیت و محکم شدن نوک سمپلرها بر سر سمپلر اطمینان حاصل کنید.

نکاتی مهم در مورد میکروپلیت

- قبل از باز کردن درب کیسه حاوی میکروپلیت آن را به دمای اتاق برسانید.

- بعد از افزودن سوبسترا پلیت را در جای تاریک قرار دهید.
- در هنگام خالی کردن پلیت باید دو طرف آن را طوری فشار دهید که استریپ‌ها نتوانند خارج شوند.
- اگر استریپ‌ها در هلدِر خوب فیت نمی‌شوند ابتدا آن‌ها را ۱۸۰ درجه چرخانده و جا بزنید و اگر باز هم فیت نشدند از هلدِر مناسب استفاده کنید.
- استریپ‌های استفاده نشده را همراه با نم‌گیر به داخل کیسه مخصوص برگردانده و در آن را خوب ببندید.
- در زمان باز کردن درب پلیت در بار اول تاریخ را روی کیسه پلیت یادداشت کنید.
- اثر انگشت‌ها را توسط محلول شستشو از روی پلیت پاک کنید و آن را خشک کنید.
- توجه کنید که در هنگام انجام مراحل تست مانند شستشو، ریختن محلول‌ها در چاهک‌ها و قرائت ابزوربنس چاهک‌ها در جای خود باشند.
- قبل از قرائت ابزوربنس زیر پلیت را با دستمال مخصوص بدون ذرات پخش‌شونده پاک کنید.
- در خلال انجام تست نباید اجازه داد که کف چاهک‌ها خشک شوند.

نکاتی مهم در مورد آماده‌سازی سوبسترا

- از محلول‌های تازه کروموژن و سوبسترا (سوبسترای A و سوبسترای B) استفاده کنید.
- محلول سوبسترای آماده شده را بیش از یک ساعت نگهداری نکنید.
- طرز تهیه محلول سوبسترای آماده کار را به دقت مانند دستور کیت اجرا کنید.
- دمای محلول در نتیجه تست بسیار مهم است زیرا در تولید رنگ تأثیر بسزایی دارد.
- برای نگهداری محلول سوبسترای تازه را با محلول قدیمی در یک ظرف مخلوط نکنید.
- برای استفاده مجدد از ظروف سوبسترای کهنه آن‌ها را با محلول اسیدسولفوریک شسته و سپس چند بار با آب مقطر شستشو دهید.

نکاتی مهم در مورد آنزیم کنژوگه

- کنژوگه را در دمای ذکر شده در کیت نگهداری کنید.

- کنژوگه رقیق شده را برای مدت طولانی جهت انجام تست‌های دیگر نگهداری نکنید و همیشه به اندازه نیاز برای تستی که انجام می‌دهید محلول کنژوگه را آماده کنید.
- هرگز برای مدت طولانی محلول کنژوگه را در روی میز کار باقی نگذارید.

نکاتی مهم در مورد افزودن نمونه

- گاهی برخی اشکالات در سمپلینگ نمونه باعث ایجاد جواب ناصحیح می‌شود که عبارتند از:
- قرار نگرفتن نمونه در مرکز کف چاهک‌ها یا بافر موجود در چاهک و تماس آن با دیواره‌های چاهک‌ها.
 - ایجاد کف و حباب در هنگام افزودن نمونه.

نکاتی در مورد محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)

محلول متوقف‌کننده واکنش جهت جلوگیری از واکنش بیشتر آنزیم در الایزا افزوده می‌شود، عمل متوقف‌سازی واکنش معمولاً در زمانی صورت می‌گیرد که عملیات تولید محصول از واکنش آنزیم و سوبسترا هنوز در فاز خطی (Linear) می‌باشد. اسیدها و بازهای قوی با مولاریته بالا با دناتوره کردن ساختمان آنزیم فعالیت آن را متوقف می‌سازند، برخی محلول‌های استاپینگ به صورت اختصاصی بر روی آنزیم‌های خاص اثر می‌گذارند (Enzyme-Specific) مثلاً سدیم آزاید مهارکننده آنزیم HRP می‌باشد و EDTA با شلاته کردن یون آهن کو-فاکتور آنزیم آلکان فسفاتاز این آنزیم را مهار می‌کند.

در بسیاری از تست‌های الایزا پس از افزودن محلول متوقف‌کننده واکنش طیف جذبی محصول تغییر می‌کند مثلاً رنگ محلول داخل چاهک از آبی به زرد تبدیل می‌شود که ماکزیمم جذب رنگ حاصل معمولاً در ۴۵۰ نانومتر و یا ۴۹۲ نانومتر خواهد بود.

نکاتی مهم در مورد دما

- تقریباً نیم ساعت قبل از شروع تست تمامی اجزای کیت را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) برسانید.

- دمای کلیه انکوباتورها را چک و تنظیم نمایید، به یاد داشته باشید که دمای پایین‌تر از حد لازم می‌تواند باعث کاهش ابزوربنس شده و دمای بالاتر از آن می‌تواند باعث افزایش ابزوربنس شود در ضمن تبخیر مایع در چاهک‌ها می‌تواند باعث اثر لبه‌ای (Edge Effect) گردد که در نتیجه آزمایش اختلال ایجاد می‌کند.
- دمای مناسب برای انکوباسیون در دمای اتاق، ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد بنابراین دمای اتاق را با استفاده از ترمومتر حساس و کالیبره شده اندازه‌گیری کرده و تنظیم نمایید.
- دستیابی به دمای کاملاً مناسب برای هر تست از ضروریات است، بنابراین:
 - ۱- کالیبراسیون تایمرها را بررسی کنید و در صورت عدم دقت کافی، آن‌ها را تنظیم و یا تعمیر نمایید.
 - ۲- زمان انکوباسیون‌ها را ثبت نمایید.
 - ۳- پس از افزودن محلول متوقف‌کننده واکنش هر چه سریع‌تر ابزوربنس‌ها را قرائت نمایید.

نکاتی مهم در مورد شیکینگ و روتیشن

- شیکینگ و روتیشن باعث می‌شود که از یک طرف مواد در حال واکنش خوب با هم مخلوط شوند و از طرف دیگر مواد موجود در مایع داخل چاهک‌ها به صورت پیوسته در تماس با فاز جامد قرار گیرند.
- با عمل شیکینگ و روتیشن می‌توان انرژی کینتیک سیستم را فراهم نمود که در این صورت واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی افزایش پیدا کرده و گاهی نیاز به انکوباسیون در دمای بالاتر جبران خواهد شد.

اثر هوک (Hook effect)

یکی از مهم‌ترین اشکالات غیرتکنیکی است که در روش‌های ایمونولوژیک دیده می‌شود. اثر هوک عبارت است از کاهش کاذب نتایج در واکنش‌های ایمونولوژیک در حالی که غلظت بالای آنالیت وجود دارد. این پدیده معادل پدیده پروزون در واکنش‌های سرولوژی است، زمانی دیده می‌شود که غلظت بالایی از آنالیت در سرم وجود داشته و علی‌رغم بالا بودن غلظت آنالیت، نتیجه کاذبی کمتر از حد واقعی به دست می‌آید. در حالت عادی منحنی استاندارد رسم شده حالت صعودی داشته و به موازات افزایش غلظت استاندارد جذب نوری هم بیشتر می‌شود. اما چنانچه پدیده هوک ایجاد شود منحنی به جای سیر صعودی مداوم، در جایی از مسیر

سبز نزولی پیدا می‌کند و به شکل قلاب (Hook) درمی‌آید که علت نامگذاری این پدیده به این نام همین مورد است.

اثر لبه (Edge effect)

به علت عدم یکنواختی حرارتی و یا تابش نور به نوارهای (استریپ‌های الایزا) لبه‌ای و مرکزی اغلب سوبستراها به نور حساس هستند و همچنین تفاوت دمای نوارها (استریپ‌های الایزا) در 37°C به دلیل این که نوارهای کناری به دلیل باز و بسته کردن در انکوباتور در معرض تغییرات دمایی بوده و بنابراین جذب نوری نوارهای کناری کمتر از نوارها و چاهک‌های داخلی‌تر خواهد بود.

تکنیک ایمنوفلورسانس (Immuno Fluorescent Assay (IFA)

در سال ۱۹۴۱، Albert Coons نشان داد که می‌توان آنتی‌بادی‌ها را با مولکول فلورسنت نشاندار کرد یا در واقع آنتی‌بادی‌ها می‌توانند با مولکول‌های فلورسنتس لیبل شوند. این ترکیبات فلورسنت، فلوروفور یا یا فلوروکروم نامیده می‌شوند. مولکول فلورسنت، طول موج خاصی از نور را جذب کرده و در واقع انرژی فوتون‌های نوری به الکترون‌های آن منتقل و سبب برانگیخته شدن الکترون‌ها و دارای سطح بالاتری از انرژی شوند که این الکترون‌ها هنگام برگشت به حالت پایه مقداری از این انرژی را در زمان کوتاهی 10^{-15} s به صورت گرما آزاد می‌کنند. هنگامی که الکترون به سطح پایین‌تری از انرژی جنبشی در حالت تهییج شده می‌رسد، باقی‌مانده انرژی بعد از چند نانوثانیه به صورت یک فوتون نور با انرژی کمتر از فوتون اولیه آزاد می‌شود.

فلوروفورها مولکول‌های ارگانیک با ساختمان حلقوی بوده و هر یک طیف جذب بهینه (optimal) خاصی دارند. از انواع فلوروکروم‌ها می‌توان به فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC)، فیکواریترین (PE)، تترامتیل رودامین ایزوتیوسیانات، Texas Red، Cy ۳، Cy ۵، yellow VS، Lucifer، آمینو متیل کومارین استیک اسید اشاره کرد. یک پروب فلورسنت ایده‌آل باید پایداری و شدت بالایی داشته باشد تا به راحتی از فلورسانس زمینه تشخیص داده شود.

دو ماده فلورسین و رودامین معمولاً به فرم ایزوتیوسیانات بوده و در طی انکوباسیون به سادگی با گروه‌های آمینی آزاد آنتی‌بادی اتصالات کووالان برقرار می‌کند. این دو ماده فلورسنت بیشتر از سایر ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در روش ایمونو فلورسانس از آنتی‌سرم‌های انسان، بز، گوسفند و خرگوش جهت کونژگاسیون با فلوروکروم استفاده می‌گردد.

حداکثر جذب ایزوتیوسیانات فلورسین در طول موج ۴۹۵-۴۹۰ نانومتر بوده و تابش نور سبز آن در طول موج ۵۲۰-۵۱۷ نانومتر صورت می‌گیرد. این ترکیب شدت زیاد، پایداری نوری بالا و بازده کوانتوم بالا دارد.

از دیگر روش‌های نشاندار کردن آنتی‌بادی با مولکول‌های فلوروکروم استفاده از Micro Sphere های فلورسنت بوده، یک Micro Sphere حاوی هزاران مولکول فلوروکروم است که در پوششی از لاتکس قرار می‌گیرد.

روش‌های فلورومتريک بسیار حساس‌تر از روش‌های کلرومتریکی بوده و یکی از این روش‌ها ELF (Enzyme-Labeled Fluorescence) می‌باشد که در سال ۱۹۹۵ توسط لاریسو و همکارانش ابداع گردید. در این روش از سوبستراهای فلوروژنیک برای بخش‌های با واسطه آنزیم‌ها مانند آلکالین فسفاتاز استفاده می‌شود.

تکنیک‌های فلورسنت فوق‌العاده حساس و اختصاصی بوده و به طور کلی می‌توان براساس این که آنتی‌بادی اصلی لیبل فلورسنت دارد یا نه، روش‌های ایمونوفلورسانس را به دو گروه مستقیم و غیرمستقیم تقسیم کرد.

۱- ایمونوفلورسانس مستقیم

در این روش آنتی‌بادی کونژگه با نشانگر فلورسنت، مستقیماً به آنتی‌ژن مجهول روی اسلاید فیکس شده اضافه می‌شود. بعد از انکوباسیون و شستشو، اسلاید به وسیله میکروسکوپ فلورسانس بررسی می‌شود آنتی‌ژن‌ها به طور تیپیک با نور سبز یا زرد- نارنجی در یک زمینه سیاه قابل رؤیت هستند. ایمونوفلورسانس مستقیم برای تشخیص آنتی‌ژن‌ها در سلول، بافت یا مایعات بدن، اسمیر میکروارگانیزم‌ها بسیار مناسب است در حالی که روش‌های غیرمستقیم برای تشخیص آنتی‌ژن و هم آنتی‌بادی به کار می‌روند. از این روش برای شناسایی میکروارگانیزم‌هایی مانند لژیونلا، پنوموفیلا، پنوموسیستیس کارینی، کلامیدیا تراکوماتیس، ناپسریا،

بررسی زیر گروه‌های لنفوسیت‌ها، بررسی رسوبات پروتیین در بافت‌هایی مانند کلیه و پوست بیماران مبتلا به لوپوس و گلو مریولونفریت استفاده می‌شود.

۲- ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

اساس IFA (ایمونوفلورسانس غیرمستقیم Indirect Immunofluorescent Assay) این است که آنتی‌بادی‌ها نه تنها با آنتی‌ژن همولوگ واکنش می‌دهند بلکه همچنین می‌توانند خود به عنوان آنتی‌ژن عمل کرده و با آنتی‌ایمونوگلوبولین‌ها نیز واکنش دهند.

ایمونوفلورسانس غیرمستقیم شامل دو مرحله است در ابتدا آنکوباسیون سرم بیمار با یک آنتی‌ژن شناخته شده متصل به فاز جامد (اسلاید) انجام شده، سپس اسلاید شسته شده و آنتی‌ایمونوگلوبولین لیبل با فلوروکروم اضافه می‌گردد. در این روش یک آنتی‌بادی کونژگه را می‌توان برای انواعی از واکنش‌ها به کار برده و نیازی به آنتی‌بادی‌های معرف نشاندار و خالص شده متعدد نمی‌باشد.

روش غیرمستقیم یک تکنیک بسیار حساس بوده و حتی حساس‌تر از ایمونوفلورسانس مستقیم است که با آن می‌توان آنتی‌بادی را در غلظتی کمتر از $0.1 \mu\text{g/mL}$ تشخیص داد. در این روش فلورسانس شفاف‌تر از تکنیک مستقیم بوده، زیرا چندین ایمونوگلوبولین فلورسانس به هر مولکول آنتی‌بادی باند شده و چندین سرم را می‌توان با یک معرف نشاندار پلی کلونال از نظر آنتی‌بادی اختصاصی غربال کرد. این روش برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد ترپونما، کلامیدیا، توکسوپلاسما، آنتی‌بادی‌های ضد هسته (ANA)، آنتی‌بادی‌های ضد ویروس‌هایی مانند هرپس سیمپلکس، اپشتین بار و سایتومگالوویروس و به خصوص جهت تشخیص اتو آنتی‌بادی‌ها به کار برد.

ایمونوفلورسانس به روش کمی

ایمونوفلورسانس به روش کمی را می‌توان همانند آنزیم ایمونواسی (EIA) به دو گروه هموزنوس و هتروژنوس تقسیم کرد. در این تست‌ها نشانگر مواد فلورسنت هستند و می‌توان از این مواد برای نشاندار کردن هم آنتی‌ژن و هم آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های هسته‌ای، استفاده کرد. از این روش برای شناسایی آنتی‌ژن

توکسوپلازما، ویروس سرخک و آنتی‌ژن‌های متعدد ویروسی استفاده کرد. همچنین از بخش‌های فلورسنت جهت شناسایی ترکیبات بیولوژیکی مهم مانند کورتیزول، پروژسترون تروکسین (T₄) استفاده می‌گردد.

