

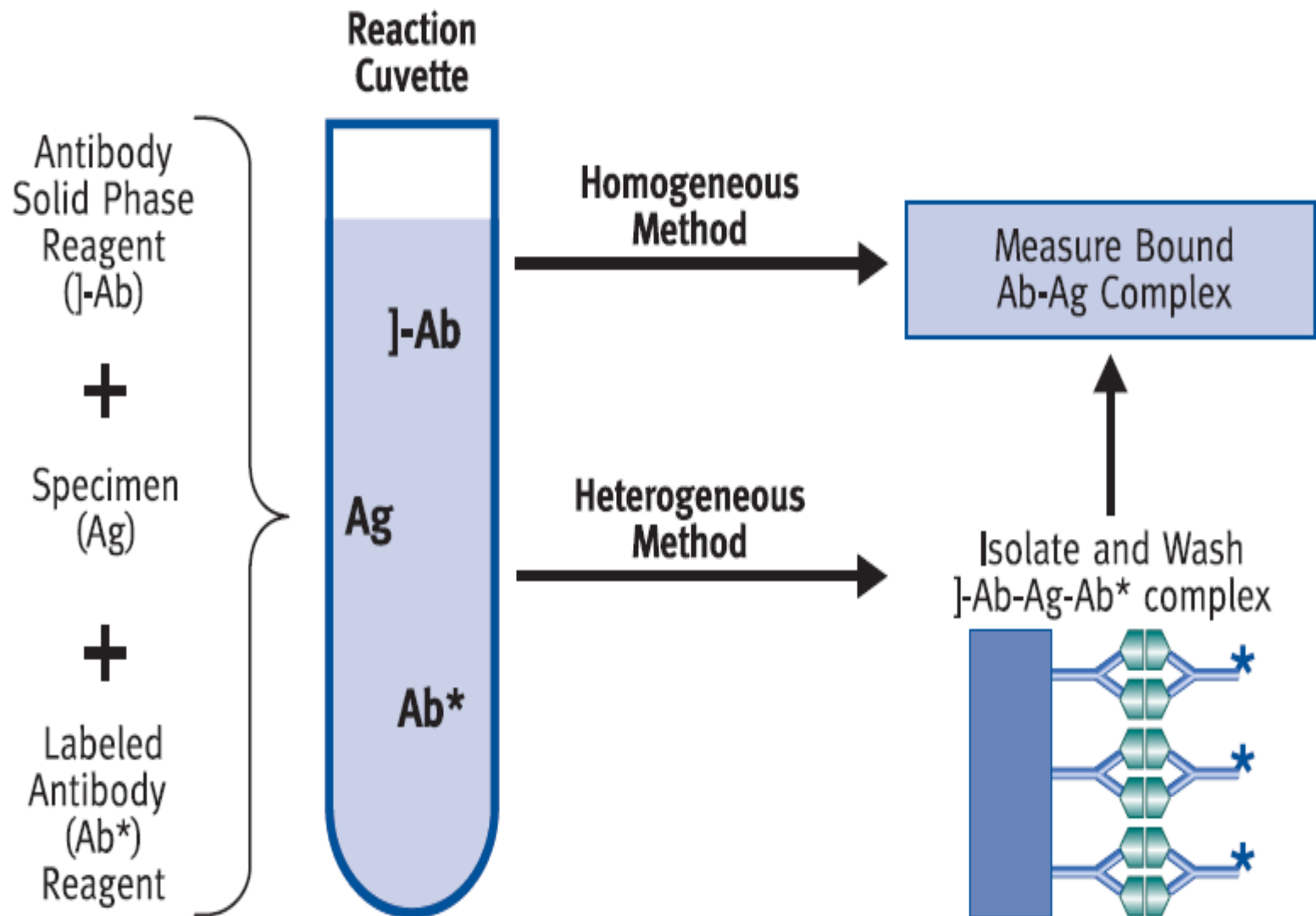


FIGURE 1-12 Homogeneous and heterogeneous immunoassays

- ▶ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):
 - ▶ Enzyme Immunoassay (EIA) uses the catalytic properties of enzymes to detect and quantify immunological reactions.
 - ▶ Alkaline phosphatase (ALP), horseradish peroxidase (HRP), glucose-6-dehydrogenase (G6D), and β -galactosidase are the enzymes most commonly used as labels in EIA.
 - ▶ ELISA is a heterogenous EIA technique.
- 

