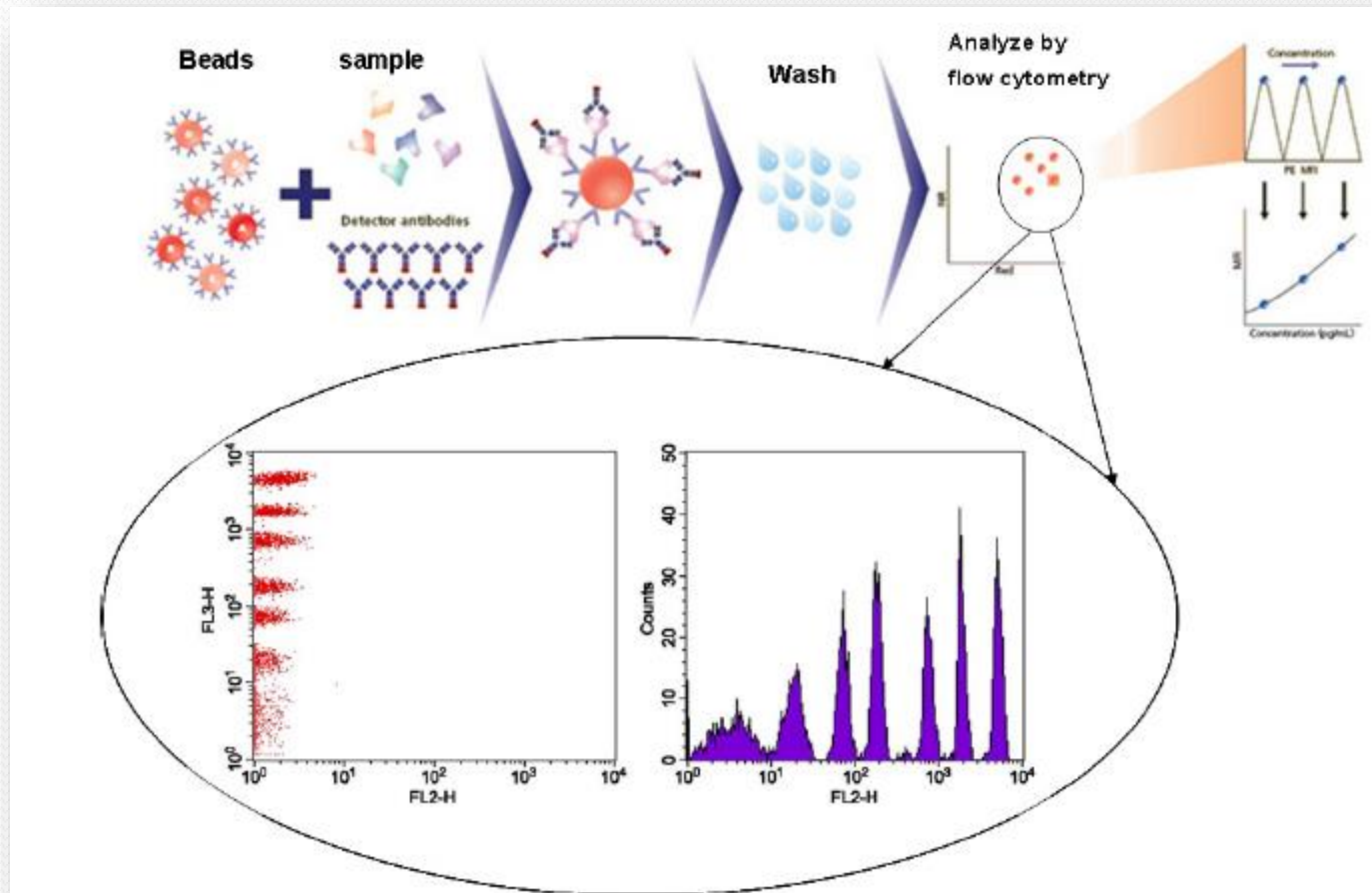


Luminex:

xMAP (multiplex analyte profiling) technology



ELISA TROUBLESHOOTING

- **Dr. mehrdad vanaki**
- **88/10/17**

تعریف و طبقه بندی روش الایزا

ELISA

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

- سنجش ایمنومتریکی واکنش آنتی ژن و آنتی بادی با هدف جستجوی آنتی ژن یا آنتی بادی بواسطه آنزیم های لیبل شده

طبقه بندی آنزیم ایمنونواسی :

- 1- همورژنوس آنزیم ایمنونواسی :** واکنش فاقد مرحله شستشو و جداسازی بوده و اندازه گیری بر اساس تغییرات فعالیت آنزیم می باشد (کاربرد در اندازه گیری سطح داروها)
- 2- هتروژنوس آنزیم ایمنونواسی:** روش مبتنی بر فاز جامد بوده و دارای مرحله شستشو و جداسازی می باشد و آنزیم در این روش صرفاً یک اندیکاتور جهت تایید حضور کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی می باشد (عمده روشها از این گروه می باشد) روش هتروژن آنزیم ایمنونواسی دو نوع رقابتی و غیر رقابتی تقسیم می گردد .

الایزا ساندویچ Elisa Sandwich

Ab sandwich or Ag Capture

در این روش یک آنتی ژن در بین دو آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد
و ساندویچ می گردد و شایعترین روش الایزا محسوب می گردد مثل تست
PSA/TSH/FSH/LH/HCG

در روش آنتی ژن کپچر یا آنتی بادی ساندویچ ملکول آنتی ژن حداقل
بایستی دارای دو سایت یا ناحیه آنتی ژنیک متفاوت باشد

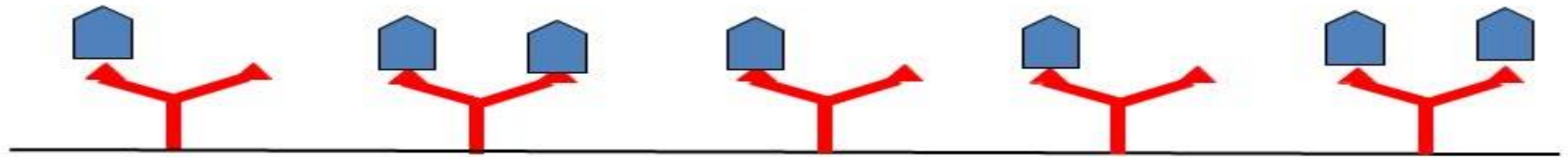
Ag Sandwich or Ab Capture

این روش که برای جستجوی آنتی بادی به کار می رود یک ملکول
آنتی بادی بین دو ملکول آنتی ژن ساندویچ و کاپچر می گردد .

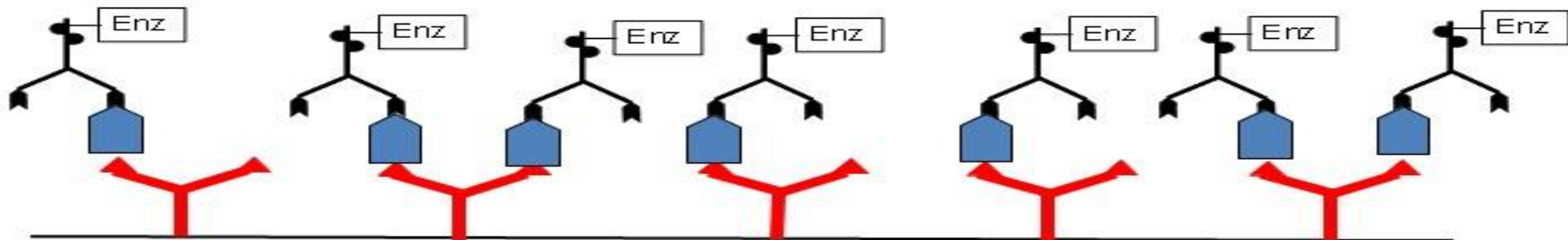
Sandwich ELISA



Antibody coated well



Addition of analyte



Addition of enzyme conjugated antibody

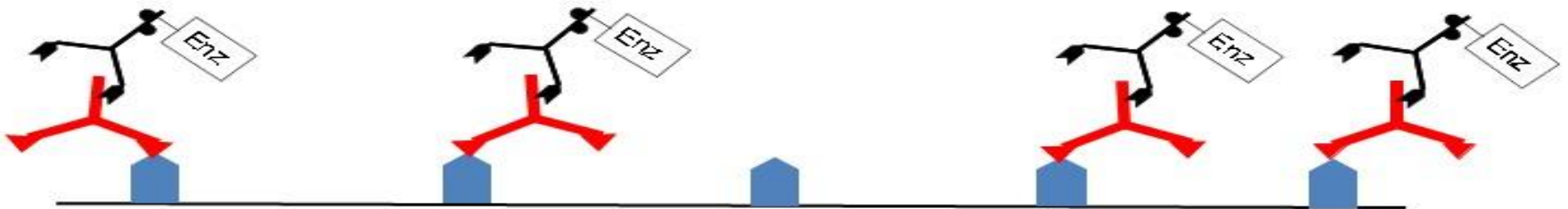
Antigen-Down ELISA



Antigen coated well

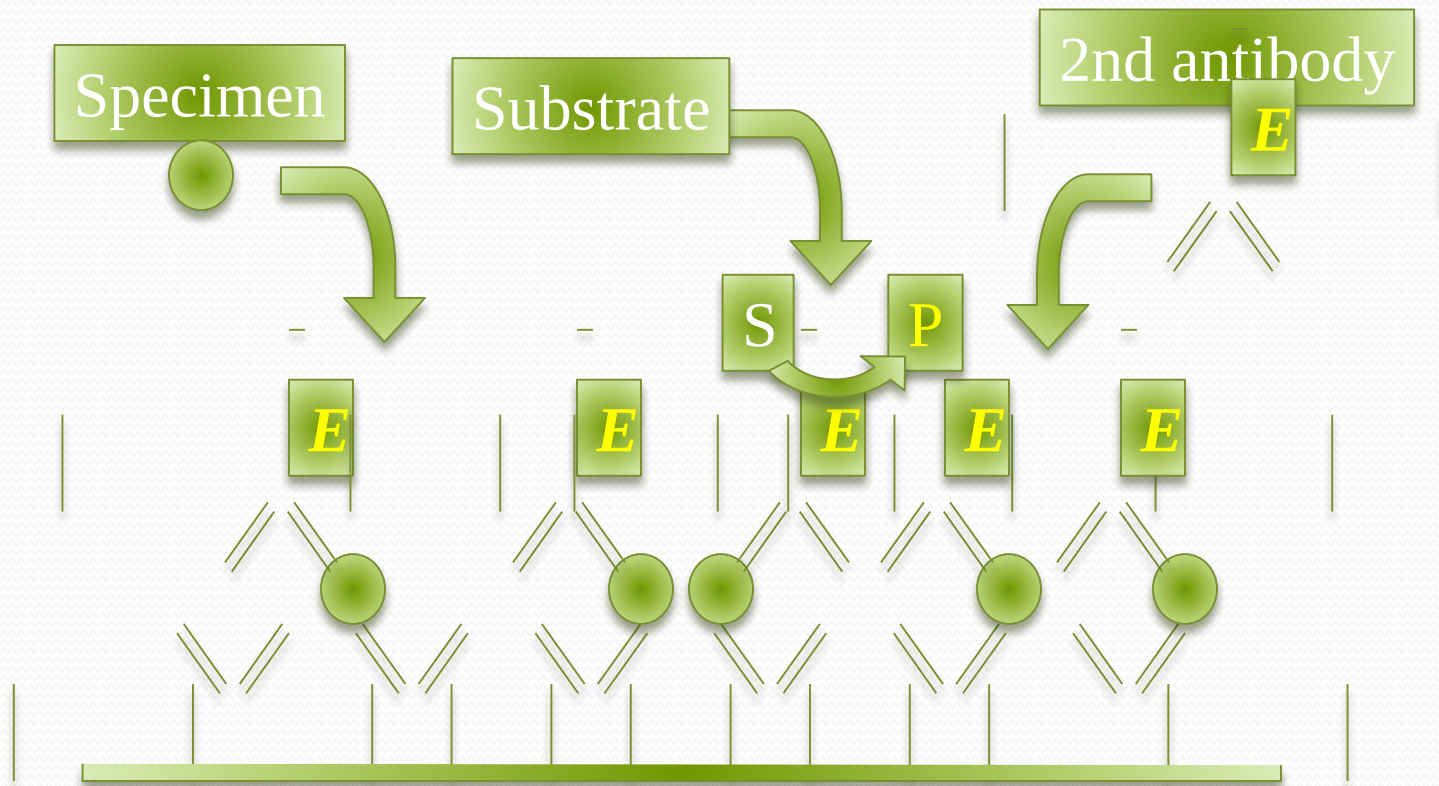


Addition of antibody specific to antigen



Addition of species specific, enzyme labeled antibody

Two-site “sandwich” enzyme immunoassay



Antibody capture

- (ب) روش Antibody capture

- Ag sandwich or direct Ab capture-1

- این روش برای تعیین سنجش آنتی بادی مورد استفاده قرار می گیرد بدین صورت که از يك آنتی ژن کوت شده بر روی فاز جامد برای به دام انداختن آنتی بادی اختصاصی آن استفاده می شود و همان آنتی بادی از طریق بازوی دیگر خود (Fab) پذیرای همان آنتی ژن اما به صورت نشان دار می باشد در نتیجه **آنتی بادی اختصاصی در بین 2 آنتی ژن ساندویچ می گردد**. در این روش آنتی بادی توتال از هر کلاس ایمونوگلوبولین میسر است و **یکی از اختصاصی ترین و حساس ترین روش ها برای تشخیص آنتی بادی در نمونه است** مثال بارز این روش کیت اندازه گیری آنتی بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس و تریپونماپالیدوم و HBs Ab می باشد.