از روش‌های ایمنوفلورسانس هتروژن می‌توان به روش ایمنوفلورسانس مهارى اشاره کرد که یک روش Blocking است. در این تست ابتدا آنتی‌ژن با آنتی‌بادی غیرنشاندار مجاور شده و در مرحله بعدی با آنتی‌بادی نشاندار شده مجاور می‌شود. بعد از شستشو، در بررسی لام اگر هم آنتی‌بادی نشاندار و هم غیرنشاندار برای آنتی‌ژن مورد نظر همولوگ باشند، هیچ فلورسانسی دیده نخواهد شد.

بسیاری از پیشرفت‌های اخیر در روش ایمنوفلورسانس مربوط به ایمنونواسی هموژن بوده که در آن همانند روش‌های EIA به جداسازی نیاز ندارند. بنابراین انجام آن‌ها بسیار سریع و راحت بوده و فقط یک مرحله انکوباسیون انجام می‌گیرد و نیازی به مرحله شستشو ندارد.

از روش‌های دیگر می‌توان به روش FPIA (Fluorescence Polarization Immuno Assay) اشاره کرد. اساس آن تغییر در پولاریزاسیون نور فلورسنت ساطع شده از مولکول فلوروکروم متصل به آنتی‌ژن است که با اتصال این آنتی‌ژن نشاندار به آنتی‌بادی مربوطه حاصل می‌شود.

در روش FPIA آنتی‌ژن‌های نشاندار شده با فلوروکروم با آنتی‌ژن‌ها غیرنشاندار موجود در نمونه بیمار برای تعداد محدودی از جایگاه اتصال آنتی‌بادی رقابت می‌کنند. وجود مقدار زیاد آنتی‌ژن در نمونه بیمار باعث می‌شود تا آنتی‌ژن نشاندار فلورسنت کمتری به آنتی‌بادی متصل شده و در نتیجه پلاریزاسیون کمتری شناسایی گردد. بنابراین درجه پلاریزاسیون فلورسانس به طور معکوس با غلظت آنالیت مورد بررسی متناسب است.

کاربرد FPIA محدود به مولکول‌های کوچک است که آزادانه در محلول وجود داشته و معمولاً در آنالیت‌های با وزن مولکولی کمتر از ۲۰۰۰d کاربرد دارند. از این روش بیشتر برای تعیین غلظت هورمون‌ها و داروها استفاده می‌شود. این روش به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته و گران‌قیمت و آنالیزورهای اتومات استفاده آن در آزمایشگاه‌های بالینی رایج نشده است. ولی از روش‌های ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و ایمنوفلورسانس کمی رایج‌تر می‌باشد.

ایمونوفلورسانس در میکروبیولوژی

کاربرد آن در تست‌های تشخیص میکروبیولوژی برای شناسایی ارگانیس‌های جدا شده، وجود ارگانیس‌های عفونی در بیوپسی بافتی یا اگزودا و یا تشخیص عفونت از طریق آنتی‌بادی اختصاصی می‌باشد. یک نمونه کلاسیک آن تست آنتی‌بادی فلورسنت ترپونمایبی FTA-ABS test بوده که در آن از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده می‌شود. (ترپون‌پالیدیوم کشته شده + سرم بیمار + آنتی هیومن گلوبولین نشاندار) این تست حساسیت و اختصاصیت زیادتری نسبت به آنتی‌بادی‌های سیفیلیسی در روش‌های ثبوت مکمل و فلوکولاسیون دارد. FTA-ABS اولین تستی است که در سیفیلیس زودرس مثبت شده و چندین سال پس از درمان سیفیلیس زودرس نیز مثبت باقی می‌ماند.

ایمونوفلورسانس در تشخیص اتوآنتی‌بادی‌ها

از این روش جهت تشخیص اتوآنتی‌بادی‌ها در بیماری‌های اتوایمیون مختلف استفاده می‌شود. به عنوان مثال ANA (Anti Nuclear Antibody) که گروه هتروژنی از آنتی‌بادی‌ها که با تمام هسته یا اجزای هسته مانند پروتئین‌ها، ssDNA، dsDNA و هیستون‌ها واکنش می‌دهند و به طور عمده با ایمونوفلورسانس غیرمستقیم سنجیده می‌شوند.

در این تست رقت‌هایی از سرم بیمار با سلول‌های کشت بافتی مانند رده سلولی HePG₂ مجاور می‌شوند. پس از اتصال آنتی‌بادی اختصاصی ایزوتیپ IgG، IgM و IgA موجود در سرم به این سلول‌ها، از یک آنتی‌بادی ثانویه نشاندار جهت تشخیص استفاده می‌شود. الگوی اتصال آنتی‌بادی‌های بیمار به آنتی‌ژن‌های هسته‌ای متغیر است و برای بیماری‌های اتوایمیون به خصوص لوپوس اریتماتوس (SLE) کاربرد تشخیصی دارد. این الگوها شامل Homogeneous، Peripheral، Speckled، Diffused Nuclear Fluorescence می‌باشند. در الگوی Nuclear rim یا Peripheral آنتی‌بادی ضد DNA و DNP وجود داشته و معمولاً با لوپوس فعال، نفريت لوپوسی و سندرم شوگرن همراه است. در حالی که در الگوی Honogenous یا Diffused در حدود ۷۰٪ بیماران مبتلا به لوپوس و اختلالات بافت پیوندی این الگو دیده می‌شود.

الگوی Speckled در اکثر بیماری‌های اتوایمیون از جمله لوپوس و RA دیده می‌شود. الگوی Nuclear staining در بیماران اسکرودرما یا اسکروزیس سیستمیک پیشرفته (PSS) و سندرم شوگرن دیده می‌شود. جهت تشخیص آنتی‌بادی ضد DNA دو رشته‌ای (dsDNA) به روش ایمونوفلورسانس از انگل Chritidia Lucilliae استفاده می‌شود. کینتوپلاست این انگل غنی از DNA دو رشته‌ای خالص است. ابتدا کینتوپلاست فیکس شده در سطح لام با سرم بیمار مجاور شده و اگر آنتی‌بادی IgG ضد DNA دو رشته‌ای در سرم وجود داشته باشد به کینتوپلاست متصل شده و سپس با آنتی‌بادی ضد DNA فلورسئین نشاندار مجاور می‌شود، ایجاد حالت فلورسانس نشان‌دهنده وجود آنتی‌بادی در سرم بیمار می‌باشد این روش اختصاصیت ۹۰٪ دارد. همانطور که قبلاً اشاره شد تست ANA برای بیماری لوپوس اریتماتوس اختصاصی نبوده و در بیماری‌های دیگر از جمله RA و حتی در سرم افراد سن بالا نیز یافت می‌شود، هر چند در سرم ۹۵٪ بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوس این اتوآنتی‌بادی وجود دارد. آنتی‌بادی ضد عضلات صاف (SMA) یا آنتی‌بادی ضد میکروزوم‌های کبد و کلیه (LKM) یا آنتی ضد میتوکندری در تشخیص بیماری‌های کبد از قبیل هپاتیت مزمن فعال و سیروز اولیه استفاده می‌شود.

ANCA (Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibody) اتو آنتی‌بادی دیگری است که از آن در تشخیص و افتراق گلومرولونفریت، کولیت اولسراتیو، بیماری‌های التهابی کبد، هپاتیت اتو ایمیون، بیماری‌های واسکولیت التهابی مانند گرانولوماتوز استفاده می‌شود. از آن جایی که ANCA یک آنتی‌بادی ضد اجزای داخلی نوتروفیل می‌باشد، از نوتروفیل به عنوان سوپسترا در تشخیص آن به روش ایمونوفلورسانس استفاده می‌شود.

ایمونوپاتولوژیست‌ها از روش ایمونوفلورسانس برای تشخیص بیماری‌های ناشی از کمپلکس‌های ایمنی تجمع یافته در بافت‌ها استفاده زیادی می‌کنند. در این تکنیک از بافت مربوطه بیوستی تهیه شده و پس از فیکس و فریز شدن، مقطع‌گیری می‌شود. سپس این مقاطع فریز شده با آنتی‌بادی‌های نشاندار فلورسنت مجاور می‌شوند. این آنتی‌بادی فلورسنت بر علیه ایمونوگلوبولین‌ها، C_۳، فیبرینوژن می‌باشد که معمولاً در بافت‌های آسیب‌دیده تجمع دارند.

منابع خطا، نقاط ضعف و قوت ایمونوفلورسانس

۱- استفاده از فلورسانس در ایمونواسی پتانسیل بالایی از نظر حساسیت و تنوع دارد.

- ۲- روش ایمونوفلورسانس روش کار ساده‌ای داشته و مواد مورد استفاده در آن مانند مواد رادیواکتیو خطرناک نبوده و خطر زیست‌محیطی ندارد.
- ۳- سرعت زیاد و کاهش سیگنال زمینه‌ای در این روش یکی از مزایای این روش می‌باشد.
- ۴- قدرت اتصال مولکول‌های فلوروکروم به آنتی‌ژن زیاد می‌باشد.
- ۵- استفاده از کنترل مثبت و کنترل منفی در انجام هر تست الزامی بوده و از بروز خطا می‌کاهد.
- ۶- نگهداری، کیت‌ها و محلول‌ها و اسلایدها و به خصوص آنتی هیومن گلوبولین کونژگه حاوی فلوروکروم در شرایط نامناسب منجر به خرابی کیت می‌گردد.
- ۷- سرم بیماران باید در شرایط ناشتایی جمع‌آوری گردد، زیرا سرم بیماران ناشتا به دلیل شفافیت برای انجام آزمایش مناسب بوده و سرم‌های لیپمیک و همولیز سبب افزایش فلورسانس زمینه‌ای می‌گردد.
- ۸- مشکل اساسی در ایمونوفلورسانس تفکیک سیگنال مربوط به نشانگر فلورسانس از اتوفلورسانس ایجاد شده به وسیله مواد ارگانیکی است که در حالت طبیعی در سرم وجود دارند.
- ۹- مشکل دیگر وجود اتصالات غیراختصاصی به مواد موجود در سرم است که می‌تواند سبب خاموش شدن (Quenching) یا کم شدن سیگنال و در نتیجه تغییر در میزان فلورسانس می‌شود.
- ۱۰- مشکل دیگر Photo bleaching (یعنی تخریب فتوشیمیایی فلوروفور) که باعث اشکال در دیدن مولکول‌های فلورسنت با میکروسکوپ می‌گردد. تخریب مولکول فلوروفور با برخورد نوری که جهت تحریک و ایجاد فلورسانس به کار برده می‌شود، صورت می‌گیرد. البته از Photo bleaching جهت از بین بردن اتوفلورسانس و یا در تکنیک‌های FLIP یا FRAP استفاده می‌شود.
- کاهش فعالیت ایجاد شده با Photo bleaching را می‌توان به وسیله کاهش شدت یا مدت زمان تماس با نور، کنترل کرد. همچنین از طریق افزایش غلظت فلوروفورها و به کار بردن فلوروفورهای بسیار قوی که کمتر مستعد Bleaching هستند مانند Dylight Fluors، alex Fluors و Seta Fluors این نقیصه را جبران نمود.
- ۱۱- از نقاط ضعف روش ایمونوفلورسانس صرف زمان زیاد جهت تیتراسیون سرم‌های مثبت که نیاز به تکنسین بسیار با تجربه و آموزش دیده جهت انجام آزمایش و تفسیر آن‌ها است.

۱۲- نیاز به تجهیزات اختصاصی و گران قیمت امکان استفاده از آن‌ها را در آزمایشگاه‌ها محدود می‌کند.

سنجش‌های ایمنی کمی لومینسانس (Chemiluminescent Immunoassays)

کمی لومینسانس تکنیک آزمایشگاهی دیگری که برای بررسی ترکیب شدن آنتی‌ژن - آنتی‌بادی به کار می‌رود. در این تکنیک، انتشار نور ایجاد شده با یک واکنش شیمیایی که معمولاً این واکنش نوعی واکنش اکسیداسیون می‌باشد که در آن یک مولکول برانگیخته‌ای تولید می‌کند که با برگشت آن به حالت اولیه، از خود نور ایجاد می‌کند. در واقع کمی لومینسانس یک واکنش شیمیایی با پدیده لومینسانس، الکترون‌ها تهییج (Excited) شده به سطح بالاتری از انرژی در مدار بالاتر رسیده که با برگشت به مدار اولیه (Ground State) و سطح پایین‌تری از انرژی، فوتون‌هایی از خود ساطع می‌کنند. این پدیده به نام پدیده نشر نوری یا انرژی شعاعی نیز نامیده می‌شود. براساس روش تهییج و مکانیسم انتشار نور حاصله، انواع مختلفی از پدیده لومینسانس ایجاد می‌شود که تفاوت در نحوه ارتقاء الکترون به سطح تهییج شده می‌باشد. لومینسانس بسیار شبیه فلورسانس است با این تفاوت که در این پدیده منشاء تأمین نور یک واکنش شیمیایی است.

مولکول‌های زیادی قابلیت کمی لومینسانس را دارند اما متداول‌ترین موادی که استفاده می‌شوند عبارتند از لومینول، آکریدینیوم استرها، مشتقات روتنیوم و نیتروفنیل‌اگزالات‌ها. زمانی که این مواد با پراکسید هیدروژن و یک آنزیم به عنوان کاتالیت اکسید شوند، واسطه‌هایی ایجاد می‌شوند که سطح انرژی بالاتری دارند.

این واسطه‌های به طور خودبه‌خود به حالت اولیه برگشته و انرژی را به شکل نور آزاد می‌کنند. طیف انتشارات از یک فلش سریع نور تا تابش مداومی که می‌تواند چند ساعت طول کشد. این نوع لیبل کردن می‌تواند برای سنجش‌های هتروژن و هموزن استفاده شود.

به طور کلی دو نوع لومینسانس وجود دارد: بیولومینسانس و کمی لومینسانس

۱- بیولومینسانس

این پدیده معمولاً به طور طبیعی در موجودات زنده اتفاق می‌افتد. برای اولین بار توسط McElroy در سال ۱۹۴۷ این پدیده در سیستم لومینسانس لوسی فراز کرم شب‌تاب و سیستم لوسی فراز باکتریایی شرح داده

شد. در کرم شب‌تاب این سیستم اختصاصی ATP بوده و در باکتری‌ها این سیستم اختصاصی NADPH یا NADH می‌باشد.

حساسیت سیستم لوسی فراز در تکنیک‌های آزمایشگاه مناسب به نظر می‌رسد، البته این ماده کمیاب بوده و استفاده آن در آزمایشات محدود می‌باشد. هر چند این سیستم حساسیت بسیار زیادی نسبت به سایر مواد بیولومینسانس دارد ولی قیمت این مواد بالا بوده و به سهولت در کارهای آزمایشگاهی استفاده نمی‌شود.

۲- کمی لومینسانس

کمی لومینسانس نوع دیگری از واکنش‌های لومینسانس می‌باشد که در آن به واسطه تأثیر اکسیژن یا پراکسیدها بر روی برخی مواد، نور تولید می‌شود. کمی لومینسانس در واقع نشر نوری است که سوپسترای تهییج شده، هنگام برگشت به سطح پایه انرژی از خود ساطع می‌کند. در تکنیک کمی لومینسانس تشعشع حاصل یک واکنش شیمیایی (واکنش‌های اکسیداسیون) بوده و این ویژگی باعث می‌شود تا نور زمینه به حداقل رسیده و از نظر تئوری برابر صفر است.