Chemiluminescence Immuno Assay CIA

Dr mehrdad vanaki

Consultant of QMS & QA in medical lab

مقدمه

تکنولوژی که به تازگی طراحی گردیده و به نام کمی لومینسانس می باشد و بر اساس اندازه گیری محصول نهائی (نور) می باشد .

در واکنش کمی لومینسانس تحت اثر اکسیژن یا پراکسید ها بر روی برخی مواد معدنی منجر به برگشت الکترون به مدار پایه می گردد که این برگشت الکترون با آزاد سازی انرژی نوری بوده یا به عبارتی انرژی آزاد شده از ملکول ها به صورت تولید نور یا فوتون افشانی خواهد بود . میزان فوتون افشانی در واکنش های بیولومینسانس چندین برابر واکنش های کمی لومینسانس می باشد .

میزان حساسیت روش کمی لومینسانس از روش رادیوایمونواسی و فلوئوروایمونواسی بیشتر است و حساسیت روش فلوئوروایمونواسی نیز از روش انزیم ایمونواسی بیشتر می باشد.

مقایسه حساسیت سنجش در انواع روش های ایمونواسی

زیتامول 10-21	کمی لومینسانس
10-18	رادیو ایمونو اسی
10-12	فلوئورو ایمونو اسی
10-9	انزیم ایمونو اسی نسل سوم
10-5	اگلوتیناسیون لاتکس

Chemiluminescence

کمی لومینسانس

تاریخچه:

اولین بار انسان نور کمی لومینسانس را در کرم شب تاب پیدا نمود که شامل انرژی نورانی حاصل از فوتون های آزاد شده بدون دخالت حرارت می باشد

مفاهیم اولیه روش کمی لومینسانس ایمونواسی :

اصول کمی لومینسانس مشابه سایر روش های ایمونو اسی است (نظیر رادیو ایمونو اسی / آنزیم ایمونواسی / فلئوروایمونو اسی و...) با این تفاوت که لیبل بکار گرفته شده به عنوان اندیکاتور ایمونو اسی شامل لومینول و آکریدینیوم یا ایزولومینول می باشد لومینول با تاثیر بر روی ملکول ها منجر به تولید فوتون و مجموعه فوتون های نوری توسط دستگاه لومینومتر (فوتون سنج) و توسط یک سیستم فتومولتی پلایر دتکتور تبدیل به انرژی الکتریکی شده و به صورت دیجیتال و کمی نشان داده می شوند

Chemiluminescence

کمی لومینسانس

گرچه لومینول اولین نشانگری است که مورد استفاده واقع شده ولی ایزو لومینول کارائی بهتری دارد این واکنش با افزودن مخلوطی از پراکسید هیدروژن و یک کاتالیست اجرا می شود

Chemiluminescence

مزایای روش کمی لومینسانس نسبت به سایر روش های ایمونواسی

1- حساسیت بسیار بالا روش کمی لومینسانس :

مزیت غالب روش کمی لومینسانس به سایر روش های ایمونواسی حساسیت بالا روش می باشد و در برخی متدها تا حد زیپتامول (21-10) می باشد / حساسیت کمی لومینسانس هزاران برابر بیشتر از روش الایزا و رادیو ایمونواسی می باشد این موضوع منجر به کاهش دفعات تکرار بی مورد تست ها و مقرون به صرفه شدن این گروه از آزمایشات گردیده است)

2- دقت و تکرارپذیری مناسب روش کمی لومینسانس نسبت به سایر روش ها به دلیل تاثیر پذیری کمتر این روش از عوامل محیطی و پایداری بیشتر معرف ها

3- ویژگی و اختصاصیت بالا روش کمی لومینسانس

4- نیمه عمر طولانی و پایداری کیت های کمی لومینسانس نسبت به رادیو ایمونواسی و الایزا