- Indirect Ag Sandwich or Indirect Ab capture-2

- در این روش پس از به دام انداختن آنتی بادی توسط آنتی هیومن گلوبولین کوت شده در کف چاهك ها با اضافه کردن آنتی ژن اختصاصی و تشکیل کمپلکس از يك آنتی بادی اختصاصی نشان دار بر علیه آنتی ژن به عنوان سیستم شناساگر استفاده می شود.

الایزا رقابتی و مهارى

Elisa Competetive & Blocking

Elisa Competetive الایزا رقابتی :

اگر هردو آنالیت یا آنتی بادی نشاندار و غیر نشاندار با هم (همزمان) به محیط اضافه شوند روش الایزا رقابتی نامیده می شود

Elisa Blocking الایزا مهارى :

ابتدا آنالیت یا آنتی بادی غیر نشاندار (نمونه بیمار) اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون (با شستشو یا بدون شستشو) در مرحله بعدی آنالیت یا آنتی بادی نشاندار اضافه می گردد

Competitive ELISA

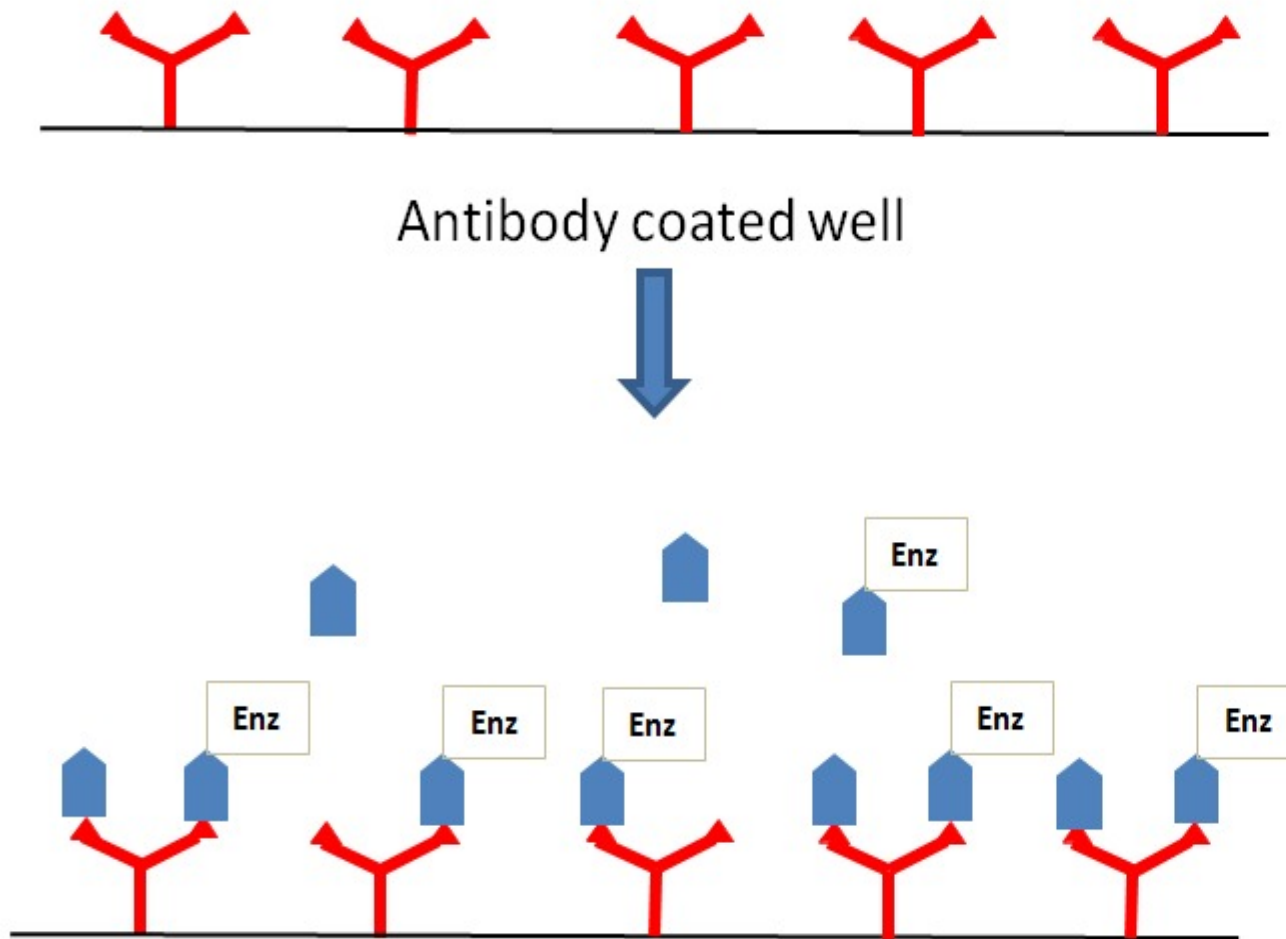


Figure 2:

الایزای رقابتی یا مهاري

- در روشهاي رقابتي اساس سنجش بر رقابت دو آنتي ژن يا دو آنتي بادي (که يکي از آن دو نشاندار است) براي اتصال به ليگاند با مقدار محدود استوار است. اگر هر دو آناليت نشاندار و غير نشاندار با هم به سيستم اضافه شوند روش را رقابتي مي نامند ولي چنانچه ابتدا آناليت اضافه شده و پس از يك دوره انکوباسيون آناليت نشاندار اضافه گردد روش را مهاري يا بلاکينگ مي نامند.
- در روش مهاري ممکن است در بين 2 مرحله و قبل از اضافه نمودن آناليت بعدي شستشو انجام شود يا انجام نشود مثال بارز روشهاي رقابتي و مهاري سنجش T,3T4 مي باشد.
- انواع روشهاي رقابتي عبارتند از:

الایزای رقابتی یا مهاري

الف) روش رقابتي يا مهاري براي آنتي ژن:

- اساس این روش بر رقابت بین آنتي ژن نشاندار و آنتي ژن موجود در نمونه برای اتصال به يك آنتي بادي اختصاصي كوت شده در چاهك استوار است. در این روش مقدار آنتي بادي كوت شده باید محدود باشد و ملكول سيگنال دهنده همان آنتي ژن نشاندار است، اساس RIA و EIA كلاسيك به همین روش استوار است.
- در این روش منحنی پاسخ- دوز به صورت معكوس خواهد بود، بدین معني كه آنالیت نشاندار در حضور مقادير زيادي از آنالیت غير نشاندار موجود در نمونه به مقدار كم تري به آنتي بادي متصل مي شود و در نتیجه سيگنال هم بوجود خواهد آمد.
- محدوده تعیین آنالیت با این روش ممكن است بوسیله استفاده از مولكول نشاندار با فعالیت اختصاصي زياد تقویت شود اما حداقل مقدار قابل تشخیص (كمترین مقدار از آنالیت كه قابل تشخیص خواهد بود) توسط تمایل آنتي بادي مورد استفاده تعیین مي شود، با این وجود غلظتهای خیلی كم از هاپتن ها عموما توسط همین روش قابل تعیین اند و حساس ترین روشي است كه مي تواند مقدار کمتر fmol را هم تشخیص دهد.
- در برخی از موارد نشاندار كردن روي خصوصیات هاپتن اثر مي گذارد در نتیجه در روش رقابتي براي تعیین آنتي ژن از يك آنتي بادي نشاندار استفاد مي شود، در این نوع از سنجش ها این مطلب ضروري است كه فاز جامد توسط آنتي ژن با مقدار كم و ثابت پوشیده مي شود، در این روش آنالیت موجود در نمونه با آنالیت كوت شده در چاهك براي اتصال به آنتي بادي نشاندار رقابت مي كند. در اینجا هم منحنی استاندارد معكوس است، از این روش بیشتر براي سنجش به روش كمی لومینسانس استفاده مي شود.

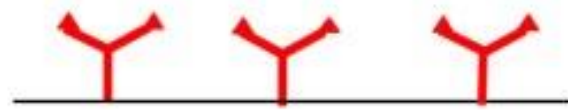
الایزای رقابتی یا مهارى

- (ب) روش رقابتی برای آنتی بادی:
- در این روش رقابت بین دو آنتی بادی یکی در نمونه به صورت غیر نشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برا اتصال به یکی آنتی ژن کوت شده در چاهك صورت می پذیرد, بدیهي است که هر چه مقدار آنتی بادی نمونه بیشتر باشد آنتی بادی نشاندار کمتری به چاهکها متصل شده و سیگنال نیز کمتر خواهد بود و در نتیجه منحنی استاندارد نیز معکوس می باشد, شاخص ترین مثال این روش اندازه گیری آنتی بادی بر ضد HBc & HBc Ab است

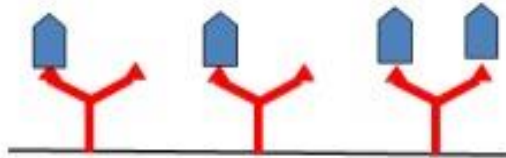
- **Single Antibody Two Plate ELISA Format**

- A single antibody ELISA format is considered when there is only one antibody available that recognizes the analyte ([Figure 4](#)). The assay is configured using the same antibody as both capture and detection. The antibody is biotinylated for use as the detection antibody. The method also utilizes two plates. The basic concept is to capture the antibody to an ELISA plate and allow the analyte of interest to bind to the capture antibody. Unbound material is removed by washing the plate and then adding an acid solution to elute the analyte from the capture antibody. The eluted analyte is then transferred to another ELISA plate containing the neutralization solution. The eluted analyte is then allowed to bind to the second ELISA plate. The unbound material is removed and the plate is blocked followed by a wash step. The detection antibody, which is biotinylated, is then added to the plate, followed by an incubation period. Another wash step is performed to remove excess detection antibody, followed by addition of a streptavidin reporter. The last wash step is performed to remove the excess reporter, followed by addition of the substrate. Below is a generic protocol that can be used to set up a Single Antibody Two Plate ELISA Method.

Single Antibody Two Plate ELISA



Antibody coated well



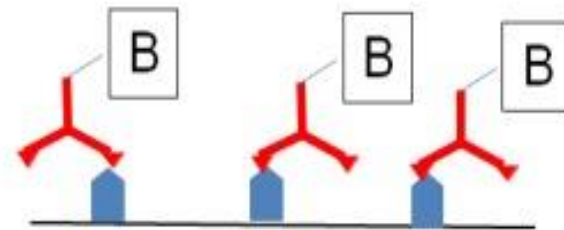
Addition of analyte



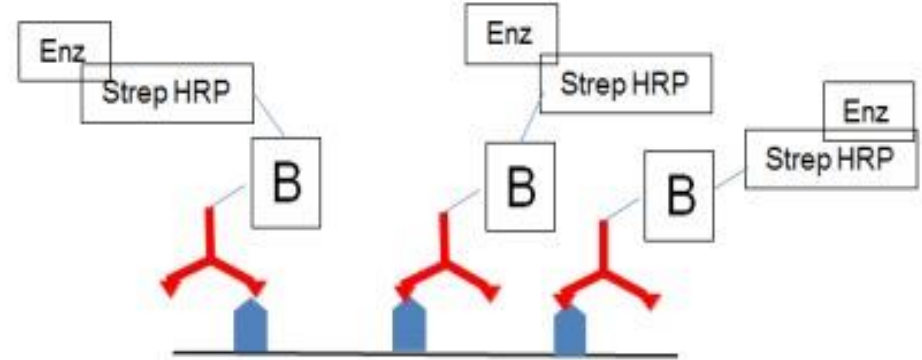
Acid Elute



Neutralize and bind antigen to well



Addition of biotinylated antibody



Addition of enzyme conjugated antibody

(DIRECT ELISA) الایزای مستقیم

- در این روش آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه ی که باید تشخیص داده شود به طور مستقیم بر سطح فاز جامد کوت می شود و سپس آنتی بادی یا آنتی ژن مکمل آن که نشان دار شده است به سیستم اضافه میشود. در صورت وجود آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر در نمونه ی سیگنال مناسب ایجاد می شود.
- این روش مشابه ایمونوفلورسانس مستقیم است اما کاربرد چندانی در کیت های تشخیصی ندارد و بیشتر در کارهای تحقیقاتی استفاده می شود

(indirect ELISA) الایزای غیر مستقیم

این روش برای تعیین آنتی بادی اختصاصی و یا تیتراسیون آنتی بادی در نمونه های سرم مورد استفاده قرار می گیرد.