مولکول‌های زیادی خاصیت کمی لومینسانس داشته و در حالت کلی به پنج دسته اصلی تقسیم می‌شوند، و شامل هیدرازین‌ها به ویژه لومینول، استرهای اکریلینوم، استرهای اگزالات، دی اگزتان روتینوم، در حضور عوامل اکسیدکننده این واکنش کامل شده و نور نشری از فرآورده تهییج شده و در واکنش اکسیداسیون به دست می‌آید. تابش نور می‌تواند از یک فلش سریع تا یک تابش پیوسته ساعت‌ها نیز طول کشد. در نهایت با سنجش قدرت واکنش نور منتشره را می‌توان، اندازه‌گیری کرد.

هر چند میزان فوتون افشانی واکنش‌های بیولومینسانس چندین برابر واکنش‌های کمی لومینسانس است، اما ترجیحاً در آزمایشگاه بیشتر از پدیده کمی لومینسانس استفاده می‌شود.

واکنش‌های کمی لومینسانس خود به دو دسته عمده Flash و Glow تقسیم‌بندی می‌شود. حساسیت واکنش‌های نوع Flash بیشتر از نوع Glow بوده اما به دلیل تکرارپذیری بالای واکنش‌های Glow و

هزینه‌های واکنش‌های Flash، از این روش کمتر در آزمایشگاه‌های بالینی استفاده شده و بیشتر در موارد تحقیقاتی کاربرد دارد.

واکنش‌های نوع Flash نیمه عمری حدود ۰/۳ تا ۲ ثانیه داشته و سریعاً از این می‌روند، هر چند حساسیت بسیار بالایی حدود $10^{-18} \times 0/5$ مول دارند.

واکنش‌های نوع Glow دارای پیک حدود ۲ تا ۵ دقیقه داشته و واکنش حدود ۲۰ تا ۳۰ دقیقه به طول می‌کشد تا به تدریج کاهش یابد و در طی این مدت واکنش را می‌توان اندازه‌گیری کرد.

به عنوان مثال اکسیداسیون ایزولومینول به وسیله پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در حضور یک کاتالیست مانند میکروپراکسیداز ایجاد یک تشعشع نوری نسبتاً پایدار در ۴۲۵nm (نانومتر) می‌نماید. در حالی که اکسیداسیون استرآکریدینوم به وسیله پراکسید هیدروژن قلیایی در حضور دترجنت ایجاد یک فلاش یا جرقه نوری سریع می‌کند که ۱ تا ۵ ثانیه پایدار می‌ماند.

تمامی این واکنش‌ها در حضور کاتالیست‌هایی از قبیل آنزیم‌ها، یون‌های فلزی و یا کمپلکس‌های فلزی و Haemin انجام می‌گیرند.

۳- الکتروکیمی لومینسانس

روش کمی لومینسانس دارای اشکالاتی مانند کوتاهی مدت زمان، عدم اندازه‌گیری غلظت بسیار کم آنالیت، تأثیر نور تولید شده بر روی نمونه مجاور، اخیراً از روش جدید الکتروکیمی لومینسانس استفاده می‌شود. روش الکتروکیمی لومینسانس نوعی از کمی لومینسانس بوده که در آن واکنشی که به تولید نور می‌انجامد با جریان الکتریکی آغاز و با قطع جریان الکتریکی پایان می‌پذیرد. در این روش الکترودی از جنس پلاتین به سیستم افزوده شده که باعث تمرکز نور در محل آشکارساز می‌شود تا از تفرق آن جلوگیری نماید. الکترودها همچنین محدوده زمانی واکنش را نیز تنظیم می‌کند، به طوری که این عمل با برقراری جریان الکتریکی و قطع آن صورت می‌گیرد.

این کنترل زمان تابش نور مشکل تداخل بیش از حد نور تابش شده از نمونه‌های مجاور را برطرف می‌کند و کنترل محل تابش نور که تنها در سطح الکتروود صورت می‌گیرد توانایی انتقال کامل نور تولید شده را به

آشکارساز ممکن می‌سازد. با کنترل محل تابش نور می‌توان نور تابش یافته از یک واکنش ایمنولوژیک در یک نمونه را همزمان در محل‌های مختلف اندازه‌گیری کرد. از قابلیت‌های دیگر این سیستم پیشرفته توانایی سنجش چند آنالیت متفاوت به طور همزمان در یک نمونه مورد آزمایش در کوتاه‌ترین زمان به دست آورد.

کاربرد کمی لومینسانس در آزمایشات ایمنولوژیک

در این روش شدت نور تابش یافته و در واقع نور تولید شده توسط ماده نشاندار اندازه‌گیری می‌شود. با تلفیق یک واکنش کمی لومینسانس و یک واکنش ایمنولوژیک می‌توان تکنیک (CLIA یا CIA) یا کمی لومینسانت ایمنواسی را ایجاد کرد که با اندازه‌گیری مقدار نور تابش یافته، غلظت آنالیت‌های موردنظر قابل اندازه‌گیری است.

سوبستراهای کمی لومینسانس در بخش‌های هموزن و هتروژن به شکل Endpoint به کار می‌روند. زیرا می‌توان نشانگرها را هم به آنتی ژن و هم به آنتی‌بادی باند کرد. سنجش‌های هتروژنی در فرمت رقابتی هم با آنتی‌بادی و هم با آنتی‌ژن نشاندار قابل انجام هستند در حالی که در فرمت غیررقابتی (ساندویچ) این آنتی‌بادی است که نشاندار می‌شود.

با توجه به این که روش‌های سنجش ایمنی رقابتی بیشتر براساس اتصال رقابتی بین لیگاند نشاندار و لیگاند غیرنشاندار برای اتصال به یک آنتی‌بادی انجام می‌شوند و سپس با اندازه‌گیری تعداد خصوصیات فیزیکوشیمیایی موجود در نشانگر ادامه می‌یابند. پس با استفاده از یک منحنی استاندارد و سیگنال اندازه‌گیری شده می‌توان به طور غیرمستقیم غلظت‌های مربوط به لیگاند مجهول (آنالیت) را از روی این منحنی کالیبراسیون استخراج نمود، به گونه‌ای که نور ساطع شده در فرمت رقابتی به طور معکوس با مقدار آنالیت موجود در نمونه متناسب بوده در حالی که در فرمت ساندویچ نور ساطع شده مستقیماً متناسب با غلظت آنالیت موجود در نمونه است. از تکنیک‌های کمی لومینسانس در آزمایشگاه جهت سنجش پروتئین‌ها مانند AFP، β_2 گلوبولین، هورمون‌ها مانند هورمون استرادیول، پروژسترون، تستوسترون، تیروکسین، تومورمارکرها مانند CEA، الیگونوکلئوتیدها و توالی اسیدنوکلئیک ژنوم، داروها مانند دیگرکسین، در موارد

ایمونولوژی مانند نقص ایمنی، اتوایمنی، آلرژی، تعیین تیپ بافت، تشخیص آنتی‌بادی‌های تولید شده در بیماری‌های ویروسی مانند آنتی‌بادی سیتومگالوویروس، روبلا استفاده نمود.

در تشخیص بیماری گرانولوماتوز مزمن از این مکانیسم و با استفاد از لومینول جهت اندازه‌گیری انفجار تنفسی فاگوسیت‌ها استفاده می‌شود به گونه‌ای که اکسیداسیون لومینول سبب افزایش لومینسانس داخلی سلولی می‌شود.

واکنش‌های کمی لومینسانس از دو طریق استفاده قرار می‌گیرند:

۱- ماده کمی لومینسنت به عنوان نشانگر مستقیم به کار می‌رود که واکنش مذکور با افزودن سوبسترا کاتالیز می‌شود. لومینول، استرهای آکریدینیوم، کمپلکس‌های روتینیوم- ترای پروپلامین را نشانگرهای مستقیم گویند زیرا مستقیماً به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی و یا پروب DNA متصل می‌شوند.

۲- ترکیب کمی لومینسنت به عنوان سوبسترا برای واکنشگرهای ایمنی نشاندار با آنزیم به کار می‌رود و آنزیم‌ها به عنوان نشانگرهای غیرمستقیم مطرح می‌باشند. از جمله این آنزیم‌ها آلکان فسفاتاز، پراکسیداز تروپ کوهی (HRP) و بتا- گالاکتوزیداز می‌باشند.

در روش کمی لومینسانس فوتون‌های ساطع شده از ترکیبات لومینسنت در طی زمان بسیار کوتاهی تولید می‌شوند که این خصوصیت خود باعث افزایش ویژگی می‌گردد.

بخش‌های ایمنی لومینسانسی درجات حساسیتی چند برابر بیشتر از بخش‌های ایمنی رادیوایزوتوپی و فلورومتری داشته و روش کمی لومینسانس Array حساس‌ترین روش بخش ایمنی است که محدوده شناسایی آن در حد Attamol (10^{-18} مول) و حتی تا Zepta mol (10^{-21} مول) گزارش شده است. این بخش‌ها با لومینومتر قرائت می‌شوند و قادر به خواندن لوله یا پلیت‌های میکروتیتر هستند. متداول‌ترین ترکیبات کمی لومینسنت مورد استفاده در این متد استرهای آکریدینیوم و مشتقات ایزولومینول می‌باشند که هر دو بسیار حساس بوده و مصرف زیادی دارند و به راحتی با آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی کونژگه شده و استاندارد می‌شوند.

مزایا و معایب و خطاها در روش کمی لومینسانس

- ۱- به دلیل قابلیت بسیار بالای شناسایی این روش‌ها مانند کمی لومینسانس و بیولومینسانس، حساسیت این روش‌ها حتی هزاران بار بیشتر از روش‌هایی همانند الیزا می‌باشد.
- ۲- قادر به سنجش طیف وسیعی از آنالیت‌ها مانند هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها هستند.
- ۳- دارای تکرارپذیری، حساسیت، اختصاصیت و دقت بالا می‌باشند.
- ۴- دارای ایمنی بالا و غیر رادیواکتیو بودن از نظر آلودگی محیط بسیار مناسب می‌باشند.
- ۵- تابش نور مرئی و عدم نیاز به منبع نوری و فیلترهای خاص موجب سهولت اندازه‌گیری می‌گردد. به توسط قطعه PMT (Photo Multiplier) فوتون‌های بسیار ضعیف را نیز اندازه‌گیری می‌کند.
- ۶- این روش‌ها قادر به سنجش آنالیت در حد اتمول و زپتومول می‌باشند.
- ۷- نیاز به مقدار بسیار کم از واکنشگرها (آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی نشانگر) و معرف و محلول‌ها بوده و نسبتاً ارزان می‌باشند.
- ۸- سرعت بسیار بالایی در شناسایی در کوتاه‌ترین زمان را دارند.
- ۹- از معایب این روش بسته بودن سیستم بود که در این روش بایستی حتماً از دستگاه و کیت‌ها و محلول‌ها کاملاً انحصاری همان دستگاه و شرکت مورد نظر استفاده گردد.
- ۱۰- در صورت عدم تمیز نگه داشتن پروب نمونه‌ها و عدم شستشوی مجاری مایعات این صورت گرفتگی مجاری پیش می‌آید.
- ۱۱- بررسی تراکم داخل محفظه به طور مرتب انجام گیرد.
- ۱۲- تمیز نمودن محفظه آب و محفظه درون‌ریز و هم‌زن باید صورت گیرد تا جریان آب به راحتی صورت گیرد.
- ۱۳- در صورت اختلال در اندازه‌گیری آنالیت‌ها باید تعویض دریچه باریک و سلول اندازه‌گیری، صورت گیرد.

۱۴- از معایب دیگر این روش می‌توان به این موارد اشاره کرد که در روش الکترو کمی لومینسانس محل تابش نور تولید شده و مدت زمان آن در برخی از دستگاه‌ها قابل کنترل نبوده و امکان اندازه‌گیری غلظت بسیار اندک آنالیت وجود ندارد.

۱۵- در بسیاری از تکنیک‌های کمی لومینسانس به دلیل نزدیکی محل واکنش نمونه‌های مختلف، نور تولید شده از یک نمونه بر روی نور اندازه‌گیری شده از نمونه مجاور تأثیر گذاشته و باعث به دست آمدن نتایج نه چندان دقیق می‌شود.

تکنولوژی‌های جدید استفاده از نشانگرها

تکنیک (Luminescent Oxygen Channeling Immuno assay) LOCI

در این روش از دو نوع ذره لاتکس مختلف که هر یک به اندازه ۲۰۰ نانومتر می‌باشند، استفاده می‌شود. یکی از این ذرات به عنوان ذره دهنده (Donor Bead) که حساس‌تر است و در طول موج ۶۸۰ نانومتر انرژی را جذب کرده و تولید اکسیژن منفرد می‌کند. ذره دیگر گیرنده (Receptor Bead) که یک مولکول کمی لومینسانس با طول موج نشری ۵۷۰ نانومتر می‌باشد.

در هنگام تهییج، این دو ذره کنار هم قرار گرفته و اکسیژن منفرد از ذره دهنده به ذره گیرنده منتقل و سبب ایجاد یک سیگنال کمی لومینسانس قابل اندازه‌گیری می‌شود. در این روش مولکولی که قابلیت لیبل کردن داشته باشد در تست‌های تشخیصی می‌توان استفاده کرد.

تکنیک (Superconducting Quantum Interference Device) SQUID

در این تکنیک آنتی‌بادی‌ها را با ذرات مغناطیسی لیبل می‌کنند، با انکوباسیون این آنتی‌بادی‌ها با آنتی‌ژن هدف، کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی لیبل ($Ag-Ab^*$) شکل می‌گیرد که جهت تشخیص این کمپلکس‌ها از دستگاه SQUID استفاده می‌شود. دامنه و یا بزرگی سیگنال‌های حاصله از کمپلکس‌های آنتی‌ژن - آنتی‌بادی لیبل شده متناسب با تعداد ذرات باند موجود در کمپلکس است و متعاقباً مقدار این ذرات متناسب با مقدار آنتی‌ژن هدف مورد جستجو است.

تکنیک Q Dots (Quantum Dots)

در این روش از نانوکریستال‌های نیمه‌رسانا به عنوان معرف‌های نشاندار فلورسنت در تحقیقات بیولوژیکی استفاده می‌شود. یکی از خصوصیات این روش استفاده از کریستال‌هایی با اندازه‌های مختلف بوده و زمانی که این کریستال‌ها با نور لیزر تهییج شوند سیگنال‌های متفاوتی ایجاد می‌کنند. با توجه به این که هر Q dot با اندازه مشخص سیگنال خاص خود را ایجاد می‌کند می‌توان از آن‌ها جهت تشخیص آنالیت‌ها استفاده کرد.

تکنیک تقویت سیگنال (Signal Amplification Technology)

از سیستم تقویت سیگنال با استفاده از TSA (Tyramid Signal Amplification) می‌توان در انواع مختلفی از روش‌های تشخیصی براساس رنگ‌سنجی و یا فلورسانس استفاده کرد. با استفاده از TSA یک پروتکل هیبریداسیون در جای mRNA مناسب ایجاد شده که در تشخیص کلون‌های لنفوسیت B کاربرد دارد (mRNA in situ hybridization). در این روش مولکول‌های mRNA زنجیره سبک ایمونوگلوبولین را در مقاطع تهیه شده از بافت‌ها، با استفاده از پروب‌های الیگونوکلوئوتیدی که با ماده فلورسئین نشاندار شده‌اند تشخیص داده می‌شود. در این روش تقویت با TSA برای تشخیص لنفوسیت B در مقاطع بافتی نیازی به مراحل اضافی جهت تهیه مقطع بافتی نمی‌باشد. با استفاده از تکنولوژی in situ hybridization مشابه، می‌توان سایتوکاین‌هایی از قبیل اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ را شناسایی کرد.