5- گستردگی تست های قابل انجام با روش کمی لومینسانس به دلیل حساسیت و ویژگی مناسب و بالا روش و امکان اندازه گیری غلظت های بسیار پائین آنالیت

6- کم خطر و ایمن بودن روش کمی لومینسانس نسبت به سایر روش های ایمونواسی

7- استفاده از روش کمی لومینسانس به عنوان روش مرجع از جمله کاربرد فاز

گازی کمی لومینسانس به عنوان ردیاب در روش مرجع کروماتوگرافی گازی

8- عدم نیاز به منبع نوری و فیلتر خاص و نداشتن محدودیت های روش رنگ سنجی الایزا

تفاوت کمی لومینسانس و الکترو کمی لومینسانس

CL & ECL

در روش کمی لومینسانس انرژی اولیه جهت تهیج اتم ها به واسطه یک واکنش شیمیائی تامین می گردد در حالی که در روش الکترو کمی لومینسانس انرژی اولیه جهت تهیج اتم ها به کمک انرژی الکتریکی حاصل از یک واکنش الکتروشیمیائی تامین می گردد

در هر دو حالت پس از تهیج اتم ها و در برگشت به حالت پایه فوتون ساطع می گردد و فوتون های ساطع شده توسط فوتون سنج یا لومینومتر اندازه گیری کمی یا دیریتال می شوند

الکترو کمی لومینسانس

ECL

در روش الکترو کمی لومینسانس اکسیداسیون الکترو شیمیائی استر آکریدین در حضور آب اکسیژنه منجر به تولید کمی لومینسانس آبی رنگ می گردد که در طول موج 430 خوانش می گردد

الکترو د های دستگاه الکترو کمی لومینسانس معمولاً در مجاورت محلول قرار گرفته و نور منتشره بین سطح الکترو د و محلول توسط دتکتور اندازه گیری می گردد

Classification of Chemiluminescence

سرعت واکنش کمی لومینسانس

واکنش کمی لومینسانس به لحاظ سرعت واکنش به دو گروه زیر تقسیم می شوند:

Flash method واکنش فلاش

در طول 0.5 تا 3 ثانیه شروع و به اوج می رسد و در طول 2 الی 4 ثانیه کامل از بین رفته و حذف می گردد

ویژگی مثبت واکنش فلاش حساسیت بسیار بالا روش (در حد اتو مول) است که کاربرد آن را محدود به آزمایشگاه های مرجع و تحقیقاتی می نماید

ویژگی های منفی روش فلاش گرانی روش و کوتاه بودن زمان واکنش است که جهت خوانش فوتون ها الزاما دتکتور باستی در مجاورت نزدیک با سیستم واکنش باشد که به محض آزاد شدن فوتون ها خوانش با دتکتور انجام گردد

GLOW method واکنش گلاو

در طول 2 الی 7 دقیقه به اوج رسیده و به مدت 20 الی 30 دقیقه پایدار و ثابت باقی می ماند

ویژگی مثبت روش گلاو کاربرد آن در آزمایشگاه های بالینی روتین است که به دلیل ثبات و پایداری سیگنال های نهائی و امکان بازخوانی مجدد تست ها در این روش می باشد