اساس آزمایش بدین نحو است که معمولاً سرم رقیق شده به آنتی ژن های کوت شده در فاز جامد (میکرو ول یا چاهك) اضافه می شود. آنتی ژن کوت شده آنتی ژت اختصاصی مربوط به آنتی بادی است که قرار است در نمونه ردیابی شود پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و يك مرحله ي شستشو **آنتی هیومن گلوبولین نشان دار شده با آنزیم** به چاهك اضافه می

شود بر حسب اینکه چه کلاسی از آنتی بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع مورد استفاده نیز متفاوت است مثلاً برای ردیابی آنتی بادی کلاس Ig آنتی IgA از آنتی هیومن IgA و برای ردیابی کلاس IgG از آنتی هیومن IgG استفاده می شود.

Antibody capture ELISA

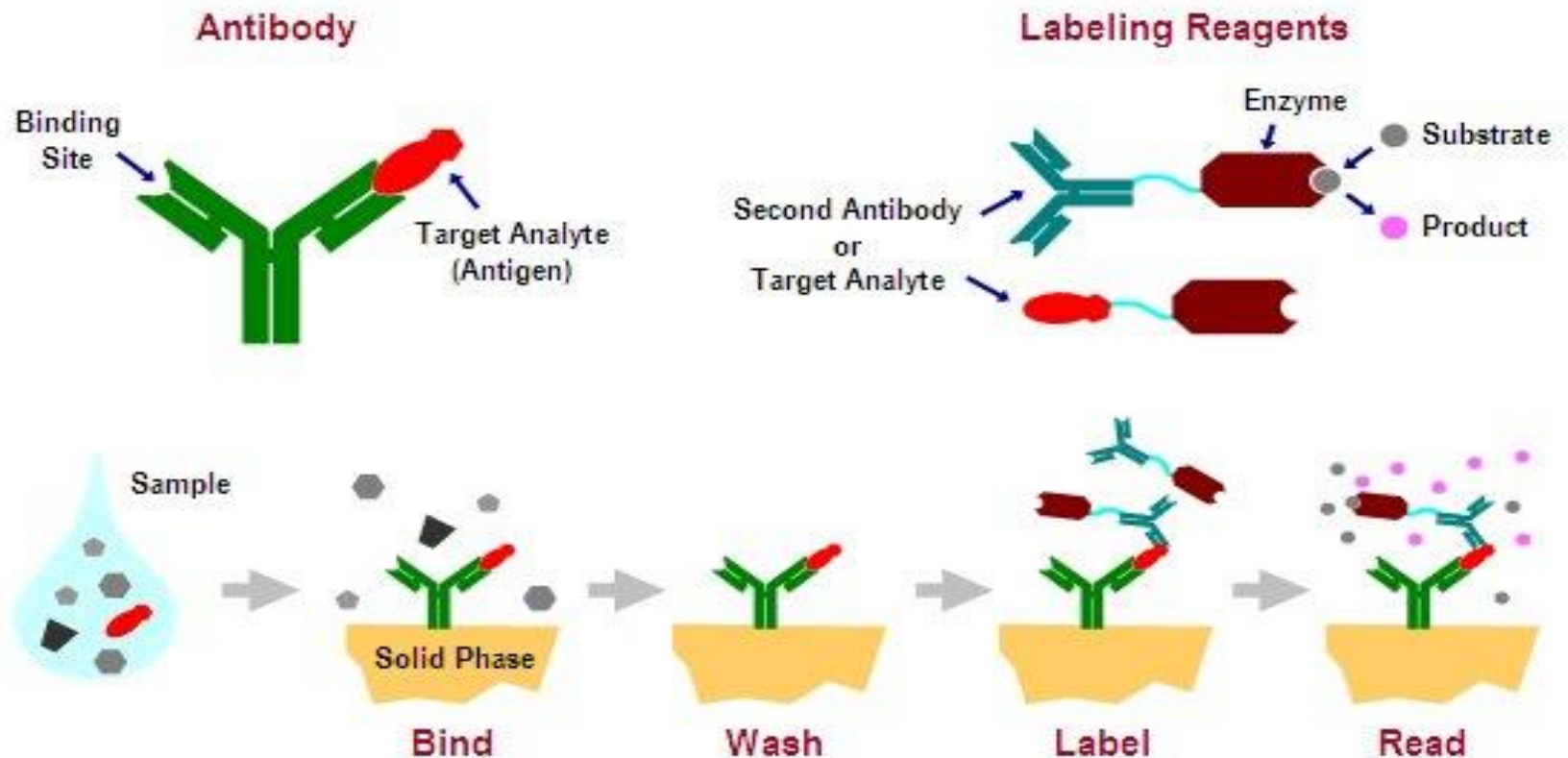
- اختصاصیت سنجش مستقیماً توسط آنتی ژن کوت شده در فاز جامد تعیین می شود که ممکن است کاملاً خالص و اختصاصی باشد و یا نسبتاً خام و غیر اختصاصی باشد. سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی می تواند در یک بافر برای جلوگیری از جذب غیر اختصاصی پروتئین ها و جلوگیری از اشغال نقاط اتصال آنتی ژن رقیق شود. به چنین بافري محلول رقیق کننده نمونه sample diluent گفته می شود.
- حساسیت و ویژگی چنین روشهایی می تواند با به کار گیری روش **Antibody capture** با کاهش تداخل اثر آنتی بادی غیر اختصاصی بهتر شود.
- بهترین مثالها در مورد این روش تعیین آنتی بادی بر علیه توکسوپلازما، روبلا، ویروس سیتومگال و هلیکوباکتریلوری از کلاسهای IgM و IgA و IgG در سرم می باشد. البته امروزه برای تعیین IgM بر علیه این عوامل عموماً از روش capture استفاده می شود در روش capture آنتی بادی های موجود در نمونه از کلاس IgM به روی چاهک های کد شده با آنتی هیومن IgM جذب شده و سپس برای تشخیص، از آنتی ژن اختصاصی مربوطه که آنزیم نشان دار شده اسنت و یا آنتی بادی نشان دار ضد آن به صورت مزدوج استفاده می شود.

ELISA TROUBLESHOOTING

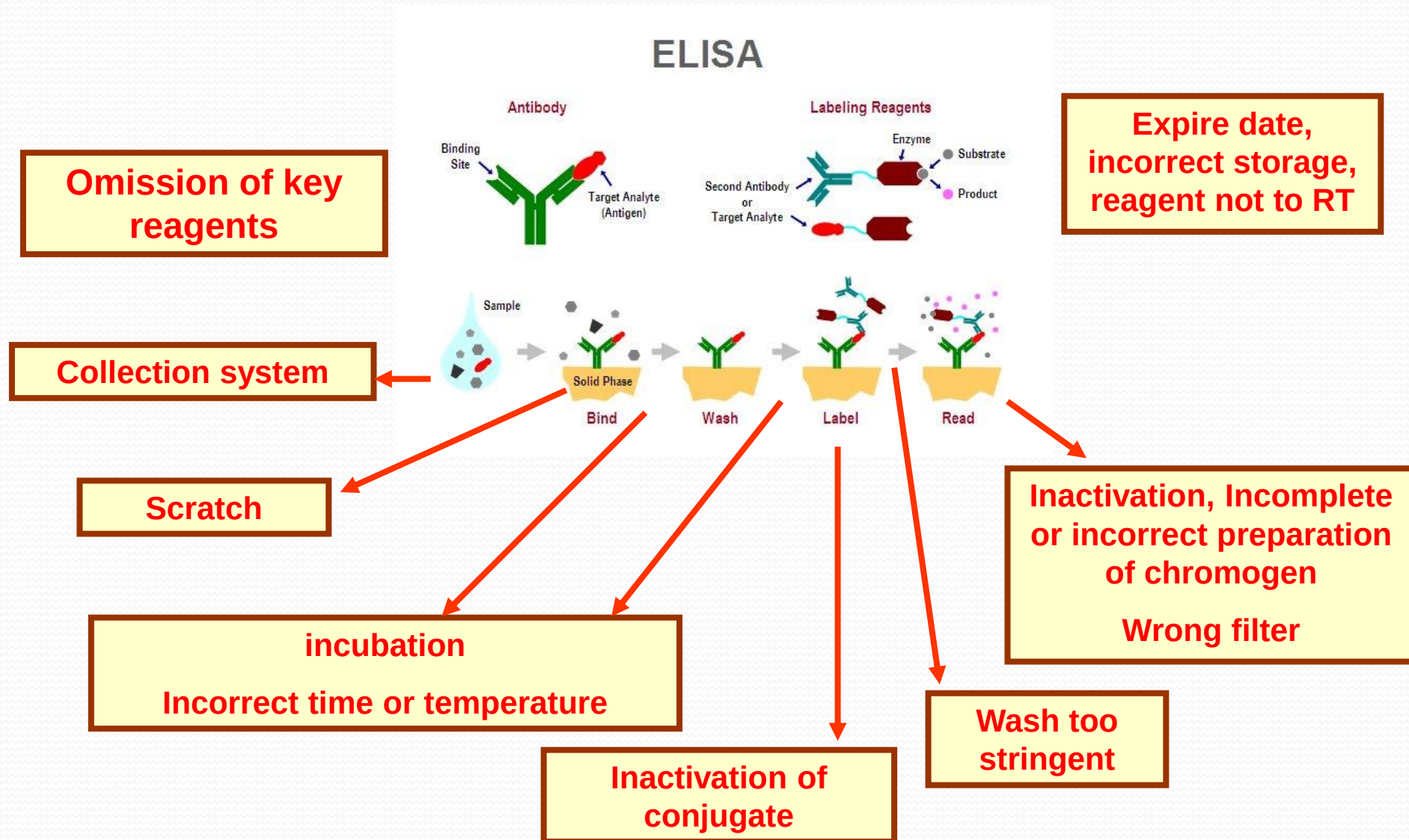
- **No Signal or Weak Signal**
- **High Background**
- **Poor Duplicate**
- **Poor Standard Curve**
- **Poor Linearity**
- **Poor Assay Sensitivity**
- **Poor Correlation**
- **Unexpected Clinical Classification**
- **Apparent Shift in Reference Interval**

ELISA Stage

ELISA



No Signal or Weak Signal



No Signal or Weak Signal

1- حذف یکی از معرف های کلیدی نظیر کنژوکه در روش اجرایی کار منجر به سیگنال منفی (عدم واکنش) می گردد

افت تیترا کنژوکه غیر فعال شدن کنژوکه (یا کاهش اثر ترکیب سوبسترا و کروموژن که معمولاً به دلیل آلودگی معرف ها یا در انتهای مصرف هر کیت (در مراکزی که تعداد نمونه کم بوده و کیت مکرراً و در چندین نوبت مورد استفاده قرار می گیرد)