تکنولوژی نشانگر مغناطیسی (Magnetic Labeling Technology)

از این روش در تعیین توالی DNA به روش اتومات، پروب DNA و ژل الکتروفورز به کار می‌رود. این تکنولوژی بسیار دقیق است و نشانگرهای مغناطیسی مورد استفاده در این روش در مقایسه با نشانگرهای نانو رادیواکتیو، بی‌خطر، ارزان و سیگنال‌های پایدارتری دارند.

در روش ژل الکتروفورز با استفاده از نشانگر مغناطیسی می‌توان DNA را آنالیز کرد، در این تکنیک ابتدا با استفاده از الکتروفورز در ژل، DNA به چند باند جداگانه تبدیل شده و در مرحله بعدی نشانگرهای مغناطیسی در هر یک از باندها به DNA متصل می‌شوند. با برقراری یک میدان مغناطیسی موقت، دامن‌های

مغناطیسی در نشانگرهای باند به یک جهت متمایل می‌شوند و یک میدان مغناطیسی خالص به وجود می‌آورند که در نهایت یک سنسور نزدیک به سطح باندها آن‌ها را بررسی می‌کند.

فلورواایمونواسی زمان معین (Time- Resolved Fluoroimmuno assay)

این روش به معنای اندازه‌گیری فلورسانس بعد از یک دوره زمانی مشخص که به منظور حذف فلورسانس مداخله‌گر زمینه صورت می‌گیرد. این شکل از ایمونواسی، یک ایمونواسی هتروژنوس به حالت مستقیم است. در این تکنیک از آنتی‌بادی‌های نشاندار با Europium استفاده می‌شود. این ماده در طول موج ۳۴۰ نانومتر تهییج شده و در طول موج ۶۲۰ نانومتر نشر فلورسانس دارد که این فلورسانس اندازه‌گیری شده و مستقیماً با غلظت آنالیت مورد نظر متناسب است.

تکنولوژی DNA Chip- DNA Micro array

امروزه با پیشرفت در میکروچیپ‌ها امکان بررسی تغییرات ژنتیکی با توان عملیاتی بسیار بالا و کیفیت بالا وجود دارد. بیوچیپ‌ها به نام میکروآری نیز نامیده می‌شوند. در این روش با وجود تجهیزات کوچک جهت بررسی DNA و RNA و سایر مواد، امکان انجام هزاران واکنش همزمان در این چیپ‌ها وجود دارد. بیوچیپ‌ها یک لام شیشه‌ای یا سیلیکونی بوده که پروبهای DNA یا RNA که معمولاً از نوکلئوتیدهای مخصوص ژن‌های مختلف در سطح آن تثبیت شده‌اند تعداد این پروب‌ها در سطح بیوچیپ‌ها متغیر است که ۱۰ الی ۲۰ صدها در بیوچیپ‌های پیشرفته هزارات پروب در سطح آن تعبیه می‌شود. اسید نوکلئیک موجود در نمونه قبل از انجام تست تکثیر می‌شوند و سپس نمونه با مولکول‌های فلوروکروم لیبل می‌شوند. DNAهای هدف نشاندار در سطح چیپ به پروب‌ها عرضه شده و به دنبال آن در سطح چیپ عمل هیبرید شدن با اتصال DNAهای مکمل به پروب خود صورت می‌گیرد. سپس با شستشو زنجیره‌های غیرمتصل حذف می‌شوند و نمونه‌های هیبرید شده فلورسانس با آشکارساز مشخص می‌شوند. شدت سیگنال فلورسانس در یک محل معین متناسب با توالی همولوگ در یک لوکوس ویژه است. با آنالیز الگوی رنگ‌ها می‌توان به وجود جهش در اسید نوکلئیک مربوطه پی برد و مقدار زیادی DNA، RNA یا cDNA را به طور همزمان از نظر وجود تعداد بسیاری زیادی جهش مورد بررسی قرار داد.

هیبریداسیون در جای فلورسانس یا FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

روش هیبریداسیون In situ بسیار شبیه ایمونوهیستوشیمی است با این تفاوت که به جای آنتی‌بادی از اسید نوکلئیک به عنوان پروب استفاده می‌شود. در این روش کروموزوم‌ها در سطح لام تثبیت شده و برای این منظور بیشتر از مقاطع بافتی فیکس شده در فرمالین و پارافین استفاده می‌شود. با اضافه کردن پروب نشاندار، این پروب با DNA مکمل خود روی کروموزوم هیبرید می‌گردد. پروب‌ها را می‌توان با مواد رادیواکتیو یا نشانگرهای آنزیمی و یا فلورسنت نشاندار کرد. معمول‌ترین روش آن استفاده از رنگ‌های فلورسنت بوده که توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسانس قابل مشاهده می‌باشد و به آن تکنیک FISH می‌گویند. این روش در سیتوژنتیک مولکولی کاربرد بیشتری داشته و برای تشخیص حضور و عدم حضور یک توالی خاص، بررسی تعداد کروموزوم‌ها و نقشه‌برداری ژنی به کار می‌رود. پروب‌های مورد استفاده توالی‌های کوتاهی شامل ۵۰۰ باز یا کمتر از یک DNA تک رشته‌ای هستند.

این پروب‌ها را می‌توان از طریق کلون‌سازی ژنومی یا مولکول cDNA، تکثیر به واسطه PCR یا مولکول‌های مصنوعی تهیه نمود.

انواع این پروب‌ها شامل پروب‌های اختصاصی لکوس یا ژن که رایج‌ترین پروب‌های کاربردی هستند، پروب‌های DNA تکراری برای کشف عناصر تکراری در کلاس اختصاصی شامل سانترومرها، تلومرها یا نواحی هتروکروماتینی به کار می‌روند. در نهایت پروب‌های کروموزوم کامل که مخلوطی از توالی‌های تک نسخه‌ای DNA هستند و تمام کروموزوم‌های هدف را نمایان می‌کنند.

انواع مختلفی از تکنیک FISH وجود دارد، از جمله:

Metaphase- FISH که در این روش یک پروب خاص به قطعه همولوگ در کروموزوم متافازی در سطح لام تثبیت شده متصل می‌گردد.

در روش Interphase- FISH وجود توالی خاص در سلول تقسیم نشده قابل شناسایی است در این تکنیک از سلول‌های مرحله اینترفاز برای تهیه گسترش کروموزومی استفاده می‌شود. از این روش بیشتر برای تشخیص سرطان‌ها استفاده می‌شود.

در روش Fiber-FISH به جای کروموزوم از DNA خالص شده استفاده می‌شود.

در روش Reverse-FISH از کروموزوم‌های ناهنجار، پروب تهیه شده و برای هیبریداسیون کروموزوم‌ها از آن استفاده می‌شود. کاربرد آن جهت تشخیص شکست‌های کروموزومی، مارکرهای کروموزومی و تعیین Insertion و Deletion در جهش‌ها می‌باشد.

به طور کلی از روش FISH در تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی اکتسابی و مادرزادی از جمله هماتوپاتولوژی و انکولوژی مانند لوسمی‌ها استفاده می‌شود.

اخیراً از یک روش ساده و حساس دیگری برای تشخیص توالی‌های اختصاصی DNA و سنجش IgG از نانوذرات طلا استفاده می‌شود. این نانوذرات بسیار فعال و به عنوان نشانگر در روش کمی لومینسانس تقویت شده در جا In situ Amplified Chemiluminescent کاربرد دارد.

بروز خطا در روش‌های هیبریداسیون

سنجش‌های هیبریدیزاسیون فاز مایع به خصوص روش‌هایی که از لیبل‌های کمی لومینسانس استفاده می‌کنند نسبتاً راحت‌تر انجام شده و تست‌ها در عرض چند ساعت انجام می‌گیرد. ولی تفسیر واکنش‌های مثبت ضعیف به علت احتمال واکنش متقاطع مولکول‌های هدف با مشکل مواجه است.

تکنیک فلوسایتومتری (Flow Cytometry)

فلوسایتومتری روشی است که در آن به آنالیز سلول‌ها و مطالعه ذرات شناور در یک بستر مایع می‌پردازد. در این روش خواص فیزیکی سلول‌ها به توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و مارکرهای سلولی و رسپتورها آنالیز و بررسی می‌شوند. از این روش برای جدا کردن سلول‌ها از همدیگر و تخلیص آن‌ها استفاده می‌شود. اولین دستگاه فلوسایتومتری در سال ۱۹۶۰ جهت اهداف تحقیقاتی ساخته شد و در سال ۱۹۸۰ از این روش جهت بررسی سلول‌ها به خصوص سلول‌های T_h استفاده گردید. از آن به بعد فلوسایتومتری به طور روتین جهت بررسی عفونت HIV و ایمونوفنوتایپینگ سلول‌ها از طریق بیان آنتی‌ژن‌های سطحی در آزمایشگاه به کار می‌رود.

فلوسایتومتری یک سیستم اتومات که در آن سلولها یک به یک در سوسپانسیون مایع آنالیز و با به کارگیری پروبها (آنتی‌بادی متصل به مواد فلورسنت) مارکرهای سطحی آنها بررسی و اطلاعات مربوط به هر یک سلول در یک فایل جداگانه در کامپیوتر ذخیره می‌گردد. در این دستگاه از نور لیزر استفاده شده و به دنبال عبور یک سلول از مقابل نور لیزر و برخورد نور به سلول مربوطه، پراکنش یا تفرق نوری (Light Scatter) در چند جهت صورت می‌گیرد که نوع و مقدار این پراکنش نوری می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد خواص فیزیکی سلولها در اختیار ما قرار دهد. این نور پراکنش یافته در دو زاویه مشخص سنجیده می‌شود:

۱- پراکنش نور مستقیم Forward- angel Light Scatter

۲- پراکنش نور جانبی Side- angel Scatter

اجزاء دستگاه فلوسایتومتری

سیلان‌شناسی (Fluidics)

برای بررسی پارامترهای سلولی در روش فلوسایتومتری لازم است که سلولها در یک زمان در فایل‌های واحد از مقابل منبع نور لیزری عبور کنند به همین دلیل سلولها در یک مایع ایزوتونیک به صورت سوسپانسیون تهیه شده و فلوسایتومتری با مکش سوسپانسیون سلولی و تزریق آن به داخل یک جریان از سالیان ایزوتونیک آن را به شکل یک جریان باریک تک لایه درمی‌آورد که این عمل در فلوسایتومتری توسط یک فلوسل یا فلوجمبر انجام می‌شود. فلوسل لوله باریکی دارد که در حدود ۵۰ تا ۳۰۰ میکرومتر قطر دارد و به گونه‌ای طراحی شده است که در داخل لوله نمونه از وسط محلول ایزوتون از اطراف آن حرکت می‌کند.

منبع نور

به طور معمول در دستگاه فلوسایتومتری از دو نوع منبع نوری استفاده می‌شود یکی لامپ‌های arc و دیگری نور لیزر می‌باشد. طول عمر لامپ‌های arc کوتاه و حدود ۱۰۰ ساعت است و در صورت استفاده از این منبع نوری باید از فیلترهای خاصی جهت انتخاب طول موج استفاده می‌شود. اما در صورت استفاده از نور لیزر

مونوکروماتیک نیازی به تعویض فیلتر نیست. نوع لیزر می‌تواند اتمی مانند هلیوم-نئون، یونی مانند آرگون یا کریپتون، مولکولی مانند هلیوم-کادمیوم و یا مایع که لیزر رنگی می‌باشد. معمولاً از دو لیزر و چهار آشکارساز برای نور فلورسانس استفاده می‌شود ولی دستگاه‌های پیشرفته جدید ۴ منبع نور لیزر و ۱۶ آشکارساز فلورسانس دارند و به طور همزمان اطلاعات زیادی در مورد هر سلول را در اختیار قرار می‌دهند.

ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) رنگ سبز ساطع کرده و رایج‌ترین فلوروکروم مورد استفاده است. زمانی که نیاز به نشانگر فلورسنت دیگری باشد معمولاً از فیکواریترین (PE) استفاده می‌شود که نور نارنجی ساطع می‌کند. در صورت نیاز به نشانگرهای دیگر از موادی مانند کونژگه فیکواریترین-سیانین ۵، پریدین کلوتوفیل نوع A و کونژگه قرمز تگزاس استفاده می‌شود.

نورشناسی Optics

سیگنال‌های مختلف تولید شده توسط واکنش‌های سلول‌ها با لیزر به وسیله لوله‌های فتومولتی پلیمر (PMT) و آشکارسازها تشخیص داده می‌شوند. تعداد فلوروکروم‌هایی که به طور همزمان قابل تشخیص هستند وابسته به آشکارسازهای نوری در فلوسایتومتری است.

هر آشکارساز نوری برای طوح موج مربوطه اختصاصی است. در این بین یک سری از فیلترهای نوری طراحی شده‌اند تا حداکثر دریافت نور تولید شده از یک فلوروکروم خاص را دریافت کنند. در دستگاه‌های فلوسایتومتری جدیدتر جهت هدایت نور به آشکارسازها از کابل‌های فیبر نوری استفاده می‌شود.

اکثر دستگاه‌های فلوسایتومتری مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها قادرند ۳ تا ۶ رنگ را با استفاده از یک یا دو لیزر تشخیص دهند. هنگامی که نور فلورسنت به لوله‌های فتومولتی پلیمر (PMT) برسد، یک جریان الکتریکی ایجاد شده و در نهایت این پالس الکتریکی به یک سیگنال دیجیتال تبدیل می‌شود. این سیگنال دیجیتال متناسب با شدت نور تشخیص داده شده است.

بخش الکترونیکی دستگاه جهت دریافت اطلاعات و آنالیز اطلاعات

زمانی که اطلاعات مربوطه به نور لیزر پراکنش یافته و فلورور کرومها جمع‌آوری شدند و به فرم دیجیتال درآمدند، اطلاعات می‌تواند مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. هر پارامتر به طور جداگانه یا ترکیبی می‌تواند آنالیز شود و گرافیک اطلاعات به چند روش قابل نشان دادن است.

یکی از روش‌های نمایش اطلاعات به صورت Sigle-parameter histogram است که پارامتر انتخاب شده که معمولاً فلورسانس است در محور x و تعداد آن‌ها در محور y رسم می‌شود که به این ترتیب می‌توان تعداد سلول‌هایی را که حاوی خصوصیات موردنظر می‌باشند را مشخص نمود.

روش دیگر نمایش اطلاعات با استفاده از دو متغیر است و به آن نمودار نقشه- نقطه‌ای دو پارامتری Dual-parameter-Dot-Plot گویند که این دو پارامتر هر کدام در یک محور در مقابل هم رسم می‌شوند و هر نقطه نمایشگر سلول یا مشخص خاص می‌باشد.

با استفاده از نمودار نقشه نقطه‌ای یا Dot-Plot می‌توان بر روی نمودار ناحیه‌ای که جمعیت سلولی موردنظر در آن قرار دارد را مشخص کرده و یک Gate اطراف این جمعیت سلولی رسم نمود که اصطلاحاً به این حالت Gating گویند که به طور اختصاصی پارامترهای مربوط به سلول‌های داخل Gate را مورد بررسی قرار می‌دهد. درصد سلول‌ها در هر مربع بر مبنای شمار کلی پالس‌های شمارش شده محاسبه می‌شود.