ویژگی منفی روش گلاو حساسیت آن است که کمی کمتر از روش فلاش می باشد

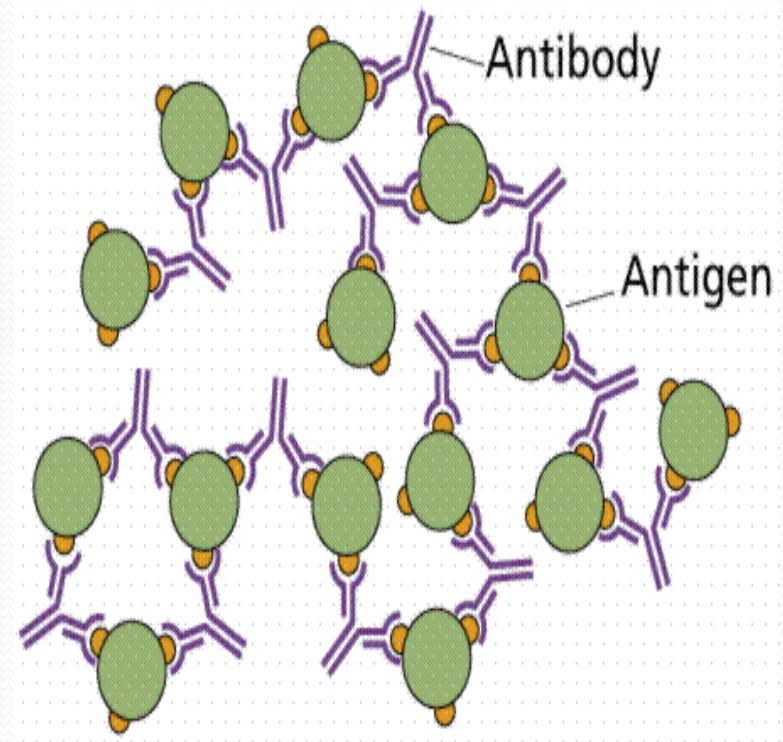
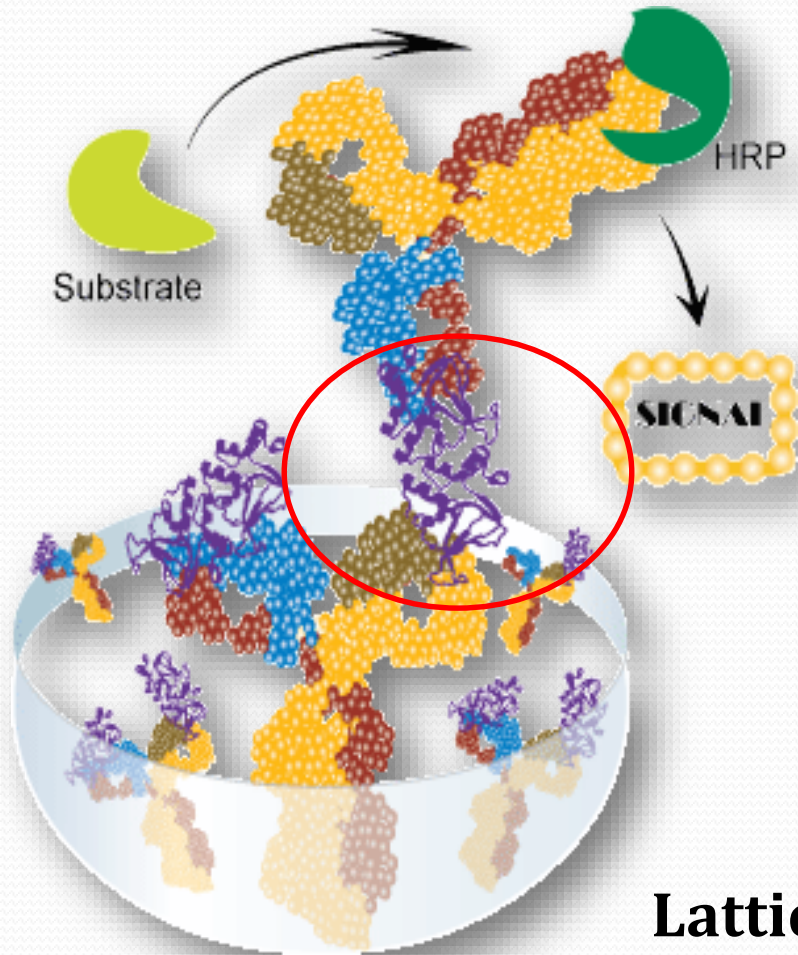
Chemiluminescence