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

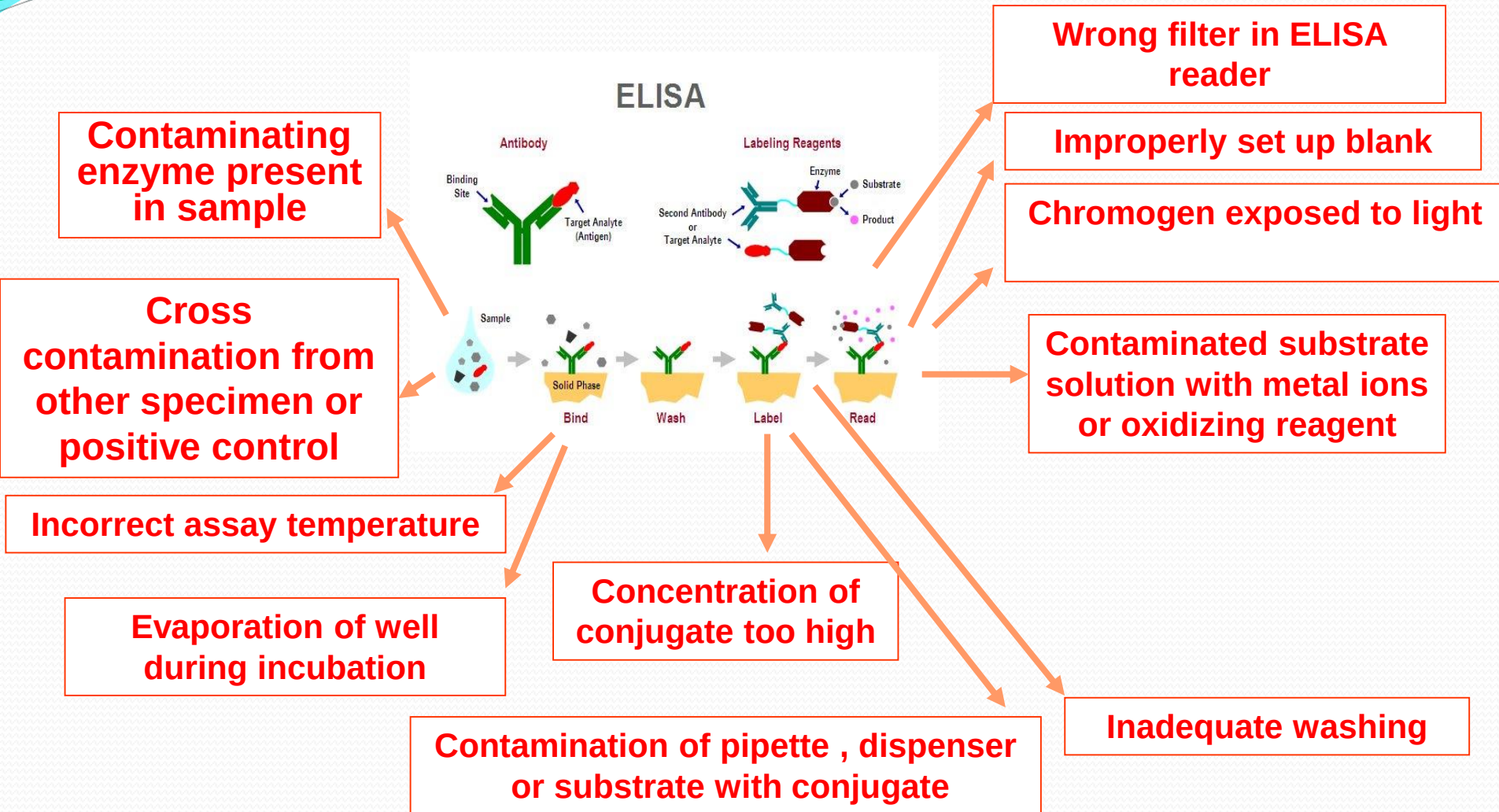
3- خراش در کف پلیت ها می تواند منجر به کاهش سیگنال شود

4- کاهش زمان انکوباسیون یا دمای انکوباسیون بر خلاف دستور العمل کیت منجر به کاهش سیگنال می گردد که به دلیل کاهش تعداد ترکیب های اتصالی نهایی می باشد

No Signal or Weak Signal

- 5- شستشو بیش از تعداد دفعات تعریف شده و یا استفاده از بافر با پ هاش نامناسب یا دچار آلودگی باکتریال و قارچی منجر به دفع واکنش های اختصاصی ایمن کمپلکس و نهایتا افت و کاهش سیگنال یا رنگ نهائی می گردد
- 6- کاربرد فیلتر نامناسب در الایزا منجر به کاهش سیگنال می گردد
- 7- شروع انجام تست الایزا بدون انتظار جهت به دمای اطاق رساندن معرف ها و پلیت های کیت الایزا از جمله عوامل شایع افت سیگنال و کاهش رنگ می باشد
- 8- حرارت پائین محیط کار بخش الایزا (خراب بودن سیستم گرمایش آزمایشگاه) منجر به افت سیگنال و رنگ دهی واکنش و بسته به واکنش غیر رقابتی یا رقابتی منجر به افت یا افزایش کاذب مقادیر تست ها می گردد (خصوصا در شرایط که تست ها بدون استاندارد همزمان خوانده شوند)

HIGH BACKGROUND



HIGH BACKGROUND

1- آلودگی چاهک به چاهک نمونه بیماران به دلیل مجاورت با کنترل مثبت یا استاندارد یا نمونه مثبت مجاور

2- افزایش زمان انکوباسیون یا دمای انکوباسیون بر خلاف دستور العمل کیت منجر به افزایش سیگنال می گردد که به دلیل افزایش تعداد ترکیب های اتصال نهائی می باشد

3- شستشو کمتر از تعداد دفعات تعریف شده و یا استفاده از بافر با pH هاش نامناسب یا دچار آلودگی باکتریال و قارچی منجر به عدم دفع واکنش های غیر اختصاصی و نهایتا افزایش سیگنال یا رنگ نهائی می گردد

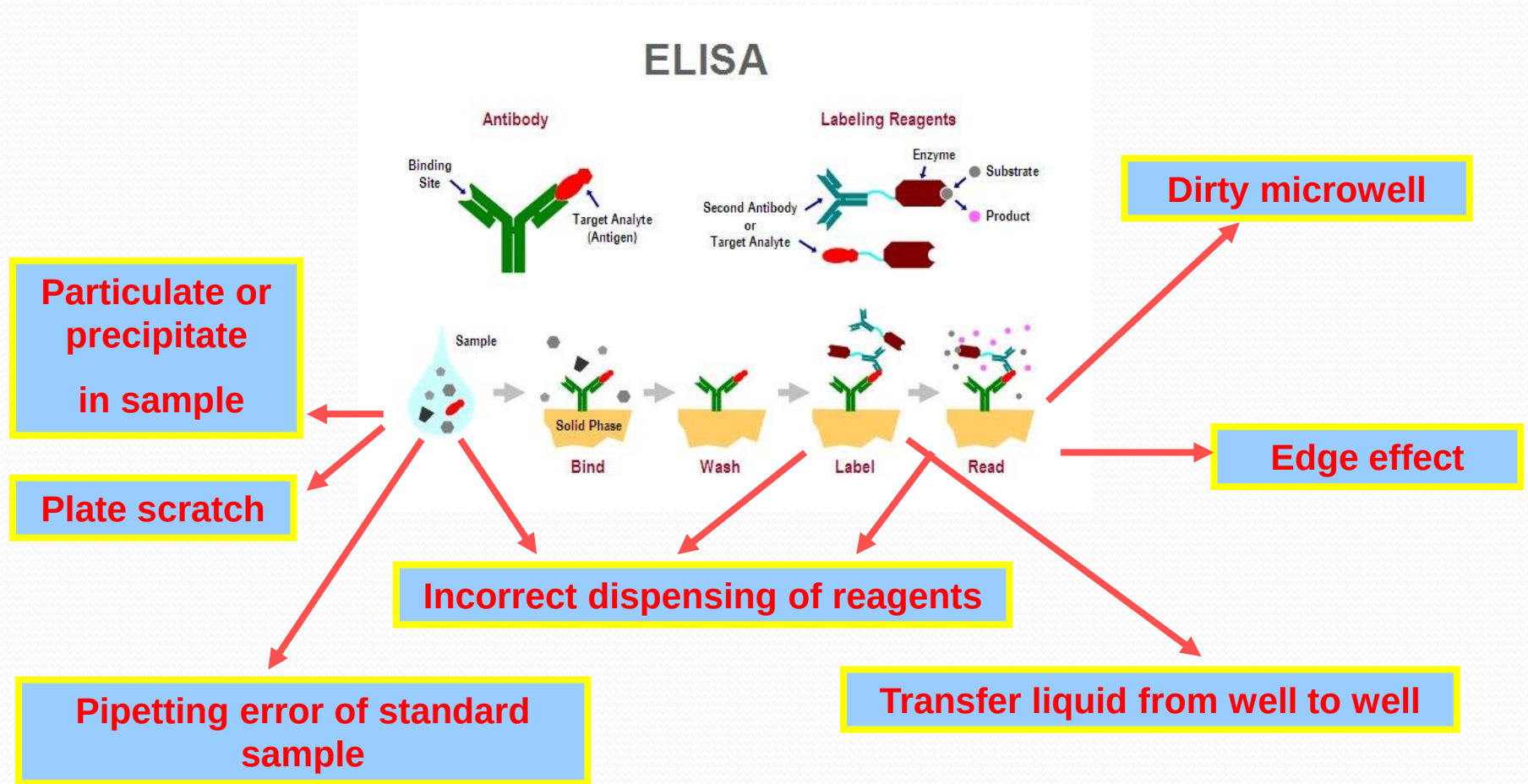
4- کاربرد فیلتر نامناسب در الیزا منجر به افزایش سیگنال می گردد

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

HIGH BACKGROUND

- 6-** افزایش غلظت و تیتراژ کنژوگه کیت الایزا به دلیل تبخیر یا تغلیظ (باز ماندن درب ظرف کنژوگه به مدت طولانی در حرارت اطاق در چند نوبت مکرر) یا اشتباه کارخانه سازنده در تعیین تیتراژ مناسب
- 7-** تبخیر و تغلیظ نمونه های استاندارد کیت به دلیل باز ماندن طولانی درب ویال استاندارد ها در چند نوبت مکرر
- 8-** آلودگی پیت و دیسپنسر مورد استفاده برای سوبسترا با معرف کنژوگه / عمدتاً به دلیل اشتباه پرسنلی و استفاده مشترک از یک پیت است
- 9-** آلودگی سوبسترا به یون های فلزی و اکسیدان ها یا مجاورت با نور که منجر به تشکیل رنگ زمینه ای آبی پررنگ (پس از اختلاط سوبسترا و کروموژن) قبل از مجاورت با پلیت می گردد (جهت سوبسترا و کروموژن تیمیدین متیلن بلو)

Poor Duplicate

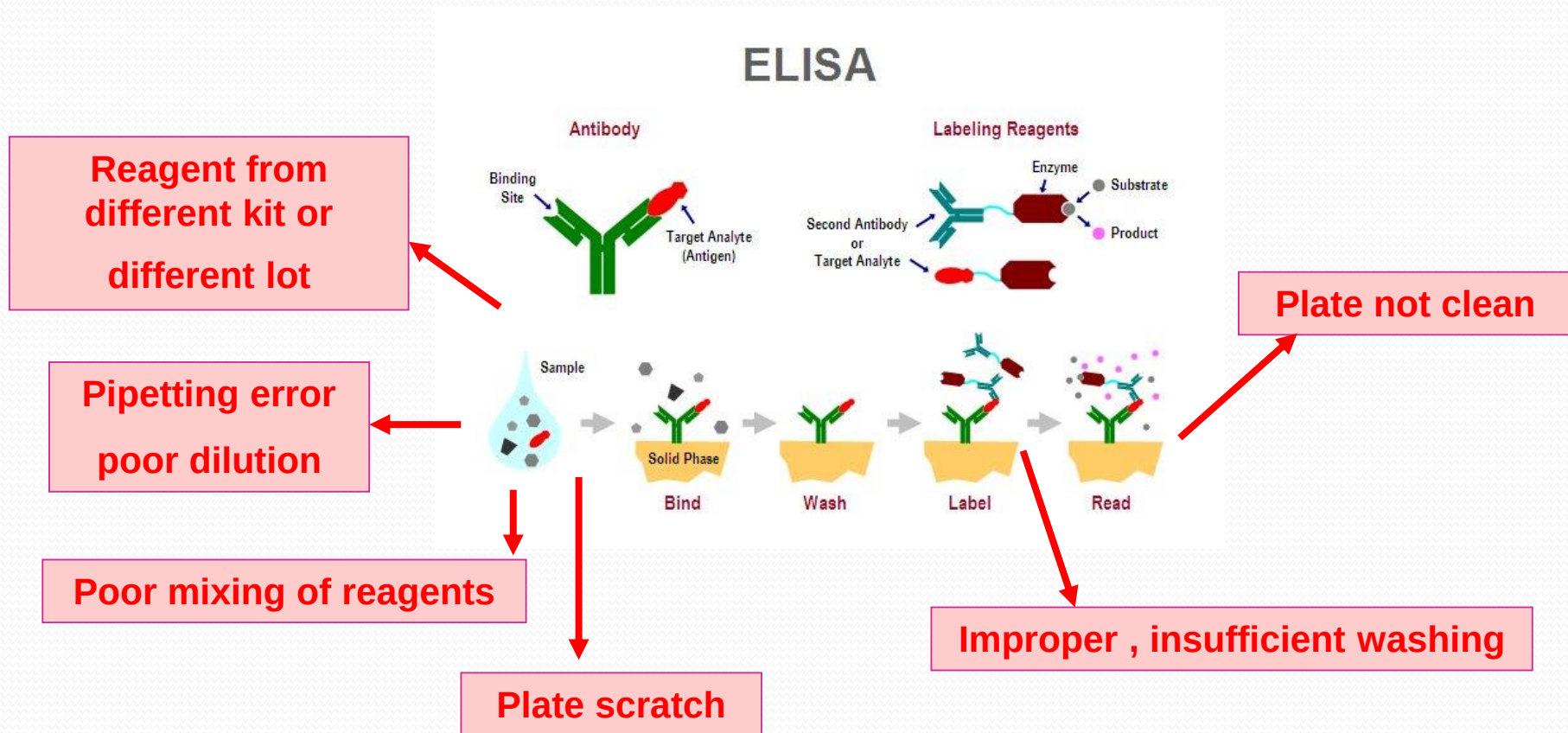


Poor Duplicate

نمونه مضاعف ضعیف (بدون هم خوانی)