نمونه مورد استفاده

نمونه مورد استفاده معمولاً خون کامل، نمونه مغز استخوان و اسپیراسیون مایعات بدن مانند CSF، مایع پلور و مایع مفصلی است.

بهترین ماده ضد انعقاد جهت خون محیطی EDTA به مقدار ۲mg/mL بوده اما می‌توان از سیترات سدیم ۰/۳۸ درصد یا هپارین به مقدار ۱۵IU/mL نیز برای نمونه خون کامل و نمونه مغز استخوان استفاده کرد. نمونه خون باید قبل از انجام آزمایش در دمای اتاق 20°C - 25°C قرار داده شده و قبل از رنگ‌آمیزی به طور کامل مخلوط شود. استفاده از نمونه‌های حاوی لخته و همولیز نباید به هیچ عنوان استفاده گردد. جهت

بررسی دقیق گلبول‌های سفید در خون محیطی یا مغز استخوان و سایر نمونه‌ها که حاوی تعداد زیادی گلبول قرمز هستند لازم است تا گلبول‌های قرمز را حذف یا لکوسیت‌ها را غنی‌سازی کرد. معمولاً از سانتریفیوژ با Ficoll- hypaque جهت به دست آوردن یک سوسپانسیون سلولی غنی از لنفوسیت یا بلاست استفاده می‌شود، هر چند که این روش باعث کاهش بعضی از جمعیت‌های سلولی می‌شود. از روش‌های لیز گلبول‌های قرمز جهت تخلیص لنفوسیت‌ها با به کارگیری محلولهای تجزیه‌ای لیز یا کلرید آمونیوم ۰/۸۴ درصد استفاده می‌شود.

علاوه بر بررسی مارکرهای سطحی در روش فلوسایتومتری می‌توان برای بررسی مولکولهای هسته‌ای و سیتوپلاسمی درگیر در مسیرهای تنظیمی سلول‌ها از قبیل تکثیر، تمایز آپوپتوزیس، انتقال سیگنال و تولید سایتوکاین‌ها نیز استفاده کرد.

برای رنگ‌آمیزی مولکول‌های سیتوپلاسمی ابتدا باید سلول را فیکس و سپس نفوذپذیری سلول‌ها را به طور گذرا با استفاده از محلول‌های الکلی یا دترجنت‌ها افزایش داد تا آنتی‌بادی‌های نشاندار بتوانند از طریق غشای پلاسمایی وارد سلول شوند. در این حالت ساختار آنتی‌ژن‌ها حفظ شده و از تراوش محتویات سلولی به بیرون جلوگیری می‌گردد.

علاوه بر آنتی‌بادی‌ها، نشانگرهای فلورسانس مرتبط با غلظت‌های یونی سیتوپلاسمی و پتانسیل اکسیداسیون، احیاء را نیز می‌توان به روش فلوسایتومتری تشخیص داد.

خلاصه‌ای از روش کار با فلوسایتومتری

- ۱- شستشوی سلول‌های مورد نظر با محلول PBS
- ۲- تهیه سوسپانسیونی از سلول‌ها به غلظت 10^6 cell/MI
- ۳- فیکساسیون سلول‌ها با متانول مطلق در 20°C به مدت ۱۵ دقیقه
- ۴- خارج کردن متانول با عمل سانتریفیوژ کردن سلول‌ها در 1000g به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق
- ۵- جهت نفوذپذیر شدن سلول‌ها از NP-۴۰، ۰/۵ درصد در PBS اضافه و مدت ۵ دقیقه زمان می‌دهیم.
- ۶- سلول‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۲ درصد مجاور نموده و سپس به مدت ۵ دقیقه در 1000g سانتریفیوژ کرده و محلول پارافرمالدئید را خارج می‌کنیم.

۷- سلول‌ها را با ساپونین ۰/۱ درصد در PBS به مدت ۵ دقیقه مجاور نموده تا نفوذپذیر شوند.

۸- تهیه سوسپانسیون در داخل لوله‌های پلی پروپیلن سلول‌ها را با مقدار ۱۵mL بافر سیترات سدیم m ۰/۰۱

۹- لوله‌ها را در یک ظرف پیرکس یک لیتری قرار داده و در اوون میکروویو قرار می‌دهیم.

۱۰- سوسپانسیون سلولی در شرایط ماکزیمم ۸۰۰ W به مدت ۶۰ تا ۳۰ ثانیه گرم می‌کنیم.

۱۱- سوسپانسیون سلولی را در یخ به مدت ۱۰ دقیقه خنک و با PBS شستشو می‌دهیم.

۱۲- سلول‌ها را با فیلتر ۵۰nm فیلتر کرده تا سلول‌های به هم چسبیده و آسیب‌دیده حذف شوند.

در نهایت بدین ترتیب سلول‌ها آماده نشاندار شدن با آنتی‌بادی فلورسنت می‌باشند.

کاربرد بالینی فلوسایتومتری

از این روش برای تعیین فنوتیپ لنفوسیت‌های خون، شمارش اتم سل‌های CD_{34}^{+} در خون محیطی و مغز استخوان جهت پیوند مغز استخوان و تعیین ایمونوفنوتیپ لوسمی‌های حاد، لنفوم غیر هوچکین و سایر اختلالات لنفوپرولیفراتیو استفاده می‌شود.

امروزه ایمونوفنوتایپینگ با فلوسایتومتری در بررسی اولیه و مونیتورینگ بعد از درمان بیماران لوسمی و لنفوم به کار می‌رود. همچنین در طبقه‌بندی لوسمی‌ها و لنفوم‌ها و بدخیمی‌های هماتوپوئیتیک و درجه تمایز آن‌ها کاربرد دارد.

در بررسی و شمارش سلول‌های TCD_{4}^{+} خون محیطی بیماران مبتلا به HIV، بررسی وضعیت کروموزوم‌های سلول‌های توموری، شناسایی سلول‌های دارای هموگلوبین F، تایپینگ HLA و کراس مچ برای پیوند نیز استفاده می‌شود.

منابع خطا، مزایا و معایب روش فلوسایتومتری

استفاده از سلول‌ها در حالی که زنده می‌باشند و در صورت نگهداری آن‌ها در وضعیت ثابتی می‌تواند موجب بروز خطا در شمارش و اندازه‌گیری خصوصیات سلول گردد.

اغلب اوقات سلول‌ها قبل از آنالیز به مدت کوتاهی در شرایط آزمایشگاهی نگهداری می‌شوند در این صورت می‌توان از بافر فسفات نمکی برای تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده کرد، تهیه نادرست رقت این محلول موجب بروز عوارضی بر روی سلول‌ها می‌گردد. در صورت نگهداری سلول‌ها به مدت طولانی‌تر باید از بافرهایی که از نظر یونی ایزوتونیک بوده و حاوی پروتئین‌ها و نمک کاملاً نزدیک حالت فیزیولوژیک باشند، استفاده گردد. سلول‌هایی مانند ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها تمایل به چسبیدن به یکدیگر یا به سطوح پلاستیکی دارند با استفاده از محیطی که فاقد یون‌های دو ظرفیتی مانند Ca^{++} و Mg^{++} و حاوی ۵ میلی‌مول EDTA باید نگهداری شوند. ولی حتی با به کارگیری این روش نیز در طولانی‌مدت سبب تخریب سلول‌ها می‌گردد، برای رفع این حالت باید سلول‌ها در کوتاه‌ترین زمان پس از نمونه‌گیری مورد آزمایش قرار گیرند.

به دلیل جلوگیری از رشد میکروبی در نمونه باید آن را در $4^{\circ}C$ نگهداری نمود.

رعایت شرایط استریل در تهیه سوسپانسیون و محلول رنگ‌کننده باید انجام گیرد.

برای جلوگیری از تشکیل توده‌های پروتئینی به خصوص در بررسی پلاکت‌ها بهتر است از فیلترهای با سایر ۲۵ صدم میکرون عبور داده شده تا ذرات پروتئینی گرفته شود.

بیماری‌های خودایمن (Autoimmune disease)

بیماری‌های خودایمن، از جمله بیماری‌هایی هستند که در آن سیستم ایمنی بدن، اجزاء سلول‌ها و بافت‌های خود را به دلیل به هم ریخته شدن سیستم ایمنی به عنوان یک عامل بیگانه فرض نموده و علیه آن شروع به فعالیت می‌نماید و با ترشح برخی از پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌ها آن عضو را از بین می‌برد. با فعالیت اتوآنتی‌بادی‌ها و برخی سلول‌ها به ارگان‌ها و بافت‌ها آسیب می‌رساند.

میزان شیوع این بیماری حدود ۷-۵ درصد از جمعیت می‌باشد. ایجاد بیماری می‌تواند به علت فقدان یا شکست تحمل (تولرانس) به خود و اجزای خود بدن باشد. علاوه بر مشکلات و اختلالات سیستم ایمنی، هورمون‌ها، استرس و عوامل محیطی نیز در این امر نقش دارند. از میان هورمون‌ها، هورمون استروژن نقش بسیار مهمی در این بین داشته و به این علت خانم‌ها بیشتر مستعد ابتلا به بیماری‌های خودایمنی می‌باشند.

بیماری‌های خودایمن به دو دسته تقسیم شده: سیستمیک و اختصاصی. البته اغلب بین این دو همپوشانی وجود داشته و با شروع یک بیماری خودایمنی به تدریج سایر ارگان‌ها نیز درگیر می‌شوند.

عفونت‌های ویروسی و باکتریایی، تغییرات آناتومیک در نسوج از قبیل التهاب، آسیب ایسکمیک و تروما سبب تحریک سیستم ایمنی و تولید برخی آنتی‌بادی‌ها شده که می‌تواند زمینه‌ساز بروز بیماری‌های خودایمنی گردد.

حدود ۸۰ نوع بیماری خودایمنی شناسایی شده است که طیف وسیعی از بافت‌ها و سلول‌های بدن را درگیر می‌کند. این بیماری‌ها اغلب مزمن بوده و مادام‌العمر با فرد باقی می‌ماند و قابلیت درمان صد درصد ندارند.

در اوایل دهه ۱۹۰۰ برای اولین بار تئوری واکنش‌های ایمنی زیان‌بار با عامل توکسیک علیه نسوج خودی بیان گردید. در واقع خودایمنی نتیجه نارسایی یا شکست مکانیسم‌هایی است که به طور طبیعی مسئول حفظ تحمل به خود می‌باشند. قابلیت بروز خودایمنی در همه افراد وجود دارد چون همه ما وارث ژن‌هایی هستیم که می‌تواند گیرنده‌های لنفوسیتی برای آنتی‌ژن‌های خودی را کد کند و همچنین بسیاری از آنتی‌ژن‌های خودی نیز به راحتی در دسترس سیستم ایمنی قرار می‌گیرند. در بیماری‌های خودایمنی مکانیسم‌های اجرایی مختلفی مسئول ایجاد آسیب بافتی می‌باشند. این مکانیسم‌ها شامل اتوآنتی‌بادی‌های در حال گردش، کمپلکس‌های ایمنی و لنفوسیت‌های T خودواکنش‌گر می‌باشد.

نقش عوامل ژنتیکی در خودایمنی هنگامی مورد توجه قرار گرفت که در دوقلوهای تک تخمی مبتلا به یک بیماری خودایمنی احتمال وقوع همان بیماری مانند دیابت ملیتوس وابسته به انسولین حدود ۳۵ تا ۵۰ درصد مشاهده شد.

نقش ژن‌های MHC در خودایمنی و آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی (HLA) در بسیاری از بیماران مبتلا به انواع بیماری‌های خودایمنی در مقایسه با افراد عادی فراوانی بیشتری را نشان می‌دهد. برخی از بیماری‌های خودایمنی با پاسخ‌های ایمنی کاملاً طبیعی به آنتی‌ژن‌های بیگانه مانند میکروب‌ها آغاز می‌شود. تب روماتیسمی نمونه بارزی از این مورد می‌باشد. تب روماتیسمی در اثر ابتلا به نوعی استرپتوکوک ایجاد می‌گردد. در این بیماری آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد میکروب استرپتوکوک با پروتئین‌های انسانی

واکنش متقاطع داشته و منجر به بروز میکوکارد می‌گردد. چنین بیماری‌هایی واقعاً خودایمن نبوده، بلکه پیامد پاسخ‌های ایمنی ضد آنتی‌ژن‌های بیگانه بوده که منجر به بروز بیماری می‌شود.

لوپوس اریتماتوس سیستمیک

بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک (SLE) یک نمونه از مهم‌ترین بیماری‌های خودایمنی انسانی است. این بیماری یک بیماری التهابی سیستمیک مزمن بوده که با تغییر وضعیت به حالت وخیم مشخص می‌شود. وقوع این بیماری در چهار دهه اخیر سه برابر شده و اوج سن بیماری حدود ۲۰-۴۰ سال است. شیوع بیماری در خانم‌ها نسبت به آقایان ۱۰ برابر بیشتر بوده که تشخیص سریع و به‌موقع و شروع درمان موجب بهبودی بیماری گشته و میزان بقا ۵ ساله را به بیش از ۹۰ درصد افزایش می‌دهد.

پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های زیادی هدف قرار می‌گیرد و در یک بیمار تیپیک به طور متوسط سه نوع آنتی‌بادی در گردش خون دیده می‌شود.

بین حساسیت ژنتیکی و فاکتورهای محیطی ارتباط متقابل وجود دارد. در سفیدپوستان بروز بیماری با HLA-DR و HLA-DQ و همچنین نقص‌های ارثی اجزای کمپلمان مانند C_{1q}، C₂ و C₄ همراهی قوی در فرد دیده می‌شود.

از عوامل محیطی مانند تماس فرد با نور UV و داروهای خاص و برخی عوامل عفونی می‌توان نام برد. اولین یافته در بیماری لوپوس کشف سلول LE توسط Malcolm Hargraves در سال ۱۹۴۸ بود. سلول LE نوتروفیلی است که هسته پوشیده شده با آنتی بادی نوتروفیل دیگر را بلعیده است. این پدیده در آزمایشگاه صورت می‌گیرد و زمانی رخ می‌دهد که سلول‌های آسیب‌دیده، مواد هسته‌ای را آزاد می‌کنند. حدود ۱۰ سال بعد از کشف سلول LE، اولین آنتی‌بادی ضد DNA شناسایی شد. اکنون مشخص شده که در SLE بیش از ۲۵ اتوآنتی‌بادی وجود دارد.

تشخیص آزمایشگاهی لوپوس اریتماتوز سیستمیک

در این بیماری جهت غربال آنتی‌بادی‌های ضد هسته (ANA) استفاده می‌شود. تست آنتی‌بادی ضد هسته‌ای فلورسنت (FANA) بیشترین و مورد قبول‌ترین تست بوده زیرا طیف وسیعی از آنتی‌بادی‌ها را شناسایی

می‌کند و در ۹۵ درصد از بیماران لوپوسی این تست مثبت می‌باشد. این تست فوق‌العاده حساس و انجام آن نیاز به تجربه کافی دارد. برای انجام این تست از لام‌های تهیه شده با سلول‌های کلیه موش یا HEP-۲ که اپیتلیال انسانی روی یک اسلاید فیکس شده و با افزودن سرم بیمار به آن واکنش می‌دهد، استفاده می‌شود. پس از شستشوی لام به منظور دور کردن آنتی‌بادی‌های واکنش نداده یک آنتی‌هیومن ایمونوگلوبولین با لیبل فلورسنت یا لیبل آنزیمی مانند پراکسیداز اضافه می‌شود. این تست در ۲ درصد افراد سالم و حدود ۷۵ درصد افراد مسن می‌تواند مثبت شود و در حدود ۵ درصد از بیماران لوپوسی احتمال دارد تست منفی گردد. البته از این تست به طور مطلق برای شناسایی لوپوس اریتماتوز نمی‌توان استفاده کرد. جهت تشخیص بهتر از تست پروفایل برای آنتی‌بادی‌های اختصاصی به عنوان تست پیگری انجام داد.

آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای

آنتی‌بادی‌های ضد DNA دو رشته‌ای (ds-DNA) برای بیماری لوپوس اریتماتوز یک تست اختصاصی می‌باشد زیرا فقط در بیماران لوپوسی دیده می‌شود و سطح آن با فعالیت بیماری در ارتباط است. هر چند این آنتی‌بادی‌ها در ۴۰-۷۰ درصد بیماران وجود دارد ولی از آن برای تشخیص SLE استفاده می‌شود. به خصوص در زمانی که مقدار کمی از C_۳ کمپلمان یافت شود. در این تست از آنتی‌بادی‌های علیه ds-DNA از Crithidia Luciliae که یک هموفلاژا است به عنوان سوبسترا در تهیه لام به روش ایمونوفلورسانس استفاده می‌شود. این تریپانوزوم در کینتوپلاست خود دارای ds-DNA حلقوی بوده و برای تهیه لام بسیار مناسب است.

از روش‌های ایمونودیفیوژن، رادیوایمونواسی (RIA) و آنزیم ایمونواسی (EIA) برای شناسایی ds-DNA نیز استفاده می‌شود.

آنتی‌بادی اصلی دیگری که در بیماران لوپوسی وجود دارد، آنتی‌بادی ضد هیستون است. هیستون نوکلئوپروتئین است که جز اصلی کروماتین می‌باشد. این آنتی‌بادی در حدود ۷۰ درصد بیماران لوپوسی مشاهده می‌شود. آنتی‌بادی ضد هیستون در آرتریت روماتوئید و سیروز و صفراوی اولیه نیز دیده می‌شود.

سطح بالای این آنتی‌بادی با نوع فعال و شدید SEL همراه است. آنتی‌بادی ضد هیستون با تست‌های ایمونوفلورسانس، ایمونوبلاتینگ و EIA قابل شناسایی می‌باشد. در روش ایمونوفلورسانس یک طرح هموزن دیده می‌شود که نشان‌دهنده فلورسانس کل هسته می‌باشد.

ریبونوکلئوپروتیین‌های کوچک هسته‌ای یا آنتی‌ژن‌های هسته‌ای عبارتند از آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن‌های Jo-1، Scl-70 (DNA توپوایزومراز I)، SS-B/La، SS-A/Ro، mRNP، S_m از این اجزا هسته تستی بسیار اختصاصی می‌باشد.

روش EIA (آنزیم ایمونواسی) برای شناسایی anti-ds-DNA، آنتی‌بادی‌های ضد هیستونی و anti-SS-A و anti-SS-B کاربرد وسیع‌تری در تشخیص بیماری پیدا کرده‌اند.

آنتی‌بادی‌های آنتی فسفولیپیدی

آنتی‌بادی‌های آنتی فسفولیپیدی، گروه هتروژنی از آنتی‌بادی‌ها بوده که به تنهایی به فسفولیپید متصل شده یا با پروتیین کمپلکس می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند هر ارگان از بدن را تحت تأثیر قرار دهند. اما بیشترین مورد آن در ترومبوز سیاهرگ‌های عمقی و سرخرگی و در حاملگی موجب تولد پیش از موعد، پره اکلامپسی دیده می‌شود.

این آنتی‌بادی‌ها در حدود ۶۰ درصد از بیماران لوپوسی وجود دارد اما در چندین بیماری دیگر نیز دیده می‌شود. با ایجاد نتایج مثبت کاذب و سیفیلیس نیز مشاهده می‌شود. ضد انعقاد لوپوسی یکی از چند نوع آنتی‌بادی آنتی فسفولیپیدی است و دلیل نامگذاری آن سبب طولانی شدن زمان ترومبوپلاستین (aPT) و زمان پروترومبین (PTT) می‌باشد. در این بیماران وجود آنتی‌بادی افزایش خطر لخته شدن و سقط جنین خودبه‌خودی بیشتر دیده می‌شود و ممکن است عمل پلاکت‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهد.

آرتریت روماتوئید

آرتریت روماتوئید (RA) مثال دیگری از بیماری خودایمنی سیستمیک می‌باشد. خانم‌ها سه برابر بیشتر از آقایان به این بیماری مبتلا می‌شوند. سن شیوع معمولاً بین ۳۵ تا ۵۰ سال بوده اما بیماری در هر سنی دیده می‌شود. آرتریت روماتوئید به صورت مزمن، متقارن و آرتریت فرسایشگر مفاصل محیطی که چند ارگان مانند

قلب، ریه و کلیه را می‌تواند درگیر کند. با شدت یافتن بیماری توانایی فرد کاهش یافته و در مراحل شدیدتر بیمار از انجام کارهای بسیار ساده نیز عاجز می‌ماند. پیشرفت بیماری متفاوت بوده و در برخی افراد حتی بهبودی خودبه‌خودی مشاهده شده و در برخی موارد با افزایش شدت بیماری به سرعت سبب تغییر شکل مفصل و ناتوانی عمل مفصل می‌گردد. همانند بیماری لوپوس به نظر می‌رسد که بین آرتریت روماتوئید و فعالیت ژن‌های MHC II همراهی وجود دارد.

بیشترین همراهی در این بیماری با آل‌های DR۴ است.

در ایجاد آرتریت روماتوئید لنفوسیت‌های T نوع CD_4^+ و CD_8^+ ، لنفوسیت‌های B و پلازما سل‌های تولیدکننده آنتی‌بادی، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها نقش دارند. در ایجاد بیماری آرتریت روماتوئید آنتی‌بادی ایجاد شده از کلاس IgM بوده که علیه بخش IgG-Fc تولید می‌شود. البته این آنتی‌بادی برای روماتوئید فاکتور اختصاصی نبوده و در ۵ درصد افراد سالم و حدود ۲۰-۱۰ درصد افراد زیر ۶۵ سال دیده می‌شود. در بیماری آرتریت روماتوئید آنتی‌بادی‌های IgM با IgG ترکیب شده و این کمپلکس ایمنی در مفصل‌ها رسوب می‌کند و سبب از یاد حساسیت نوع III می‌گردد. به دنبال آن پروتئین C۱ کمپلمان به کمپلکس ایمنی ایجاد شده، متصل و راه کلاسیک کمپلمان فعال می‌شود. در این پروسه C_3a و C_5a ایجاد شده برای نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها کموتاکتیک بوده و سبب فعال شدن آن‌ها می‌گردد.

از دیگر آنتی‌بادی‌های یافت شده می‌توان به آنتی‌بادی آنتی کراتین، آنتی‌بادی ضد اطراف هسته‌ای، آنتی فیلاگرین و آنتی بادی anti-Sa اشاره کرد که همه این آنتی‌بادی‌ها علیه پروتئین‌های سیترولینه ساخته می‌شوند که با تغییر آرژینین متصل به پروتئین توسط آنزیم پپتیدیل آرژینین دامیناز ایجاد می‌شوند. این آنزیم توسط گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و بسیاری از سلول‌های دیگر ایجاد می‌شود. مرگ گرانولوسیت‌ها و ماکروفاژها موجب تولید پروتئین‌های سیترولینه شده و بیان بیش از حد این آنتی‌ژن‌ها سبب ایجاد پاسخ ایمنی می‌گردد.

این خانواده از آنتی‌بادی‌ها با استفاده از پپتیدهای سیترولینه حلقوی (CCP) شناسایی می‌شوند. از این رو به این آنتی‌بادی‌ها، anti-CCP گویند. در حال حاضر از تست anti-CCP برای تشخیص آرتریت روماتوئید که

یک مارکر مهمی است استفاده می‌شود، چون از تست RF اختصاصی تر است. تیتراژ پایین آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای در ۴۰ درصد بیماران وجود دارد. طرحی که بیشتر از همه شناسایی شده، طرح نقطه‌ای هدف گرفته شده علیه ریبونوکلوپروتیین است. البته عملکرد و اهمیت این آنتی‌بادی‌ها کاملاً شناخته نشده و به نظر می‌رسد به توسط دخالت سایر عوامل منجر به بروز بیماری می‌گردند.

تشخیص آزمایشگاه آرتریت روماتوئید

تشخیص بیماری آرتریت روماتوئید براساس ترکیبی از علائم بالینی، یافته‌های رادیوگرافیک و تست‌های آزمایشگاهی است. روماتوئید فاکتور RF آنتی‌بادی است که اغلب برای کمک به تشخیص اولیه انجام می‌گیرد. امروزه از ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی‌ژن استفاده می‌کنند. تست لاتکس حساسیت بیشتری داشته و اساس تست آگلوتیناسیون می‌باشد. تست‌های آگلوتیناسیون فقط، IgM را که در حدود ۷۵ درصد بیماران وجود دارد را شناسایی می‌کند. بنابراین یک نتیجه منفی وجود RA را رد نمی‌کند. برعکس، یک نتیجه مثبت تست نیز برای RA اختصاصی نیست چون RF در بیماری‌های دیگری چون سیفیلیس، لوپوس، هیپاتیت فعال، مزمن، سل، جذام، مونونوکلیوز عفونی، مالاریا و سندرم شوگرن نیز وجود دارد. دو کلاس آنتی‌بادی دیگر RF یعنی IgG و IgA، اختصاصی تر بوده و این دو ایزوتایپ ندرتاً در بیماری‌های دیگر وجود دارند، از این دو ایزوتایپ در تشخیص افتراقی بیماری استفاده می‌کنند. با افزایش IgA در اوایل بیماری فرسایش استخوانی و علائم سیستمیک با بروز این بیماری همراه است. از روش الایزا (EIA) و تست‌های نفلومتری برای تشخیص استفاده می‌شود. روش الایزا و نفلومتری دقت و حساسیت بیشتری دارند و به تدریج جایگزین روش‌های دستی تشخیص RA شده‌اند. تست RF برای آرتریت روماتوئید اختصاصی نیست و بنابراین بخش anti-CCP نسل دوم با حساسیت ۷۴ درصد و دقت ۹۶ درصد جهت تشخیص بیماری معتبرتر می‌باشد.

حدود ۳۵-۴۰ درصد از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید با RF منفی دارای تست anti-CCP مثبت می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد که anti-CCP چند سال قبل از شروع آرتریت روماتوئید وجود دارد. به نظر می‌رسد که یک تست anti-CCP دقت IgA-RF بهترین پیش‌آگهی برای پیشگویی آینده بیماری آرتریت

روماتوئید را همراه دارد. این دو تست به همراه هم در تشخیص اولیه بیماری اطلاعات مفیدی را به دست می‌دهد.

بعد از تشخیص بیماری برای پیگیری درمان و دنبال کردن پیشرفت بیماری می‌توان از تست ESR (میزان رسوب گلبول‌های قرمز)، CRP و اجزای کمپلمان استفاده کرد. معمولاً CRP و ESR افزایش داشته و سطح اجزای کمپلمان طبیعی یا افزایش یافته است. افزایش سطح CRP با فعالیت بیماری ارتباط دارد، افزایش سطح CRP نشانگر افزایش فعالیت سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌باشد و پیگیری افزایش سطح CRP در پاسخ‌های التهابی مهم‌تر و حساس‌تر از نسبت تغییر سطح RF است.

بیماری‌های خودایمن تیروئید

بیماری‌های خودایمن تیروئید (AITDs) شامل چند بیماری بالینی مختلف بوده که مهم‌ترین آن‌ها بیماری هاشیموتو و بیماری گریوزی می‌باشند. این بیماری‌ها مثال‌هایی از بیماری‌های خودایمنی اختصاصی ارگان هستند. اگر چه این دو بیماری علائم مختلفی دارند ولی آنتی‌بادی‌های مشترکی داشته و در هر دو مداخله در عمل تیروئید دیده می‌شود. در این بیماری‌ها پاسخ‌های خودایمن به تیروئید روی داده و این پاسخ‌های ایمنی به علت وجود ژن‌های حساس با زمینه ژنتیکی و محرک‌های محیطی ایجاد می‌شود.

تست‌های آزمایشگاهی بیماری‌های خودایمن تیروئید

سه اتوانتی‌بادی اصلی موجود، آنتی‌بادی‌های علیه تیروگلوبولین، تیروئید پراکسیداز و رسپتورهای TSH می‌باشند. آنتی‌بادی‌های ضد تیروگلوبولین را می‌توان در نزدیک ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به تیروئیدیت هاشیموتو مشاهده نمود.

این اتوانتی‌بادی در افراد سالم به میزان و تیترا پایین از آنتی‌بادی آنتی گلوبولین وجود دارد اما تیترا آنتی‌بادی در بیماران مبتلا به هاشیموتو بسیار بالاست.

آنتی‌بادی‌های ضد ستریوگلوبولین را می‌توان با تست‌های ایمونوفلورسنت غیرمستقیم (IFA)، آگلوتیناسیون پاسیو و روش‌های آنزیم ایمونواسی (EIA) قابل بررسی و اندازه‌گیری است.

تست ایمونوفلورسنت غیرمستقیم حساسیت کمتری داشته اما می‌تواند آنتی‌بادی غیرآگلوتینه کننده را شناسایی کند. در تست ایمونوفلورسنت غیرمستقیم از برش‌های بافتی میمون که با متانول فیکس شده‌اند، به عنوان سوپسترا استفاده می‌کنند. آنتی‌بادی‌های تیروگلوبولین یک طرح رنگ‌آمیزی فولکولار ایجاد می‌کنند.

یک نتیجه منفی از تست الزاماً بیماری هاشیموتو را رد نمی‌کند و آنتی‌بادی‌های دیگری که ممکن است وجود داشته باشند عبارتند از آنتی‌بادی کلوئیدی (CA₂) و ایمونوگلوبولین مهاری متصل شونده به TSH می‌باشد.

فعالیت آنتی‌بادی به تخریب سلول‌های تیروئید منجر شده که در این حالت آنتی‌بادی علیه CA₂ با ظاهری منتشره با زمینه شیشه‌ای ایجاد می‌کند.

آنتی‌بادی علیه تیروئید پراکسیداز (TPO) علیه آنزیم غشایی ۱۰۵ کیلودالتونی ایجاد می‌شود که یدینیزاسیون تیروزین را کاتالیز می‌کند. این آنتی‌بادی‌ها در تقریباً ۹۵-۹۰ درصد بیماران مبتلا وجود دارد. به نظر می‌رسد که این آنتی‌بادی‌ها با فعالیت بیماری در ارتباط باشد.

آنتی‌بادی‌ها علیه پراکسیداز معمولاً توسط روش‌های آنزیم ایمونواسی (EIA) اندازه‌گیری می‌شوند، اگر چه روش ایمونوفلورسنت غیرمستقیم (IFA) و تست‌های آگلوتیناسیون ذره‌ای نیز کاربرد دارد.

آنتی‌بادی‌های پراکسیداز موجب رنگ شدن سیتوپلاسم و نه هسته سلول‌های تیروئیدی می‌شوند. این آنتی‌در ۹۰ درصد بیماران مبتلا به هاشیموتو و ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به گریوز مشاهده می‌شود.