معیار های مناسب در خرید سیستم کمی لومینسانس

- 1- خرید لومینومتر استاندارد و دارای تأییدیه بین المللی و تأییدیه صحت و دقت (صحه گذاری) در شرکت پشتیبان و آزمایشگاه ها**
- 2- پشتیبانی و خدمات پس از فروش با سطح بالا (تحقیق و استعلام اعتبار شرکت پشتیبان از مراکز نصب شده / ترجیحا نماینده انحصاری یا اصلی)**
- 3- دارا بودن سیستم باز کیت کمی لومینسانس یا سیستم بسته با اعتبار بالا و تنوع گسترده در تست های قابل انجام**
- 4- قیمت مناسب کیت ها ی سیستم متناسب با تعرفه های آزمایشگاهی ایران**
- 5- ترجیحا استفاده از سیستم های فول اتومیشن کمی لومینسانس به دلیل کاهش قابل ملاحظه خطا های پرسنلی**
- 6- دارا بودن حداقل حساسیت در روش های کمی لومینسانس (فمتو 15- 10)**

Classification of errors in immunoassay

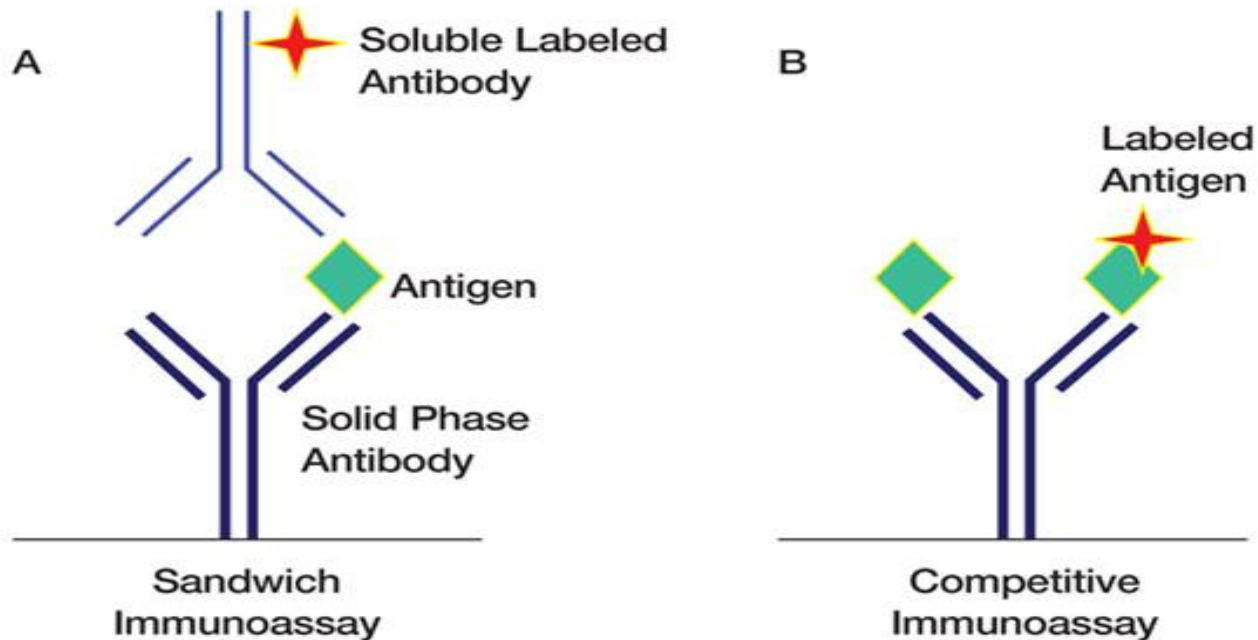
Primary Ag-Ab interaction



Lattice formation in secondary Ag-Ab

Fig. 1: Common Configurations for Diagnostic Immunoassays

A. Two-site sandwich immunoassays: endogenous antigen is bound by a solid phase capture antibody and a signal is generated when soluble, labeled antibody binds a second epitope on the antigen. The signal generated by the labeled antibody is proportional to the concentration of the antigen in the patient sample. B. Competitive immunoassays: the unlabeled antigen in the patient sample competes with the labeled antigen for binding to a solid phase antibody. The amount of the labeled antigen bound by the antibody is inversely proportional to the concentration of the antigen in the patient sample.