- 1- نمونه خوب میکس نشده (نمونه خارج شده از فریزر و دارای شیب غلظتی و رسوب)
- 2- خراش زیر پلیت
- 3- دیسپنسینگ نادرست نمونه یا معرف ها در پلیت
- 4- اثر لبه ای
- 5- چاهک آلوده یا بی اثر
- 6- آلودگی چاهک به چاهک

Poor Standard Curve



Poor Standard Curve

- 1- استفاده از معرف یا استاندارد یک کیت دیگر خصوصا با سری ساخت متفاوت
- 2- خطا در حین آماده سازی استاندارد ها ناشی از پیپتینگ نامناسب و ...
- 3- اختلاط نامناسب استاندارد ها
- 4- خراش و کدورت کف پلیت ها در ناحیه استاندارد ها
- 5- کف پلیت کثیف و تمیز نشده
- 6- شستشوی نادرست یا ناکافی

ویژگی های منحنی استاندارد یا کالیبراسیون

Calibration curve or Dose Response Curve

منحنی استاندارد چون رابطه بین دوز آنالیت و پاسخ (جذب نوری یا سیگنال حاصل) را بیان می نماید به عنوان منحنی دوز - پاسخ نیز نامیده می شود

در شرایط ایده آل منحنی کالیبراسیون یا استاندارد بایستی یکنواخت (منو تونیک) باشد یا به عبارتی منحنی تغییر جهت نداشته باشد (فاقد قله یا دره در میانه منحنی باشد)

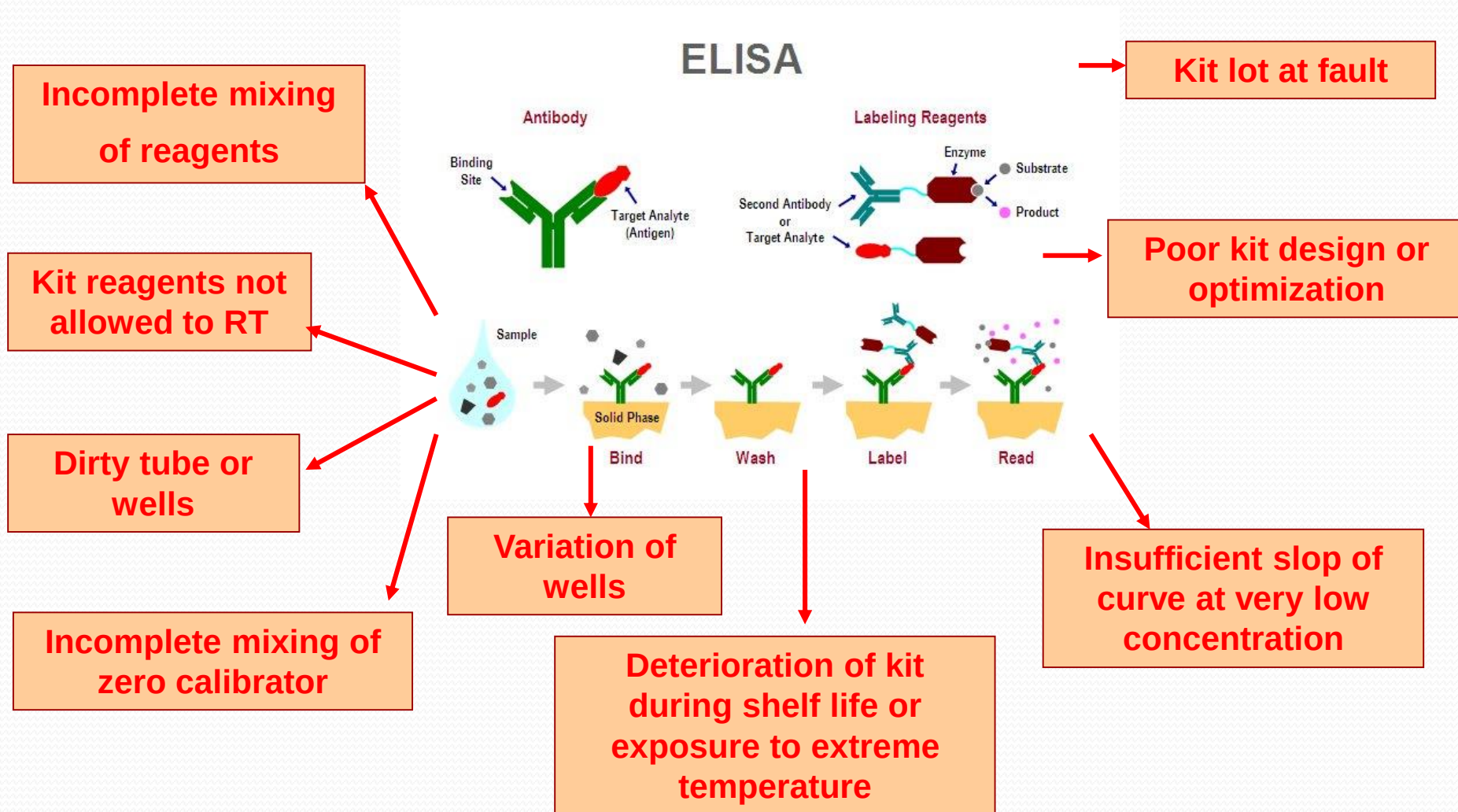
منحنی های استاندارد در دو نوع کلی طبقه بندی می گردند:

1- منحنی شیب مثبت : رابطه دوز و پاسخ (سیگنال) مستقیم است

2- منحنی شیب منفی : رابطه دوز و پاسخ (سیگنال) غیرمستقیم است

افزایش تعداد استاندارد ها یا کالیبراتورها منجر به افزایش صحت و کاهش بایاس منحنی کالیبراسیون می گردد

Poor Assay Sensitivity

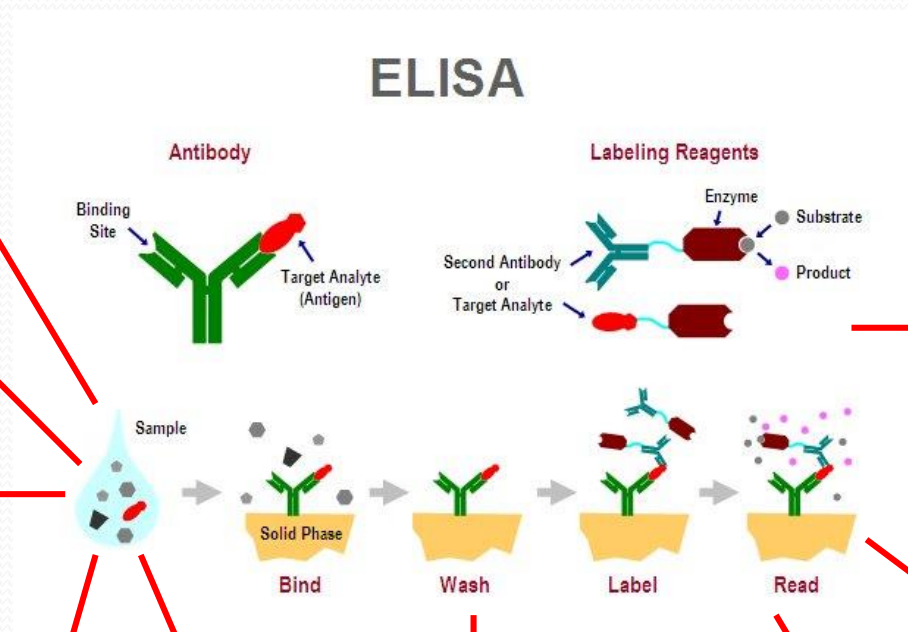


Poor Assay Sensitivity

حساسیت ضعیف سنجش

- 1- میکسینگ ناقص رازنت ها و نمونه ها
- 2- به حرارت اطاق نرساندن کیت های الایزا قبل از مصرف
- 3- عدم استفاده از کالیبراتور صفر در تست یا اختلاط ناقص کالیبراتور صفر
- 4- تفاوت و تنوع در چاهک ها
- 5- آلودگی لوله ها به دترژان و..
- 6- فساد معرف ها و پلیت کیت الایزا قبل از تاریخ انقضا به دلیل حرارت نامناسب محیطی و استفاده مکرر
- 7- شیب ناکافی منحنی استاندارد در غلظت های پائین
- 8- نقص در سری ساخت کیت

Poor Correlation Between Two Kits



**Incorrect
Standardization of Kit**

**Instability of
reference
standard**

**Used of old
samples**

Kit lot at fault

**Use of different
units or
international
standard**

Equipment fault

**Curve fit bias with
either or both kits**

**Limited range of
concentration used**

**Limited number of patient
sample used for study**

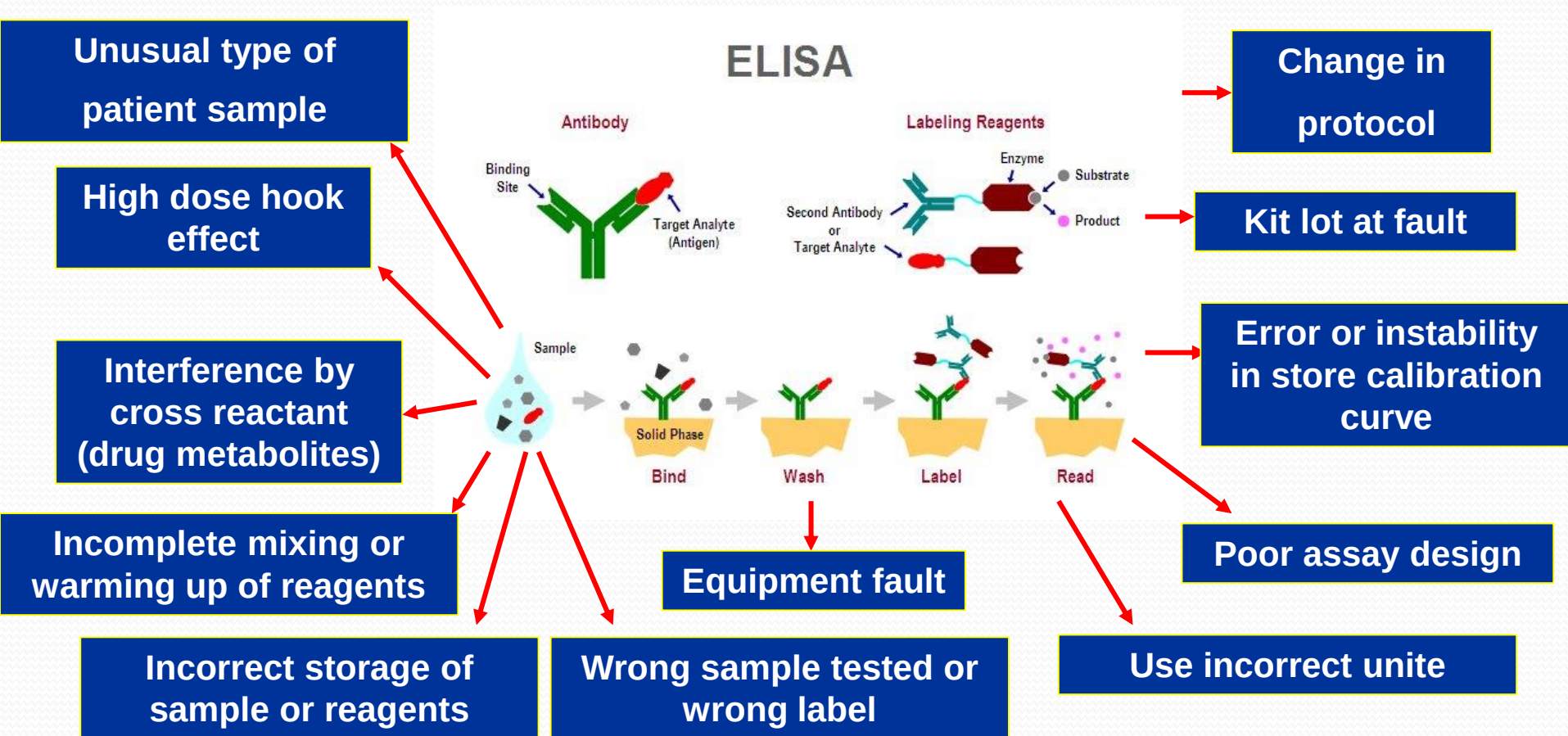
**Only one or two assay
performed**

Poor Correlation Between Two Kits

همبستگی پائین نتایج دو کیت

- 1- استفاده از کیت غیر استاندارد
- 2- ناپایداری استاندارد های مرجع
- 3- رنج محدود استاندارد ها در کیت الایزا
- 4- استفاده از تجهیزات متفاوت و غیر کالیبر
- 5- تعداد محدود نمونه بیماران در مطالعه مقایسه ای دو روش به نوان مثال در بررسی مقایسه ای دو کیت یا دو روش برای یک تست بایستی حداقل 10 نمونه در سه سطح غلظتی متفاوت مورد ارزیابی قرار گیرد تا اختلاف معنی دار حاصل قابل ارزیابی باشد
- 6- انجام یک با رتست روی هر نمونه بیمار / بهتر است هر نمونه حداقل دو تا سه بار انجام شود و میانگین آن مورد استناد قرار گیرد
- 7- استفاده از دو نوع واحد استاندارد بین المللی در گزارش نتایج
- 8- نقص در سری ساخت کیت