اتوانتی‌بادی اصلی دیگر آنتی‌بادی anti-TSHR بوده که معمولاً با بیماری گریوز همراه است. در بیماری گریوز افزایش هورمون‌های تیروئیدی و تری‌یدوتیرونین آزاد (T₃) و تیروکسین (T₄) بررسی می‌شود. همچنین اندازه‌گیری سطح TSH که معمولاً سطح TSH در این بیماری پایین بوده و افزایش جذب رادیواکتیو به تأیید تشخیص بیماری کمک می‌کند.

تست‌های آنتی‌بادی‌های TSHR دو نوع بوده: بیوالسی و بخش‌های اتصالی بیوالسی‌ها به کشت بافتی نیاز داشته و انجام آن‌ها مشکل می‌باشد.

بخش‌های اتصالی براساس رقابت بین TSH رادیولیبیل و اتو آنتی‌بادی‌های بیمار برای اتصال به رسپتورهای تیروتروپین می‌باشد. تقریباً ۸۰ درصد بیماران مبتلا به هیپرتیروئیدیسم گریوز با این روش، تست در آن‌ها مثبت می‌باشد.

نوع متفاوتی از آنتی‌بادی‌های anti-TSHR را می‌توان در تیروئیدیت هاشیموتو یافت، این آنتی‌بادی‌ها احتمالاً علیه اپی‌توپی متفاوت از اپی‌توپ آنتی‌بادی‌های بالا ساخته می‌شوند چون برای بلوک کردن رسپتورها به کار می‌روند به طوری که هورمون TSH نمی‌تواند به آن متصل شود.

دیابت ملیتوس نوع I

دیابت ملیتوس خودایمن که به آن دیابت نوع IA نیز گویند، بیماری خودایمنی است که در افراد حساس ژنتیکی به علت فاکتورهای محیطی رخ می‌دهد. تقریباً ۱۰ درصد از بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس مشکل ایمنی دارند. در این نوع بیماری به خاطر تخریب سلول‌های بتای جزایر پانکراس، تولید انسولین به میزان کافی صورت نمی‌گیرد.

مطالعات خانوادگی نشان می‌دهد که برای ایجاد بیماری حساسیت ژنتیکی ارثی وجود دارد. تقریباً ۹۰ درصد از سفیدپوستان دیابتیک HLA-DR^۳ یا HLA-DR^۴ را دارند. اگر هر دو ژن در فرد وجود داشته باشد احتمال بروز بیماری بیشتر می‌شود. در تحقیقات اخیر نشان داده شده که ژن‌های حساسیتی واقعیتهای ممکن است HLA-DQ باشد.

از عوامل محیطی مؤثر در بروز بیماری، عفونت‌های ویروسی و مصرف اولیه با شیر گاو می‌باشد.

تست‌های آزمایشگاهی بیماری دیابت خودایمنی

اگر چه دیابت ملیتوس نوع I معمولاً با هایپرگلیسمی (افزایش قندخون) تشخیص داده می‌شود و انجام تست‌های سرولوژیکی برای غربال دیابت قبل از تخریب سلول‌های بتا مفید می‌باشد. آنتی‌بادی‌های علیه سلولهای جزایر لانگرهانس با استفاده از برش‌های یخ‌زده پانکراس انسانی با روش ایمونوفلورسنت غیرمستقیم شناسایی می‌شوند. آنتی‌بادی ضد سلول‌های جزایر لانگرهانس (ICAs) در سرم بیش از ۸۰ درصد بیماران

تازه تشخیص داده شده با دیابت میلِتوس نوع I گزارش شده است. آنتی‌بادی‌های علیه انسولین با روش‌های رادیو ایمونوالسی و آنزیم ایمونواسی قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

در بررسی‌های ایمونوپاتولوژی با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی جزایر پانکراس ملتهب، افزایش لنفوسیت‌های CD₈⁺ و پلاسما سل‌ها و ماکروفاژها را نشان می‌دهد. با فعال شدن لنفوسیت‌های B موجب فعال شدن لنفوسیت‌های CD₄⁺ شده بنابراین شیفت به پاسخ Th₁ و تولید سایتوکاین‌ها خاص از جمله TNF- α و IFN- γ و IL₁ می‌شود.

با ایجاد التهاب به تدریج سلول‌های بتا تخریب شده و سطح آنتی‌بادی‌ها و پاسخ‌های ایمنی افزایش می‌یابد. با پیشرفت بیماری، آپوپتوز (مرگ سلولی) و حمله توسط لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک صورت می‌گیرد. احتمالاً تولید اتوآنتی‌بادی‌ها چند سال قبل از ایجاد دیابت ملیتوس نوع IA وجود دارد. اتوآنتی‌بادی‌ها در افراد پری دیابتیک (افرادی که با خطر بالای ابتلا به دیابت مواجه می‌باشند) و افرادی که به تازگی مبتلا شده‌اند، وجود دارد. با گذشت زمان تولید آنتی‌بادی‌ها کاهش می‌یابد. از مهم‌ترین این آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌بادی‌های علیه دو پروتئین آنتی‌ژن انسولینوما ۲ (IA-۲ یا ICA ۵۱۲) و فوگرین IA-۲ β ، آنتی‌بادی‌های ضد انسولین، آنتی‌بادی‌های ضد آنزیم GAD و آنتی‌بادی‌های علیه دیگر پروتئین‌های سلول‌های جزایر پانکراس (ICAs) می‌باشند.

سایر بیماری‌های خودایمنی

از دیگر بیماری‌های اتوایمن می‌توان با مالیتیل اسکروزیس یا بیماری MS، میاستیناگراویس یا بیماری MG، سندرم گودپاسچر اشاره کرد. بیماری MS و MG موجب اختلالات سیستم عصبی شده در حالی که سندرم گود پاسچر موجب ایجاد گلومرولونفریت می‌گردد.

بیماری مالیتیل اسکروزیس MS

بیماری MS یک اختلال خودایمن التهابی سیستم اعصاب مرکزی بوده و بیماری با تشکیل ضایعاتی به نام پلاک در ماده سفید مغز و طناب نخاع مشخص می‌شود و تخریب پیش‌رونده غلاف میلین اکسون‌ها را موجب می‌گردد. همانند سایر بیماری‌های خودایمن در ایجاد این بیماری نیز عوامل ژنتیکی و محیطی نقش دارند.

مطالعات نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به MS نسبت به جمعیت کنترل ۴ برابر بیشتر آنتی‌بادی علیه EBV دارند. البته ویروس‌های دیگری نیز می‌توانند در ایجاد بیماری نقش داشته باشند مثل ویروس سرخک، هرپس سیمپلکس، ویروس واریسلا، ویروس سرخجه، ویروس انفولانزا C، ویروس هرپس انسانی نوع ۶، پلی مورفیسم ژن کدکننده رسپتور IL-۷ با ایجاد این بیماری نیز ارتباط دارد. IL-۷ احتمالاً در فعال کردن سلول‌های T خود واکنشگر در این بیماری نقش داشته باشد.

این بیماری بیشتر در جوانان و افراد بین ۲۰ تا ۴۰ سال بیشتر دیده می‌شود. آنتی‌بادی‌ها به غشای میلین متصل شده و ممکن است پاسخ ایمنی را شروع کنند که با این عمل ماکروفاژها و فاگوسیت‌های اختصاصی به نام سلول‌های میکروگلیال را تحریک می‌کند. با فعال شدن وقایع آبخاری ایمنولوژیک التهاب حاد، آسیب به اکسون‌ها و گلیاها موجب دژنره شدن عصب می‌گردد.

تشخیص آزمایشگاهی بیماری MS

آزمایش متداول برای تشخیص MS، الیگوکونال باینرنیگ و شاخص CSF IgG می‌باشند. در ۷۵-۹۰ درصد از بیماران مبتلا به MS، ایمونوگلوبولین‌ها در مایع نخاع افزایش می‌یابد. با انجام الکتروفورز پروتئین چند باند متفاوت ایجاد می‌شود که در سرم وجود ندارد، به این باندها الیگوکونال گویند که حتی تا ۸ باند نیز می‌رسد اما وجود ۴ باند نشان‌دهنده MS می‌باشد. ایزوالکتریکی فوکوسینگ با ایمونوبلاتینگ برای شناسایی این باندها استفاده می‌شود و نسبت به الکتروفورز پروتئین حساس‌تر می‌باشد. اندازه‌گیری IgG مایع نخاع با مقدار IgG سرم و مقایسه این دو با هم ممکن است باعث تشخیص MS گردد هر چند برای MS اختصاصی نیست. آنتی‌بادی‌های خاص و اختصاصی برای MS وجود ندارد ولی در اکثر بیماران آنتی‌بادی علیه پپتید پروتئین بازی میلین ایجاد می‌شود. تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) آسیب در دو یا چند محل خاص در سیستم عصب مرکزی را نشان می‌دهد. آنتی‌بادی با افینیتی بالا در بیماران مبتلا به MS دیده می‌شود.

بیماری میاستیناگراویس MG

بیماری میاستیناگراویس بیماری خودایمنی که اتصال عصبی- ماهیچه‌ای را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری با ضعف ماهیچه‌های اسکلتی مشخص می‌شود. آسیب به واسطه آنتی‌بادی علیه رسپتورهای استیل کولین، به ضعف ماهیچه پیشرونده منجر می‌شود. MG اغلب با دیگر بیماری‌های خودایمن مانند RA، SLE، آنمی پریشیوز و تیروئیدیت همراه است. این بیماری در خانم‌ها بیشتر بوده و در سن زیر ۴۰ سال دیده می‌شود و در آقایان در سنین بالای ۴۰ سال بیشتر دیده می‌شود. در ۸۵-۸۰ درصد بیماران آنتی‌بادی علیه رسپتورهای ACH (استیل کولین) وجود دارد. ACH آزاد شده از انتهای اعصاب موجب انقباض ماهیچه می‌گردد. زمانی که آنتی‌بادی با رسپتور ترکیب شود اتصال ACH بلوک شده و رسپتورها به خاطر وجود آنتی‌بادی و کمپلمان از بین می‌روند. در برخی از بیماران کنیاز اختصاصی ضد ماهیچه (Musk) وجود داشته و عمل لنفوسیت‌های T تنظیمی ناقص بوده که سبب پاسخ ایمنی توسط سلول‌های TH₁ تولیدکننده سایتوکاین‌های التهابی می‌گردد.

تشخیص آزمایشگاهی بیماری MG

برای شناسایی آنتی‌بادی از روش‌های RIA استفاده می‌شود که براساس بخش‌های اتصال آنتی‌بادی ضد رسپتور ACH به رسپتور را بلوک می‌کند. سم مار رادیو لیبل شده به نام α - بونگاروتوکسین برای اتصال غیر قابل برگشت به ACHR ها به کار می‌رود و سپس رسوب رسپتورها با عمل ترکیب شدن اندازه‌گیری می‌شود.

سندرم گود پاسچر

این سندرم با حضور اتو آنتی‌باد علیه غشاهای پایه گلومرولی، توپولار کلیه و آلئولار مشخص می‌شود که موجب آسیب به گلومرول شده، که بیماری به سرعت پیشرفت می‌کند و موجب نقص کلیه می‌گردد. بیماری اغلب در مردان جوان ۱۸-۳۵ سال دیده شده و به دنبال یک عفونت ویروسی رخ می‌دهد. اتصال اتو آنتی‌بادی موجب فیکس شدن کمپلمان و در نهایت آسیب بافت کلیه می‌گردد. در بیش از ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به سندرم گود پاسچر آنتی‌بادی علیه غشای پایه سلول‌های کلیه را داشته که این آنتی‌بادی را

می‌توان با روش ایمونوفلورسنت مستقیم نشان داد. مشابه سایر بیماری‌های خودایمن در ایجاد این بیماری نیز زمینه ژنتیکی نقش دارد.

تشخیص آزمایشگاهی سندرم گود پاسچر

آنتی‌بادی‌های موجود در خون را می‌توان با روش RIA و EIA و IFA نشان داد. در تست IFA از برش‌های یخ‌زده کلیه استفاده شده که با سرم بیمار انکوبه و سپس بر روی آن anti-IgG لیبل شده با ماده فلورسنت به کار می‌رود. تفسیر این تست سخت بوده و احتمال گزارش نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب زیاد است. از تست وسترن بلات توسط الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید و انتقال به کاغذ نیترو سلولزی برای ایمونوبلات می‌توان آنتی‌ژن‌های غشای پایه را جدا کرد. از این تست به عنوان تست تأییدی استفاده می‌شود. از تکنیک EIA که در آن از زیر واحد آلفا ۳ برای شناسایی آنتی‌بادی به کار می‌رود اما این روش نسبت به وسترن بلات حساسیت کمتری دارد.

در حدود ۲۰ درصد از بیماران تیترا پایینی از ANA نیز وجود داشته که در روش IFA طرح رنگ‌آمیزی اطراف هسته را نشان می‌دهد.

تست آنتی‌بادی ضد کروماتین

چندین آنتی‌بادی کروماتینی ضد هسته‌ای در بیماری‌های اتوایمیون وجود دارد. هسته (نوکلئوزوم یا NCS) عمده محل تولید اتو آنتی‌ژن در بیماری لوپوس بوده و این آنتی‌بادی‌های اختصاصی شاخصی مهم برای فعالیت بیماری هستند. تقریباً در تمامی بیماران لوپوسی آنتی‌بادی‌های ضد نوکلئوزومی وجود دارد. آنتی NCS در واقع یک آنتی‌بادی ضد هسته‌ای که حساسیت و اختصاصیت تشخیصی آنتی NCS برای لوپوس به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷ درصد است. این آنتی‌بادی‌ها با میزان تخریب کلیوی بیماران لوپوسی مانند گلومرولونفریت و پروتئین اوریا ارتباط محکمی دارد. آنتی‌بادی‌های هیستونی در ۵۵-۲۰ درصد از لوپوس‌های ایدیوپاتیک و ۹۵-۸۰ درصد لوپوس‌های دارویی دیده می‌شود. مصرف برخی داروها مانند کینیدین، پنی سیلامین، هیدرالازین، متیل دوپا، ایزونیازید سبب افزایش این اتوآنتی‌بادی‌ها می‌گردد.

تست آنتی‌بادی ضد DNA

آنتی‌بادی‌های ضد دزواکسی ریبونوکلئیک اسید یا آنتی‌بادی ضد DNA دو رشته‌ای DNA (ds-DNA) برای تشخیص و پیگیری درمان بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) بسیار مفید است. این آنتی‌بادی در حدود ۸۰-۶۵ درصد بیماران با لوپوس فعال دیده می‌شود. این آنتی‌بادی در برخی از بیماران مبتلا به بیماری‌های روماتولوژیک، بیماران با هیپاتیت مزمن، مونونوکلئوز عفونی و سیروز صفاوی دیده می‌شود. این آنتی‌بادی با درمان مناسب کاهش یافته و با تشدید علائم SLE مخصوصاً شروع گلودورلوفنریت افزایش می‌یابد. دو تیپ آنتی‌بادی ضد DNA وجود دارد، اولین آنتی‌بادی علیه DNA دو رشته‌ای (آنتی ds-DNA) و دیگری آنتی‌بادی علیه DNA تک رشته‌ای (ss-DNA) است. از اندازه‌گیری این آنتی‌بادی‌ها در تشخیص و ارزیابی روند بیماری مفید می‌باشند.