Type of errors in immunoassays

Errors due to exogenous factors

Exogenous errors may be random (e.g. due to variability in sample pipetting or other manipulations) or systematic (e.g. consistent deviations from the 'true' value due to calibration errors), may affect many results, and should usually be detected by good internal quality control (IQC) and occasionally retrospectively by careful examination of external quality assessment (EQA) results.

Errors due to endogenous interferences

Endogenous interferences are almost always sporadic and specimen-dependent, and hence more difficult to identify. They may be due to unintended detection of cross-reacting substances, presence of abnormally high concentrations of normal serum constituents (e.g. hemolysed or lipemic specimens), and formation of antibody or other macromolecular complexes.

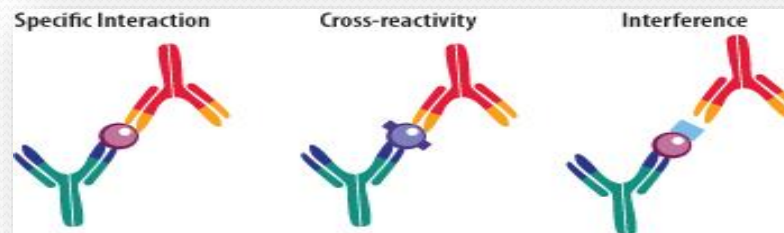


Table 1 Comparison of exogenous and endogenous types of errors

Type of error	Characteristics	Possible causes	Means of minimizing occurrence and facilitating recognition
Exogenous	Often associated with change in bias of IQC and/or EQA results	- Incorrect or degraded calibrant - Incorrect reconstitution of freeze-dried controls - Failure to recognize need for recalibration - Lot-to-lot reagent variation - Faulty pipettes or dispensers	- Carefully following manufacturers' instructions - Implementing clearly defined IQC procedures - Participating in appropriately designed EQA schemes
	Increased imprecision	- Imprecise pipetting - Mis-sampling due to probe blockage - Failure of bubble detection - Inadequate mixing of reagents and/or frozen specimens - Inadequate washing - Contaminants on reaction tubes	- Ensuring laboratory staff are well trained, facilitating early recognition and correction of errors - Establishing good communication with clinical staff and technical staff in relevant diagnostic companies
Endogenous	- Sporadic - Specimen-dependent - Difficult to identify	- Normal serum components in excess - Cross-reacting substances - Antianalyte and antireagent antibodies and other complex formation - High-dose hooking	- Standardized procedures for assessing haemolysed or lipaemic specimens - Awareness of assay characteristics - Protocols for assessing possible interference - Established protocol for vulnerable analytes (e.g. tumour markers)