Unexpected or Inconsistent Clinical Classification

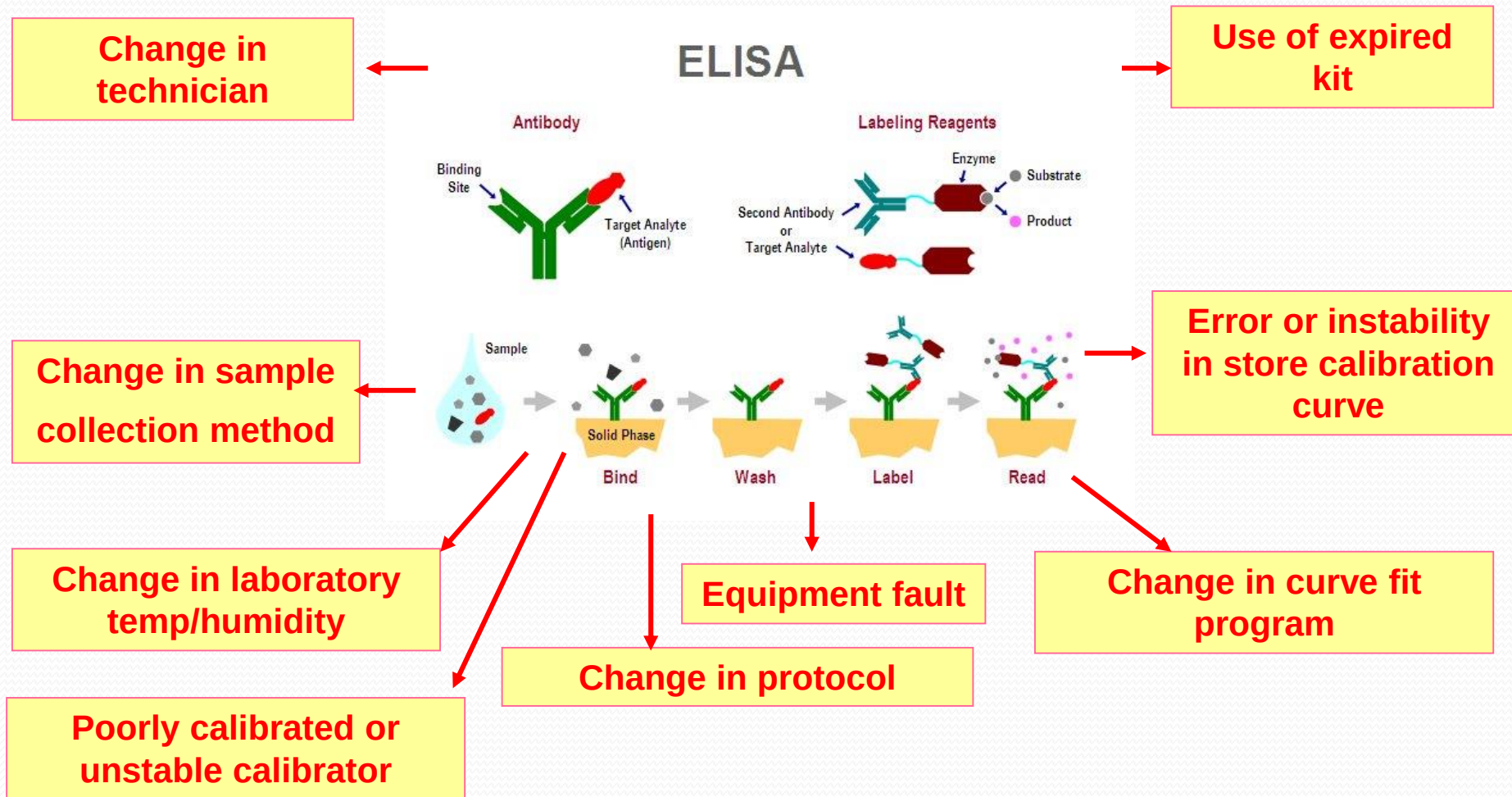


Unexpected or Inconsistent Clinical Classification

عدم انطباق نتایج کیت با انتظارات بالینی

- 1- استفاده از نمونه نادرست و غیر معمول بیمار (غیر ناشتا / همولیز القائی / لیپمیک و آلوده ...)
- 2- اثر قلبی با دوز بالا مثل بتا ساب یونیت / فریتین / پرولاکتین
- 3- تداخل تست الایزا با متابولیت های دارویی و غیر دارویی / ویژگی پائین کیت
- 4- اختلاط ناکافی نمونه و رازنت ها / گرم کردن نامناسب کیت
- 5- ذخیره سازی نامناسب نمونه بیمار
- 6- خطا در تجهیزات
- 7- واحد نادرست تست
- 8- ناپایداری منحنی استاندارد ذخیره
- 9- نقص در سری ساخت کیت
- 10- اشتباهات و خطا های پرسنلی (راندوم مثل جابجا ریختن نمونه دو بیمار یا کم وزیاد ریختن نمونه یا معرف در یک چاهک / سیستماتیک مثل کم یا زیاد شستن پلیت ها / عادت به خواندن توام با تاخیر پلیت ها / سرعت پائین دست پرسنل در زمان ریختن یا برداشتن نمونه و معرف ها

Apparent Shift in Reference Interval



جابجائی آشکار نتایج در محدوده مرجع

- 1- تعویض تکنسین
- 2- تغییر عمده در روش جمع آوری نمونه
- 3- تغییر عمده در حرارت و میزان رطوبت آزمایشگاه
- 4- کالیبراتور ناپایدار
- 5- عدم اطلاع تکنسین از تغییر روش کار متد الایزا
- 6- کاربرد منحنی کالیبراسیون ذخیره
- 7- نقص در تجهیزات نظیر الیزا ریدر
- 8- کیت تاریخ گذشته

ALL WELL YELLOW

- Contaminated substrate
- Contaminated stop solution
- Incorrect dilution
- Inefficient washing

ALL WELL CLEAR

- **ELISA not performed correctly**
- **Contaminated conjugate**
- **Incorrect storage of kit**
- **Over washing of plate**

منابع خطا شایع در روش آنزیم ایمونو اسی

- 1- حداکثر زمان مجاز جهت نگاه داری خون کامل جدا نشده در 37 درجه 5 دقیقه می باشد (زمان طولانی تر علاوه بر تخریب ساختار پروتئینی برخی هورمون ها و انالیت های حساس منجر به آزاد سازی برخی فاکتور های سرمی در محیط شده که منجر به افزایش کاذب جذب می گردد**
- 2- نمونه حتی الامکان نبایست همولیز / لیپمیک یا ایکتریک باشد دلیل ان تداخل رنگ اضافی در واکنش رنگ سنجی الایزا ریدر است**
- 3- نمونه های هورمون یا سایر انالیت ها حداکثر تا 48 ساعت بدون شرایط انجماد در یخچال 2 الی 8 درجه قابل نگاه داری است و در زمان های بالای 48 ساعت بهتر است در 20 - فریز و نگاه داری گردد**
- 4- ذوب و فریز مکرر نمونه منجر به کاهش سطح هورمون های سرم خصوصا هورمون های تیروئیدی می گردد لذا بهتر است اگر نمونه سرم در چند ردیف کاری نیاز به ذوب دارد در چند ویال فریز و در هر نوبت یک ویال دفریز گردد در ضمن نمونه سرم که از فریزر خارج می گردد به دلیل شیب غلظتی که در ته لوله حاصل شده است بایستی به خوبی قبل از استفاده میکس گردد و به حرارت اطاق رسانده شود .**

منابع خطا شایع در روش آنزیم ایمونو اسی

5- اجزا کیت پس از خروج از یخچال الزاما بایستی به حرارت اطاق و تعادل دمائی با محیط برسد. دمای پایین با کاهش سرعت واکنش آنزیمی منجر به ایجاد جذب های غیر یکنواخت خصوصا در استریپ های ابتدائی پلیت می گردد

6- رطوبت محیط کار ایمونو اسی بایستی کمتر از 70% درصد باشد

7- اسیدی یا قلیائی شدن بافر (به دلیل الودگی قارچی یا باکتریال) منجر به افزایش یا کاهش کاذب جذب می گردد و پ هاش اپتیمال پروسه فعالیت آنزیمی را از بین می برد لذا تهیه تازه به تازه بافر مورد نیاز در هر ردیف کاری قابل توصیه می باشد .

8- دمای محیط آزمایشگاه بایستی 20 تا 25 درجه باشد و با دماسنج دقیق روزانه کنترل و ثبت گردد . دمای بالا محیط افزایش کاذب جذب و بالعکس حاصل می نماید

منابع خطا شایع در روش آنزیم ایمونو اسی

9- تغییرات دمائی مجاز انکوباتور 37 درجه $+2$ - درجه می باشد .

Edge effect اثر لبه ای

خطای ناشی از شوک حرارتی به پلیت در آنزیم ایمونو اسی می باشد که در قسمت مجاور درب انکوباتور 37 و در مجاورت پنجره ها بر روی میز کار هورمون شناسی ممکن است بر روی پلیت رخ داده و منجر به ایجاد جذب های غیر یکنواخت در استریپ های شوک خورده و سایر استریپ می گردد (شوک سرمائی یا گرمائی) لذا قابل توصیه می باشد پلیت ها در عمق انکوباتور قرار داده شود و میز کار هورمون در مجاور پنجره یا سیستم های سرمایش و گرمایش نباشد .

10- ایجاد حباب هوا در چاهک های پلیت مانع تماس کامل کنژوکه و سرم یا بروز جذب های غیر یکنواخت می گردد

منابع خطا شایع در روش آنزیم ایمنو نو اسی

- 11-** استفاده از پارافیلیم یا کاور چسبنده مناسب در سطح پلیت در هر مرحله از انکوباسیون الزامی بوده و مانع تبخیر و حضور گرد و غبار در محیط حساس واکنش آنزیمی می گردد . تبخیر معرف ها منجر به بروز افزایش کاذب جذب نوری می گردد .
- 12-** قرار دادن پلیت در تاریکی پس از اضافه نمودن سوبسترا و کروموژن الزامی است و مانع بروز واکنش جذب اضافی و کاذب می گردد
- 13-** کنترل معرف های کیت الیزا قبل از مصرف الزامی است که شامل : **(الف)** کنترل سلامت معرف سوبسترا و کروموژن با اختلاط حجم مساوی از کنژوکه و مخلوط سوبسترا و کروموژن در یک لوله نو جداگانه است که بایستی با تغییر رنگ سریع به رنگ آبی همراه باشد **(ب)** کنترل ماکروسکوپی معرف های کیت به لحاظ کودرت ناشی از الودگی قارچی یا باکتریال و یا حضور جسم خارجی در معرف ها الزامی است **(ج)** ظهور رنگ آبی در محلول کروموژن بی رنگ قبل از واکنش نهائی نشانه الودگی کروموژن به مواد اکسیدان و غیر قابل مصرف بودن آن می باشد
- 14-** تهیه محلول سوبسترا بیش از حد مورد نیاز و ماندن آن در محیط آزمایشگاه منجر به الودگی قارچی باکتریال معرف و بی اثر شدن معرف می گردد لذا محلول آماده به کار سوبسترا کروموژن بایستی حداکثر یک ساعت قبل از مصرف تهیه گردد و در تاریکی نگاه داری گردد .