مصرف برخی از داروها مانند هیدرالازین و پروکائین امید سبب افزایش سطح آنتی‌بادی ضد DNA می‌شوند.

تست آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن شیره هسته Anti-ENA

این تست جهت کمک به تشخیص SLE و بیماری‌های بافت همبند به کار می‌رود. Anti-ENA یک گروه از آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای است که مشخصاً علیه آنتی‌ژن‌های حاوی RNA و پروتئین ساخته می‌شود. آنتی‌ژن ENA با استفاده از بافر فسفات-سالین از عصاره تیموس به دست می‌آید. رایج‌ترین ENAها، اسمیت (SM) و ریبونوکلئوپروتئین (RNP) هستند. آنتی‌بادی ضد هسته‌ای اسمیت در حدود ۳۰ درصد بیماران لوپوسی و ۸۰ درصد بیماران با اختلالات بافت همبند دیده می‌شود. آنتی نوکلئاز ریبونوکلئوپروتئین (anti-RNP) در قریب ۱۰۰ درصد بیماران مبتلا به بیماری‌های بافت همبند و ۲۵ درصد بیماران لوپوسی دیده می‌شود. آنتی‌بادی ضد J-۱ در فیروز ریوی بینابینی اتوایمن دیده می‌شود.

آنتی‌بادی‌های ضد غشای پایه گلودورلی

از این تست برای بررسی آنتی‌بادی‌های در حال گردش ضد غشای پایه گلودورلی در نفریت اتوایمن (مانند سندرم گود پاسچر) استفاده می‌شود. این آنتی‌بادی در افراد مبتلا به تریاد گلودورلوفنریت (هماچوری، هموپتیزی، آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های غشا پایه) مشاهده می‌شود. بیشتر از نیمی از افراد مبتلا به نفریت گلودورلی ناشی از سیستم ایمنی دچار عوارض ریوی می‌باشند. از تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمیایی برای

بررسی بیوپسی‌های کلیه یا ریه استفاده می‌شود. البته بررسی نمونه‌های سرمی بیماران روش سریع‌تر و قابل اعتمادتری در تشخیص سندرم گود پاسچر می‌باشد.

آنتی‌بادی ضد میتوکندری AMA

AMA اساساً برای کمک به تشخیص سیروز صفراوی اولیه به کار می‌رود. AMA یک آنتی‌بادی ضد سیتوپلاسمیکی است که علیه یک پروتئین غشای میتوکندری عمل می‌کند. این تست در اکثر بیماران با سیروز صفراوی اولیه دیده می‌شود و یک بیماری اتوایمن می‌باشد. لازم به ذکر است این تست در مبتلایان به هپاتیت مزمن فعال کلتاز دارویی، هپاتیت اتوایمن، اسکلرودرما، لوپوس سیستمیک، انسداد خارجی کبدی یا هپاتیت عفونی مثبت می‌شود. ساب گروه M-2 برای سیروز صفراوی اولیه بسیار اختصاصی است.

آنتی‌بادی ضد میوکارد AMA

این تست برای نشان دادن دخالت سیستم ایمنی در آسیب و بیماری میوکارد به کار می‌رود. این آنتی‌بادی در بیماری روماتیسمی قلب، کاردیومیوپاتی، سندرم بعد از توراکتومی و سکته قلبی دیده می‌شود. این آنتی‌بادی همچنین در کاردیومیوپاتی و بعد از جراحی قلب با انفارکتوس میوکارد نیز دیده می‌شود.

آنتی‌بادی سیتوپلاسمیک ضد نوتروفیلی ANCA

ANCA دسته‌ای از آنتی‌بادی‌هایی است که علیه اجزا سیتوپلاسمیک نوتروفیل‌ها ساخته می‌شود. از این تست در تشخیص گرانولوماتوز واگنر (WG) به کار می‌رود. گرانولوماتوز واگنر الکترونیک و اسکولیت سیستمیک منطقه‌ای شریان‌های کلیه، ریه و دستگاه تنفسی فوقانی است.

به دنبال شناسایی ANCA توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسنت غیرمستقیم دو الگوی عمده رنگ‌آمیزی دیده

می‌شود: ANCA سیتوپلاسمیک (C- ANCA) و ANCA پری نوکلئاز (P- ANCA)

بررسی اختصاصی‌تر نشان می‌دهد که P- ANCA اساساً حاوی آنتی‌بادی ضد میلوپراکسیداز (MPO) و C-

ANCA حاوی آنتی‌بادی ضد پروتئیناز ۳ (PR۳) هستند.

اتو آنتی‌ژن PR۳ برای گرانولوماتوز واگنر بسیار اختصاصی است.

تست ANA

گروهی از آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای که برای تشخیص لوپوس (SLE) و سایر بیماری‌های اتوایمن به کار می‌رود. تعدادی از آنتی‌بادی‌های این گروه برای SLE و سایر بیماری‌های اتوایمن اختصاصی است. تست مثبت در قریب به ۹۵ درصد بیماران دیده می‌شود هر چند در سایر بیماری‌های روماتوئیدی نیز تست ANA مثبت می‌شود. این تست به روش‌های مختلف مانند ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الایزا انجام می‌گیرد. با مصرف داروهایی مانند استازولامید، آمینوسالیسیلیک اسید، کلر پروتیکسن، کلرو تیازیدها، هیدرولازین، فنیل بوتازون، فنی توئین سدیم، پروکائین آمید، استرپتومايسين، سولفانامیدیا این تست مثبت می‌شود. مصرف استروئیدها سبب گرفتن جواب منفی ANA می‌شود.

بیماری‌های اتوایمیون	آنتی‌بادی‌های مثبت
SLE	ANA, SLE prep, ds DNA, ss DNA, anti- DNP, SS- A
SLE ناشی از دارو	ANA
سندرم شوگرن	RF, ANA, SS- A, SS- B
اسکلرودرمی	ANA, SCL, RNA, ds DNA
بیماری رینود	ACA, SCL- ۷۰
بیماری مختلط بافت همبند	ANA, RNP, RF, ss DNA
آرتریت روماتوئید	RF, ANA, RANA, RAP
سیروز صفراوی اولیه	AMA
تیروئیدیت	آنتی میکروزومال، آنتی تیروگلوبولین
هپاتیت مزمن فعال	ASMA

آنتی‌بادی ضد سلول پاریتال APCA

سلول‌های پاریتال در پروگسیمال معده وجود داشته و سبب ترشح اسید کلریدریک و فاکتور داخلی می‌شوند. فاکتور داخلی برای جذب ویتامین B۱۲ ضروری است. آنتی‌بادی‌های ضد سلول پاریتال در قریب ۹۰ درصد مبتلایان با آنمی پرنیشیوز دیده می‌شوند. در حدود ۶۰ درصد از بیماران دارای آنتی‌بادی‌های ضد

فاکتور داخلی هستند. به نظر می‌رسد که این آنتی‌بادی‌ها در تخریب نمودن مخاط معده بیماران مشارکت دارند. همچنین APCA در مبتلایان به گاستریت آتروفیک، زخم‌های معده و کانسر معده یافت می‌شود. APCA در سایر بیماری‌های اتوایمن مانند تیروئیدیت، میکسودم، دیابت نوجوانان، بیماری آدیسون و آنمی فقر آهن نیز مشاهده می‌شود.

آنتی‌بادی ضد اسکرودرمی

این آنتی‌بادی برای تشخیص اسکرودرمی (اسکلروزسیستمیک پیشرونده) که در حدود ۴۵ درصد از بیماران این آنتی‌بادی یافت می‌شود. این بیماری یک اختلال چند سیستمی که فیروزه شدن پوست، ریه‌ها، کلیه‌ها و دستگاه گوارش مشخص می‌شود. با رسوب یک ماده شبه کلاژن در بافت‌های این اعضا رسوب می‌کند. تیترا بالای آنتی‌بادی SCL-۷۰ بیشتر به نفع حضور PSS و فعال بودن بیماری است. این آنتی‌بادی در بیماری‌هایی مانند لوپوس، بیماری‌های مختلط بافت همبند، سندرم شوگرن و آرتریت روماتوئید نیز یافت می‌شود.

آنتی‌بادی ضد عضله صاف ASMA

از این تست اساساً برای کمک به تشخیص هپاتیت مزمن فعال به دلیل اتوایمیونیتی به کار می‌رود. ASMA یک آنتی‌بادی ضد سیتوپلاسمیکی علیه آکتین (یک پروتئین محلول اسکلتی) است. ASMA رایج‌ترین اتو آنتی‌بادی شناخته شده در هپاتیت مزمن اتوایمن است البته در برخی بیماری‌ها مانند بدخیمی‌ها، MS، سیروز صفراوی اولیه و عفونت‌های مایکوپلاسمایی نیز این آنتی‌بادی افزایش می‌یابد.

آنتی‌بادی ضد اسپرمانوزوئید

این تست جهت غربالگری ناباروری بوده و در این اختلال آنتی‌بادی‌هایی علیه آنتی‌ژن‌های اسپرم ساخته می‌شود. این تست به طور رایج در ارزیابی یک زوج نابارور و بعد از مثبت شدن تست بعد از مقاربت (Postcoital) به کار می‌رود. این آنتی‌بادی‌ها از باند شدن اسپرم بر روی تخمک جلوگیری می‌کند.

آنتی‌بادی ضد AA-(Ro)، ضد SS-B (La) و ضد SS-C

آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای در واقع آنتی‌ژن‌های شیوه هسته‌ای بوده و برای تشخیص سندرم شوگرن به کار می‌روند. آنتی‌بادی La، Ro، SS-C و ساب تایپ‌های آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای بوده و با آنتی‌ژن‌های هسته‌ای مشتق شده از لنفوسیت‌های B انسانی واکنش می‌دهند. از این تست در تشخیص سندرم شوگرن به کار می‌رود. سندرم شوگرن یک اختلال ایمنولوژیکی است که با تخریب پیشرونده غدد اگزوکرینی اشک و بزاق مشخص شده و باعث خشکی مخاط و ملتحمه می‌شود. این بیماری می‌تواند خودبه‌خودی ایجاد شود یا به دنبال بیماری‌های اتوایمن مانند لوپوس، آرتریت روماتوئید ایجاد گردد. آنتی‌بادی Anti-SS-A در حدود ۷۰ درصد بیماران و آنتی‌بادی‌های ضد SS-B در حدود ۵۰ درصد از مبتلایان به سندرم شوگرن اولیه دیده می‌شود. هنگامی که هر دو این آنتی‌بادی‌ها مثبت شود تشخیص سندرم شوگرن مطرح می‌شود. در مصرف برخی داروها مانند استروئیدها، آندروژن‌ها، قرص‌های ضد بارداری حاوی پروژسترون و وارفارین سبب افزایش تیتراژ آنتی‌بادی می‌گردد.

آنتی‌بادی‌های گلیادینی، Endomysial و آنتی‌بادی‌های ترانس گلوتامیناز بافتی

گلیادین و گلوتن پروتئین‌های موجود در غلات و فرآورده‌های آن‌هاست. بیماران مبتلا به سلیاک قادر به تحمل هیچگونه فرآورده‌ای از غلات نیستند. این پروتئین‌ها برای مخاط دیواره روده سمی بوده و ضایعات مشخصه پاتولوژیکی را ایجاد می‌کند. این بیماران دچار علائم سوءجذب شدید می‌شوند و تنها راه درمان این بیماری عدم مصرف غلات و فرآورده‌های آن می‌باشد.

در این افراد پس از مصرف غلات گلوتن و گلیادین از مخاط روده جذب و ایجاد متابولیت‌هایشان سبب تخریب مستقیم مخاط روده می‌شود. به این ترتیب ایمنوگلوبولین‌ها (آنتی‌گلیادین)، ترانس گلوتامیناز ضد بافتی و Antiendomysial ساخته شده و در مخاط روده و سرم بیماران دیده می‌شود. شناسایی این آنتی‌بادی‌ها در خون بیماران مبتلا به سوءجذب نشانه اسپروی سلیاک نامیده می‌شود. تشخیص قطعی بیماری سلیاک با مشاهده ضایعات روده بوده و باید رژیم غذایی عاری از گلوتن رعایت شود.

به دلیل اختصاصیت زیاد آنتی‌بادی‌های آندومیزیالی (EMA) برای بیماری سلیاک با اندازه‌گیری این آنتی‌بادی‌ها، انجام بیوپسی‌های مکرر روده باریک را مرتفع می‌سازد. در صورت رعایت رژیم غذایی غلات و

گلوتن این تست منفی می‌شود. لازم به ذکر است که در برخی از بیماری‌های گوارشی نظیر بیمار کرون، کولیت و عدم تحمل شدید لاکتوز میزان آنتی‌بادی‌های گلیادینی افزایش می‌یابد.

درمان

درمان در بیماری‌های خودایمنی با اثر موارد سرکوب القاء خودایمنی، بازگرداندن مکانیسم‌های تنظیمی، مهار مکانیسم‌های افکتور می‌باشد. حذف سلول‌های واکنش‌دهنده نسبت به خود بیشتر از سایر روش‌های درمانی به کار می‌رود.

اخیراً نشان داده شده که مسدود کردن سایتوکاین‌ها در پیشگیری از فعال شدن ایمنی در برخی از بیماری‌ها مؤثر است. به دلیل این که سیگنال‌های تحریکی همزمان برای فعال شدن سلول‌های T و B لنفوسیت لازم بوده و با حذف سلول‌های B و T و یا از طریق استفاده از خود اتوانتی‌ژن به منظور القای تحمل، سلول‌های لنفوئیدی به طور اختصاصی تری مورد هدف قرار می‌گیرند. با بلوک کردن سایتوکاین‌ها با TNF یا IL۱ به نظر می‌رسد که در برخی از بیماری‌های اتوایمن آسیب بافتی کمتر روی می‌دهد.

به عنوان مثال در بیماری خودایمن تیروئید، با استفاده از تیروکسین و تیروتوکسیکوز به کمک داروهای آنتی‌تیروئید، هیپوتیروئیدی قابل کنترل است.

در آنمی پریشیوز کنترل متابولیک با تزریق ویتامین B_{۱۲}، در میاسنتی گراویس استفاده از داروهای مهارکننده کولین استراز کاربرد دارد.

مصرف داروهای ضد التهاب، کورتون، کاهش استرس، ورزش مداوم و رژیم غذایی مناسب و خواب کافی، مصرف روزانه میوه‌جات تازه و مولتی ویتامین در بهبود بیماری مؤثر می‌باشد.

به کارگیری سلول‌های بنیادی مغز استخوان، که این سلول‌ها را روی محیط کشت رشد داده و پس از تمایز آن‌ها به سلول‌های مختلف در مهار یا درمان بیماری‌های خودایمن مؤثر می‌باشد. سلول‌های بنیادی مغز استخوان موادی از خود ترشح می‌کنند که سیستم ایمنی را مهار کرده و همچنین تمایز به سلول‌های تخریب توسط آنتی‌بادی‌های مؤثر در بیماری‌های اتوایمن را دارند و می‌توان آن‌ها را جایگزین بافت آسیب نمود.

منابع

- سرولوژی و ایمنولوژی عملی - دکتر محمد شفیع مجددی، هادی عتباتی
سرولوژی و ایمنولوژی عملی - دانشگاه شهید بهشتی
ایمنولوژی رویت ۲۰۱۸
ایمنولوژی - دکتر فرید حسینی
ایمنولوژی سلولی و مولکولی - ابوالعباس ۲۰۱۷
اصول طب هاریسون