Immunoassay interference by endogenous antibodies

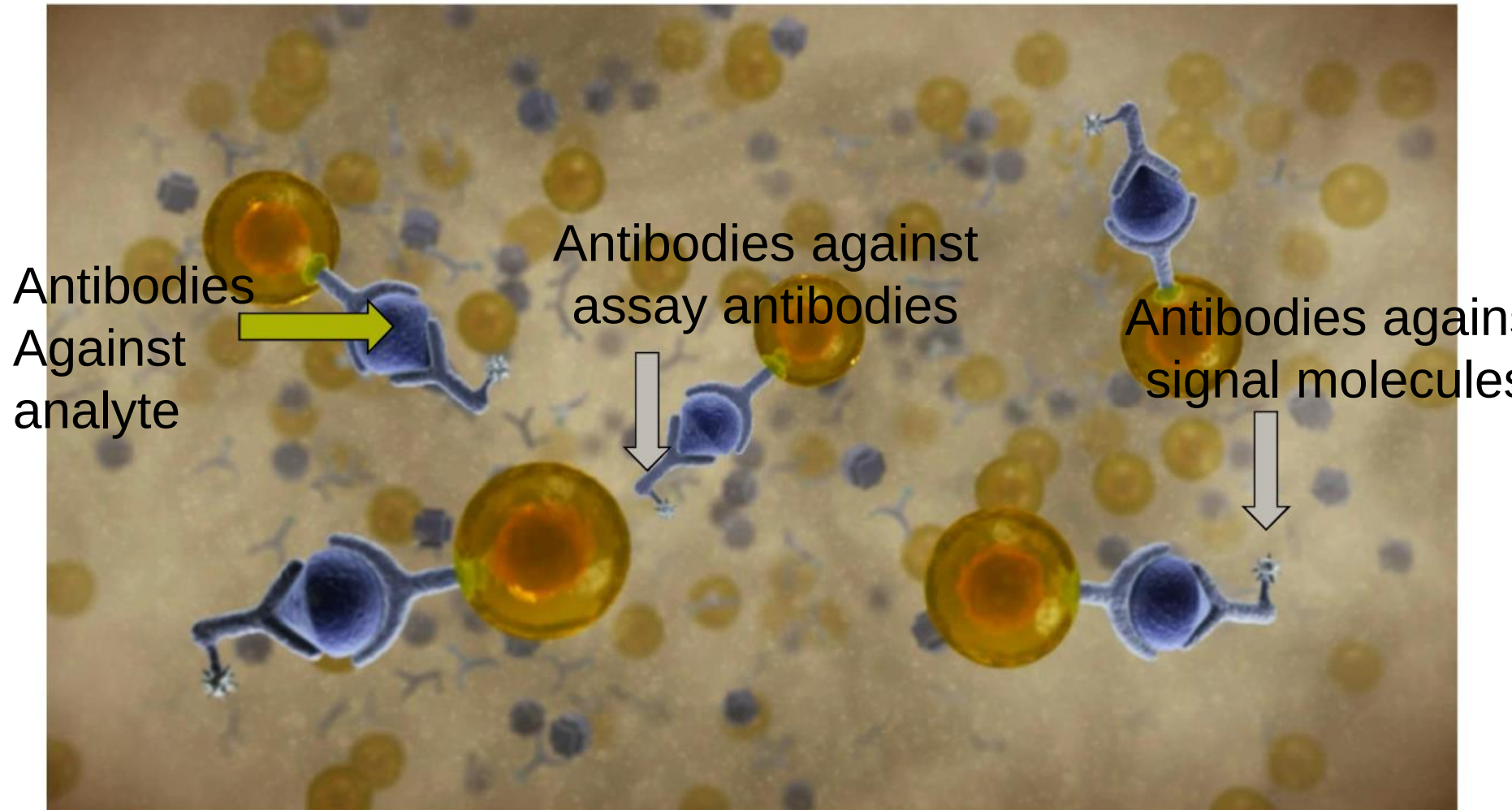
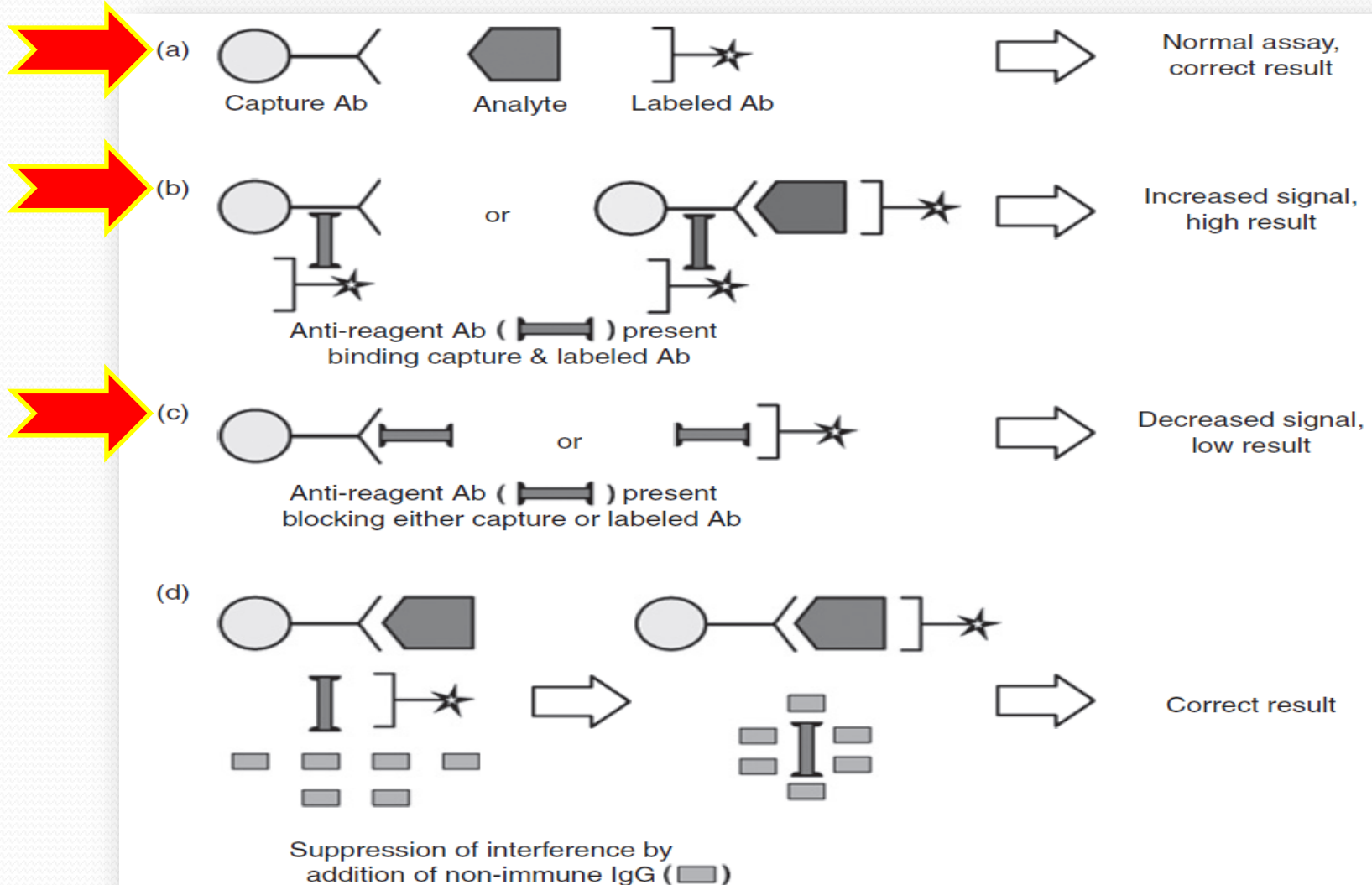