منابع خطا شایع در روش انزیم ایمونو اسی

- 15-** ممانعت از تماس مستقیم دست با محلول کروموژن که حاوی حلال متانول و دی متیل سولفوکساید می باشد که سمیت داشته و دارای جذب پوستی می باشد
- 16-** میکس کردن آرام و زماندار کالیبراتور ها و نمونه ها قبل از شروع کار الزامی است
- 17-** با توجه به تغییر شرایط محیطی و پرسنلی در هر ردیف کاری استفاده از کالیبراتور ها در هر ردیف کاری الزامی است و استفاده از منحنی ذخیره شده در دستگاه صرفاً جهت موارد ضروری و در صورت عدم دسترسی به کالیبراتورهای کیت قابل توجه می باشد . استفاده از منحنی ذخیره کالیبراسیون از مهمترین منابع خطا های سیستماتیک در روش های ایمونو اسی می باشد .
- 18-** جابجائی لیبل ها در کالیبراتور در هنگام مونتاژ کیت ها امکان پذیر بوده و از علل مشاهده منحنی های غیر معتبر می باشد .
- 19-** در بوروشور کیت ها توصیه می گردد در اولین ردیف کاری استاندارد ها (کالیبراتور ها) دوپلیکیت (مضاعف) گذاشته شود تا ضریب دقت و صحت منحنی حاصل بالا برود
- 20-** در صورت عدم همخوانی کانال های سمپلر مولتی کانال (8 کاناله) یا رسوب نمک در یکی از شاخه های سمپلر مولتی کانال یا واشر احتمال بروز جذب های غیر یکنواخت در نمونه ها و استاندارد های مضاعف وجود دارد

منابع خطا شایع در روش آنزیم ایمنونواسی

soaking Time

21- زمان خیس خوردن : زمان خیس خوردن در فواصل شستشو بایست حداقل 20 و حداکثر 40 ثانیه باشد تا منجر به دفع اتصالات غیر اختصاصی از مجاور اتصالات اختصاصی گردد .

22- عدم تکان دادن پلیت (حداقل 20 ثانیه) پس از اضافه نمودن محلول اسیدی توقف دهنده واکنش منجر به عدم اختلاط کامل اسید با معرف ها و عدم توقف کامل واکنش آنزیمی و در نهایت پیشرفت واکنش آنزیمی در پایان کار و تغییر جذب نمونه ها و استاندارد ها و شیب منحنی کالیبراسیون در زمان های مختلف می گردد

23- با توجه به اینکه مسیر خوانش و عبور نور در میکرو پلیت الایزا از بالا به پایین است پاک نکردن کف پلیت قبل از خوانش نهائی با الایزاریدر منجر به ظهور جذب های غیر یکنواخت می گردد خصوصا الودگی کف پلیت به چربی سطحی پوست دست یا بافر سرریز شده و خشک شده یا الودگی سطح میز کار

24- فاکتور روماتوئیدی مثبت در بیمار منجر به بروز نتیجه مثبت کاذب در تست های الایزا میگردد لذا گرفتن شرح حال و انجام یک تست روماتوئید فاکتور در افراد مشکوک کمک کننده می باشد .

منابع خطا شایع در روش انزیم ایمنونواسی

Well to well contamination

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

Hook effect

26- اثر قلبی یا تله ای : همان پدیده پروزون در واکنش های ایمنونواسی می باشد که به دلیل غلظت بسیار بالا آنتی ژن بروز کرده و منجر به بروز جواب های منفی کاذب (بینابینی) می گردد **در خصوص تست های کمی بتا ساب یونیت / فریتین / الفا فتو پروتئین-125 CA -PSA -TSH/**

اثر قلبی یا تله ای به دلیل پرشدن کلیه آنتی ژن بایندینگ سایت های کنژوکه توسط آنتی ژن های فراوان موجود در محیط می باشد که به عبارتی با نوترالیزه کردن آنتی ژن مانع تماس آنتی ژن با آنتی بادی کف پلیت می گردد.

راه پیشگیری از اثر قلبی در کیت های الایزا :

1- اضافه نمودن یک مرحله شستشو قبل از افزودن آنتی بادی نهایی (ثانویه)

2- استفاده اولیه از رقت مناسب برای نمونه های سرم با استفاده از رقیق کننده خود کیت و در صورت عدم دسترسی استفاده از سرم افراد نرمال

منابع خطا شایع در روش آنزیم ایمونواسی

high back ground noise

- 26-** جذب زمینه ای بالا پلیت : زمانی که جذب بافر فسفات در چاهک (به تنهایی) بیش از 0.1 باشد (بایستی کمتر از 0.05 باشد) / در جذب زمینه ای بالا می توان با اضافه کردن یک تا دو نوبت شستشو اضافی این اثر زمینه ای را از بین برد / در صورتی که جذب کنترل منفی کیت بالا 0.2 باشد با مجاورت آن با سرم نرمال انسان (1%) میتوان سایت های غیر اختصاصی را حذف و جذب نموده تا جواب های مناسب بدست آوریم
- 27 -** تنظیم فیلتر دستگاه توسط فیلتر خاکستری (گری فیلتر) در سه طول موج پایین و متوسط و بالا توسط شرکت پشتیبان (شش ماهه یا سالانه) منجر به افزایش اعتماد به صحت طول موج های اندازه گیری در الایزا ریدر می گردد
- 28-** جهت کنترل تکرار پذیری فتومتر می توان از یک محلول رنگی یکنواخت و پایدار مثل دی کرومات پتاس در میکروپلیت استفاده نمود و دریافت جذب های یکنواخت نشانه سلامت سیستم نوری فتومتر است (در غیر این صورت جذب های غیر یکنواخت بدست می آید)

منابع خطا شایع در روش انزیم ایمنونواسی

29- DRIFT رانش در سنجش :

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

- 1- شایعترین علت دریافت یا رانش سنجش تعداد آزمایش بالا در یک ران یا ردیف کاری می باشد به نحوی که بین افزودن محلول ها فاصله زمانی طولانی وجود داشته باشد .
- 2- ناهمگونی بین چاهک ها
- 3- عدم رعایت ترتیب در ریختن رازنت ها از ابتدا تا انتها پلیت
- 4- سرد بودن معرف ها در هنگام شروع به کار منجر به اختلاف دما اولین چاهک با آخرین چاهک و رانش در سنجش می گردد
- 5- مخلوط نشدن معرف ها در زمان ریختن به چاهک ها
- 6- واکنش کند و سریع محلول متوقف کننده نهائی جهت توقف نهائی واکنش

نحوه کاربرد صحیح نوک سمپلر و سمپلر در انزیم ایمونواسی

- 1- در صورت الزام به استفاده از نوک سمپلر مصرف شده نوک سمپلر بایستی اتوکلاو شده و بازبودن نوک تک نوک سمپلر ها چک شده باشد در ضمن نوک مصرف شده فاقد ماهیت نجسب بودن می باشد و در اثر اتوکلاو تغییر شکل و حجم می دهد**
- 2- محکم نشدن نوک روی بدنه سمپلر منجر به ریزش نمونه یا معرف و بروز خطا می گردد**
- 3- بد جا انداختن اورینگ سمپلر در هنگام نظافت و سرویس سمپلر منجر به ریزش مایع از نوک سمپلر و بروز خطا می گردد**
- 4- تماس دست با نوک سمپلر و الودگی باکتریال ان می تواند منجر به الودگی محلول کنژوکه و تضعیف یا خنثی شدن معرف کنژوکه گردد. استاف و استرپتوکوک بواسطه رسپتور اف سی قادر به جذب غیر اختصاصی ایمونوگلوبین جی در محیط بوده و منجر به جذب انتی بادی کنژکه و تضعیف تیترا کنژوکه می گردد**
- 5- چسبندگی ترکیبات پروتئینی سرم و پلاسما به سطح نوک سمپلر (خصوصاً البومین) خصوصاً زمانی که نوک را داخل لوله غوطه ور می نماییم منجر به تخلیه سرم اضافی و بروز خطا می گردد (راه حل اساسی برداشت نمونه از سطح خارجی سرم و عدم غوطه ورکردن نوک در سرم یا پاک کردن متناوب نوک ها با گاز یا دستمال بدون پرز می باشد)**
- 6- کنترل روزانه یا هفتگی مخروط سمپلر به لحاظ الودگی به سرم یا معرف یا اسید**
- 7- اشنائی به تکنیک برداشت معکوس نمونه در حجم های پایین سرم**
- 8- کنترل کیفی وزنی سمپلر های کمتر از 200 لاندا (سه تا شش ماه یک بار به طور منظم) و کنترل صحت و دقت مجاز هر سمپلر (بایاس کمتر از 3% و ضریب تغییرات کمتر از 5%)**
- 9- نوک را حتی الامکان تا حد صحیح در نمونه پائین ببرید (2 تا 5 میلی متر پائین تر از تقعر سطح نمونه در لوله)**

نکات مهم در آماده سازی نمونه های ایمونو اسی

- 1- سرم های بیمارانی که غلظت بالائی از ایمونوگلوبولین و پروتئین های اختصاصی و آنزیم ها را دارا می باشد دچار تغییر ماتریکس شده و نتایج نادرست نشان خواهد داد لذا رقیق نمودن این نمونه ها با یک رقیق کننده مناسب منجر به تعدیل ماتریکس و ارائه جواب های صحیح می گردد. از برخی رقیق کننده های مناسب میتوان نام برد : استاندارد صفر / محلول بافر سنجش حاوی پروتئین / سرم عاری از هورمون و آنالیت / پولد سرم با غلظت پائین
- 2- تقریبا در تمام سنجش های ایمنی نمونه اصلی سرم می باشد و در صورت استفاده از پلاسما بایستی الزاما با دقت بروشور کیت خوانده شود و در صورت بلامانع بودن کاربرد پلاسما از نمونه پلاسما استفاده گردد در ضمن نوع ضد انعقاد نیز مهم است به عنوان مثال در روش های آنزیم ایمونو اسی که آنزیم آلکالن فسفاتاز به عنوان آنزیم نشاندار کاربرد دارد استفاده از ضد انعقاد سیترات و اتیلن دی آمین تترا می / استیک اسید ممنوع است که هر دوشلاتور قوی یون های فلزی و مهار کننده آنزیم آلکالن فسفاتاز باشد /
- 3- پاراپروتئینی منجر به افزایش ویسکوزیته سرم و کاهش برداشت سرم و نهایتا جواب های با کاهش کاذب می گردد
- 4- در سنجش های آنزیم ایمونو اسی که نشانگر آنزیمی آن پراکسیداز است مطلقا نبایستی از نمونه حاوی سدیم آزاید استفاده نمود
- 5- همولیز نمونه منجر به افزایش کاذب جذب نوری در روش ایمونو اسی می گردد (خصوصا در اندازه گیری تیروکسین آزاد که منجر به کاهش کاذب می گردد)

نکات مهم در مراحل شستشو چاهک ها با بافر

1- محلول های شستشو عمدتاً حاوی دترژنت می باشند که منجر به تولید حباب یا کف در حین ساخت محلول کار بافر می گردد لذا بایستی مراقب بود در زمان شستشو این حباب یا کف ها وارد چاهک ها نشوند که منجر به کاهش سطح تماس بافر با چاهک ها و کاهش اثر شستشو می گردند

2- اندازه گیری پ هاش بافر شستشو نهائی (محلول کار بافر) از کارهای اصولی است که بهتر است انجام گردد . به عنان مثال در بافر فسفات پ هاش ایده آل 7.2 است و شرایط اسیدی یا قلیائی منجر به ظهور جذب نوری کاذب بالا یا پائین می گردد . جهت این کار تحت کنترل بودن پ هاش آب مقطر مورد نیاز جهت تهیه بافر الزامی است

3- تاریخ تهیه بافر روی ظرف بافر قید شود و محلول بافر تازه به تازه و به میزان نیاز تهیه گردد

4- در واشر های اتوماتیک بایستی سرعت ریختن بافر و آسپیراسیون بافر به شکلی تنظیم گردد تا زمان خیس خوردن پلیت به طور کامل رعایت گردد .