Table 3 Characteristics of antireagent antibodies^{1,31}

Type of antibody	Aetiology	Characteristics	Subjects in whom most likely to be present
Human anti-mouse antibody (HAMA)	Produced in response to a direct antigenic stimulus, most frequently following treatment with mouse MAbs either for imaging or treatment, but also in subjects working with animals	Most readily identified antireagent antibodies. High-affinity antibodies which may be present at high concentrations ($>1000 \mu\text{g/L}$ reported). May be of IgG, IgA, IgM or (rarely) IgE class. May persist long-term	Those who have previously undergone treatment with MAbs either for imaging or treatment
Heterophilic antibody	Poorly defined antibodies developed in response to no clear immunogen	Two general types reported – one detecting an epitope present on rabbit Ig only and one detecting epitopes on goat, cattle, horse and mouse but not rabbit	Variable prevalence with variable analytical relevance
Rheumatoid factor	Autoantibodies often present in serum samples from patients with rheumatoid disease	Bind to multiple antigenic determinants on the Fc region of IgG. May be of IgM, IgG or IgA classes. Cause falsely high values in turbidimetric or latex particle agglutination assays. May interfere in two-site immunoassays, e.g. by binding to Fc portions of other immunoglobulins and causing aggregation	Patients with autoimmune rheumatic diseases, but can also be seen in patients with infections, particularly persistent infections

MAB, monoclonal antibody

Anti-reagent antibodies



Human anti-animal antibodies (HAAA)

- Response to parenteral administration of animal MoAb
- Following radioimaging, cancer therapy, transplant immunotherapy
- High concentration, high avidity, epitope specific