5- تهیه بافر غلیظ یا رقیق خارج از رنج رقت بروشور منجر به کاهش یا افزایش قدرت بافر و نهایتاً سیگنال مثبت یا منفی کاذب در روش می گردد به عنوان مثال بافر که بیش از حد رقیق شده باشد قادر به جداسازی اتصالات غیر اختصاصی از محیط چاهک نبوده و سیگنال مثبت کاذب حاصل می نماید و برای بافر غلیظ عکس این موضوع صدق می نماید

نقش تکان دادن (شیکینگ) پلیت در سرعت واکنش ایمنو اسی

زمانی که پلیت الیزا شیک می گردد انرژی کافی برای انتقال ملکول آنالیت به فاز جامد فراهم می شود و انتشار کمتر اهمیت می یابد

به طور کلی شیک 1200 دور در دقیقه به مدت یک ساعت واکنش را به تعادل می رساند که همین سیستم در مدت زمان 16 الی 32 ساعت بدون شیک به تعادل خواهد رسید

مخلوط کردن کافی و مناسب معرف ها زمان انکوباسیون را کوتاهتر می نماید (انکوباسیون طولانی هم حساسیت و هم ویژگی سنجش را در روش های غیر رقابتی ایمنو اسی افزایش می دهد خصوصا در تست هایی که حساسیت یک جز

ضروری است رعایت دقیق زمان انکوباسیون الزامی است نظیر

TSH&Hbs Ag

شاخص های پایداری معرف های الایزا

موارد نقص پایداری فیزیکی معرف شامل : تغییر رنگ یا بیرنگ شدن معرف و رسوب گذاری معرف

موارد نقص پایداری باکتریواستاتیک معرف : غلظت نامناسب و نوع نامناسب مواد ضد باکتری در معرف ها منجر به رشد باکتری در معرف ها و آلودگی معرف می گردد

موارد نقص پایداری شیمیائی معرف ها : کاهش تمایل اتصال به دلیل تخریب آنتی بادی یا آنزیم موجود در کنژوکه یا تغییر رنگ معرف کروموژن به دلیل هیدرولیز یا اکسیداسیون یا احیا

تعیین شاخص های عملکردی کیت های الایزا

حساسیت تشخیصی / ویژگی تشخیصی

Diagnostic sensitivity / Diagnostic Specificity

• حساسیت تشخیصی Diagnostic sensitivity

- شامل تعداد افراد دارای بیماری است که دارای آزمایش مثبت می باشند و و ارزش اصلی حساسیت تشخیصی شناساندن افراد بیمار که آزمایش منفی دارند (گروه منفی کاذب) می باشد

• ویژگی تشخیصی Diagnostic Specificity

- ویژگی تشخیصی شامل تعداد افراد غیر بیمار است که آزمایش منفی دارند و و ارزش اصلی ویژگی تشخیصی تعیین افراد غیر بیمار که نتیجه آزمایش مثبت دارند (گروه مثبت کاذب) می باشد
 - روش اندازه گیری ویژگی تشخیصی و حساسیت تشخیصی در کیت های الایزا :
 - 1- اندازه گیری بر روی تعداد زیادی نمونه سرم کنترل مثبت و منفی (یا سرم رفرانس)

- 2- جداسازی افراد بیمار از غیر بیمار با روش های استاندارد و مرجع

- 3- مقایسه نتایج تشخیصی افراد بیمار و غیر بیمار

تعیین شاخص های عملکردی کیت های الایزا

حساسیت آنالیتیکال / ویژگی آنالیتیکال

Analytical sensitivity / Analytical Specificity

حساسیت آنالیتیکال :Analytical sensitivity

حساسیت آنالیتیکال یا سنجش شامل کمترین مقدار قابل اندازه گیری یک آنالیت با تکرار پذیری قابل قبول و قابل گزارش می باشد

روش تعیین حساسیت آنالیتیکال استفاده از طریق **روش آنالیز آخرین تیتراقت** قابل شناسایی می باشد در این روش یک کالیبراتور با غلظت پائین را به شکل سریال دایلوژن رقیق نموده و آخرین تیتراقت که در آن آنالیت قابل شناسایی باشد تحت عنوان حساسیت آنالیتیکال نامیده می شود

ویژگی آنالیتیکال :Analytical Specificity

ویژگی آنالیتیکال به معنای عدم ایجاد واکنش متقاطع با سایر آنالیت های مرتبط را شامل می شود. روش اندازه گیری ویژگی آنالیتیکال : کاربرد پانل سرم هائی حاوی آنالیت های مشابه یا آنتی بادی های مشابه که احتمال واکنش متقاطع در آن وجود دارد

Serology QC

Affinity

قدرت اتصال بین یک اپی توپ یک آنتی ژن با یک جایگاه اتصال آنتی بادی را گویند

افینیتی یک ثابت تعادلی است که قدرت واکنش بین یک سایت اپی توپ آنتی ژن و یک سایت گیرنده آنتی بادی را توصیف می نماید

Avidity

اویدیتی به طور کلی و مجموع قدرت سایت های آنتی ژنیک یک آنتی ژن را در اتصال به مجموع سایت های یک آنتی بادی را بیان می کند
قدرت و نماد عددی اویدیتی همواره از مجموع عددی افینیتی بالاتر است

Acquiring Positive and Negative Sera

- **Negative serum samples** may come from specific pathogenfree (SPF) animals, if they exist, or from animals that have repeatedly tested negative by other tests or laboratories.
- **Positive serum samples** are frequently the most difficult to accumulate in large enough numbers for assay development. Ideally, they should come from natural infections that are confirmed by other diagnostic techniques and should represent a wide range of time points after infection

Acquiring Positive and Negative Sera

- For assay development, control sera should be accumulated and pooled, when necessary, to achieve volumes of several milliliters for each sample, which should then be placed in single-use aliquots (e.g., 0.1 ml) and frozen at -70°C until use.
- Representative aliquots of frozen sera **should be qualified by comparison to existing assays or by outside laboratories**, where appropriate, and the results recorded in the serum lot documentation records.
- Known positive and negative serum samples for assay prevalidation and validation must also be accumulated and aliquoted in a similar manner.

نکات تهیه رقت در سرولوژی

رقت های مختلف سرم با با ترکیب یک نسبت معین سرم با ماده رقیق کننده بدست می آید که ساده ترین مسیر آن تهیه رقت سریالی است

در تهیه رقت سریالی تهیه رقت اول مناسب و اوت کردن حجم ثابت از مخلوط در رقت اخر نکات کلیدی کار می باشد که در تهیه رقت سرم در تست رایت و ویدال و سی آر پی و روماتوئید فاکتور و.. کاربرد روتین دارد.

بهترین ماده رقیق کننده در سرولوژی نرمال سالین است به عنوان مثال جهت تهیه یک رقت 1 به 8 بایستی یک بخش سرم را با 7 بخش نرمال سالین مخلوط نمائیم

Seroconversion

سرو کانورشن

- ایجاد و توسعه آنتی بادی اختصاصی قابل تشخیص بر علیه یک میکرو ارگانیسم در سرم خون را سرو کانورشن گویند که به دلیل ایمونیزه شدن آن فرد بر علیه آن میکرو ارگانیسم می باشد

Testing paired Samples

- Testing paired Samples Testing for infectious diseases is performed on acute and convalescent specimens (about 2 weeks apart) Paired sample.
- Must see 4-fold or 2-tube rise in titre to be clinically significant



Sero reversion

- Sero reversion is the opposite of seroconversion.
- This is when the tests can no longer detect antibodies or antigens in a patient's serum
-

- 
- **Antigen and Antibody reactions can be identified by different methods**

Precipitation

- Precipitation Principle Soluble antigen + antibody (in proper proportions) → visible precipitate Lattice formation (antigen binds with Fab sites of 2 antibodies)
- Examples Double diffusion (Ouchterlony)
- Single diffusion (radial immunodiffusion)
- Immunoelectrophoresis Immunofixation

Neutralization reactions

- Neutralization reactions Similar in principle and interpretation of results Antibody-binding Hemagglutination inhibition (serum antibody reacts with known nonparticulate antigen → binding occurs) Neutralization (antibody neutralizes toxin) After binding, antibody is not available to react in indicator system Results: NO agglutination or NO hemolysis = positive reaction Agglutination or hemolysis = negative reaction (antibody not bound in origin)



- **Neutralization reactions :**
- Generally, positive control samples used in inhibition or neutralization tests show no reaction and negative control samples show a reaction (opposite of results in direct agglutination testing)
- Example of inhibition: Hemagglutination inhibition test for rubella
- **Example of neutralization:** antistreptolysin O test (ASO) Neutralization reactions
-

Complement fixation (CF)

- Complement fixation (CF) Antibody and antigen allowed to combine in presence of complement If complement is fixed by specific antigen-antibody reaction, it will be unable to combine with indicator system Precautions Serum must be heat-activated Stored serum becomes anti-complementary Extensive QC/standardization required Only use for IgM antibodies

Imunoelectrophoresis (IEP)Qualitative

- Imunoelectrophoresis (IEP)Qualitative A serum sample is electrophoresed through an agar medium
- A trough is cut in the agar and filled with Ab.
- A precipitin arc is then formed. Because Ag diffuses radially and Ab from a trough diffuses, the reactants meet in optimal proportions for precipitation

Nephelometry

- Nephelometry Procedure **Serum substance reacts with specific antisera and forms insoluble complexes Light is passed through suspension Scattered (reflected)**
- light is proportional to number of insoluble complexes; compare to standards Examples
Complement component concentration Antibody concentration (IgG, IgM, IgA, etc.)
Immunofluorescence

Immunofluorescence

- Immunofluorescence Direct – add fluorescein-labeled antibody to patient tissue, wash, and examine under fluorescent microscope
- Indirect – add patient serum to tissue containing known antigen, wash, add labeled antiglobulin, wash, and examine under fluorescent microscope Examples
Testing for Antinuclear Antibodies (ANA) Fluorescent
Treponemal Antibody Test (FTA-Abs)

Agglutination

- Agglutination Principle Particulate antigen + antibody
→ clumping Lattice formation (antigen binds with Fab sites of 2 antibodies forming bridges between antigens)
- Examples **Direct agglutination** (Blood Bank)
- **Passive Hemagglutination** (treat RBC's with tannic acid to allow adsorption of protein antigens)
- **Passive latex agglutination** (antigen attached to latex particle)

Flow cytometry

- Flow cytometry Method of choice for T- and B-cell analysis (lymphocyte phenotyping)
- Principle Incubate specimen with 1 or 2 monoclonal antibodies tagged with fluorochrome Single cells pass through incident light of instrument (laser) which excites fluorochrome and results in emitted light of different wavelength Intensity of fluorescence measured to detect cells possessing surface markers for the specific monoclonal antibodies that were employed Forward light scatter indicates cell size or volume
- 90° side-scattered light indicates granulation

Common uses Flow cytometry

- DNA analysis
- Reticulocyte counts
- Leukaemia/lymphoma
- classification CD 4 cell estimations in AIDS/HIV patients.

Widal test is century old ,Is it loosing importance ?

- Widal test is century old ,Is it loosing importance ?
- In this reaction antibodies react with antigens on the surface of particulate objects and cause the objects to clump together, or agglutinate. These reactions were the earliest to be adapted to diagnostic laboratory.
- Widal test is used for diagnosis of typhoid fever. This test, developed by Georges Fernand I. Widal (French physician) in 1896, is now supplemented by more sophisticated procedures.



Causes Of False-positive Widal Agglutination Tests

- Causes Of False-positive Widal Agglutination Tests
- Previous immunization with Salmonella antigen.
- Cross-reaction with non – typhoidal Salmonella.
- Variability and poorly standardized commercial antigen preparation.
- Infection with malaria other Enterobacteriaceae charring the same s-LPS .

- **Causes of Negative Widal Agglutination Test :**
- Causes of Negative Widal Agglutination Test The carrier state An inadequate inoculum of bacterial antigen in the host to induce antibody production Technical difficulty or errors in the performance of the test
- Previous antibiotic treatment Variability in the preparation of commercial antigens.
- **Declining importance of Widal test :**
- Declining importance of Widal test The value of the salmonella agglutination tests has declined as the incidence of typhoid fever has decreased, at least in the developed world, the general use of vaccines has increased, and ever increasing -numbers of antigenically related serotypes of Salmonella have been recognised

Serology - Importance of repeated tests

- Serology - Importance of repeated tests Criteria for diagnosing Primary Infection 4 fold or more increase in titre of IgG or total antibody between acute and convalescent sera Presence of IgM Seroconversion
- A single high titre of IgG (or total antibody) - very unreliable Criteria for diagnosing Reinfection Four fold or more increase in titre of IgG or total antibody between acute and convalescent sera Absence or slight increase in IgM

با تشکر از توجه و حوصله شما



 NATIONAL
GEOGRAPHIC

Photograph by Oliver Klink, 2008 International Photography Contest

© COPYRIGHT NATIONAL GEOGRAPHIC SOCIETY. ALL RIGHTS RESERVED.