**همه چیز در مورد تست الایزا ELISA**

**آنتي‌ ژن‌ها را به سادگي رديابي كنيد معرفي روش ELISA**

ELISA مخفف عبارت Enzyme-Linked Immunosorbent Assay يك روش آزمايشگاهي بيوشيميايي ساده با حساسيت بسيار بالا است كه امكان آناليز تعداد زيادي نمونه را به صورت همزمان فراهم مي كند. اين روش در ايمونولوژي (ايمني شناسي) براي تشخيص وجود يك آنتي بادي يا آنتي ژن در نمونه مورد آزمايش استفاده مي شود كه عموما به عنوان ابزاري تشخيصي در پزشكي و پاتولوژي و همچنين تست كنترل كيفيت در بسياري از صنايع كاربرد دارد.

ELISA بر پايه اندازه گيري كمپلكس رنگي آنتي‌ژن و آنتي‌بادي استوار است. به اين ترتيب كه نمونه مورد آزمايش با مقدار نامشخصي آنتي ژن روي فاز جامد (معمولا پليت پلي استيرن) ريخته مي شود، سپس آنتي بادي بازيابي اضافه مي‌شود تا با آنتي ژن واكنش داده و تركيبي ايجاد كند. آنتي بادي بازيابي با آنزيم پيوندي كووالانسي برقرار مي كند. بين هر مرحله پليت با محلول پاك كننده ملايمي شسته مي شود تا هر پروتئين يا آنتي بادي باقيمانده شسته شود. پيش از آخرين مرحله شستشو، پليت با اضافه كردن زير لايه آنزيمي كشت داده مي شود و ماده رنگي توليد مي‌شود. طول موج رنگ به دست آمده توسط يك دستگاه اسپكتروفتومتر قرائت شده و ثبت مي‌شود كه اين طول موج معرف حضور يك آنتي‌بادي يا آنتي‌ژن و نيز غلظت آن است. در ELISA هاي قديمي تر زيرلايه رنگ‌زا به كار گرفته مي‌شد در حاليكه در تست هاي جديدتر زيرلايه هاي فلوروژنيك با حساسيت بسيار بالاتر مورد استفاده قرار مي گيرد.

امروزه ELISA يكي از قدرتمند ترين روش هاي آزمايشگاهي براي پي بردن به اختلالات سيستم ايمني است، اين تست به منظور پي بردن به آنتي‌ژن ناشي از ارگاني عفوني در بدن يا مواد غير نرمالي كه معرف برخي بيماري‌ها است انجام مي شود. همچنين آنتي بادي‌هايي كه در پاسخ به برخي عفونت‌ها يا بيماري‌ها به‌وجود آمده نيز توسط اين تست قابل تشخيص هستند. تست ELISA اولين آزمايش متداول در غربال‌زني HIV است. در تست ELISA سرم فرد 400 بار رقيق شده و به صفحه اي كه حاوي آنتي‌ژن HIV است اضافه مي‌شود. اگر آنتي بادي HIV در سرم وجود داشته باشد، به اين آنتي‌ژن هاي HIV مي چسبد. سپس به منظور از بين بردن ديگر اجزا سرم، پليت شستشو داده مي شود. يك "آنتي بادي ثانويه" ساخته شده مخصوص (يك آنتي بادي چسبيده به آنتي بادي ديگري) به پليت اعمال شده و شستشوي ديگري انجام مي‌شود. اين آنتي بادي ثانويه به صورت شيميايي به آنزيم از پيش تهيه شده مي‌چسبد. اين‌بار زير لايه اي براي آنزيم اعمال شده و توسط آنزيم كاتاليز مي‌شود كه منجر به تغيير رنگ در فلورسانس مي شود.

نتايج ELISA به صورت عددي گزارش مي‌شود. بحث‌انگيزترين وجه اين تست تعيين نقطه برش بين نتايج مثبت و منفي است.

علاوه بر آزمايش HIV از ELISA براي آزمايش بيماري‌هايي چون هپاتيت، تب استخوان‌شكن، leptospirosis ، عفونت انگلي، تبخال، سرخجه و ديگر عفونت‌هاي ويروسي و باكتريايي استفاده مي‌شود.

پيش از پيدايش روش ELISA ، تنها گزينه براي انجام سنجش ايمني، ايمني سنجي راديويي بود، كه از آنتي ژن ها و آنتي بادي هايي كه به صورت راديواكتيو مميز شده بودند استفاده مي‌شد. در اين روش در صورت وجود آنتي بادي يا آنتي‌ژني خاص، راديواكتيويته سيگنالي توليد مي‌كرد. تئوري روش ايمني سنجي راديويي اولين بار سال 1960 توسط Rosalyn Sussman Yalow و Solomon Berson مطرح شد. از آنجايي‌كه راديواكتيويته خطرات زيستي داشت، پيشنهاد امن تر و ايمن تري مبني بر جايگزيني سيگنال هاي غير راديو اكتيو به جاي سيگنال هاي راديو اكتيو ارائه شد. وقتي يك آنزيم مشخص (مانند پر اكسيداز) با زير لايه مناسب واكنش مي دهد، منجر به تغيير رنگ آن مي‌شود كه مي تواند به عنوان سيگنال استفاده شود. البته بايد تناسب بين سيگنال و وجود آنتي‌بادي يا آنتي ژن تعيين مي‌شد كه اين پروسه توسط Stratis Avrameas و G.B. Pierce انجام شد. در سال 1966 توسط Wide و Porath اين روش تكميل تر شد. و در سال 1971 Peter Perlmann و Eva Engvall نهايتا به روش ELISA به شيوه امروزي دست پيدا كردند. ELISA امروزي مزاياي زيادي نسبت به روش‌هاي ايمني سنجي راديويي دارند. از جمله عدم وجود خطر تشعشع، امكان اتوماسيون، امكان افزايش حساسيت روش، عمر طولاني كيت هاي آنزيمي، سرعت خوانش بالا و قيمت ارزان‌تر دستگاه‌ها و معرف ها.

تست ELISA با روش‌هاي گوناگوني انجام مي‌شود كه كه به صورت كلي به دو دسته ELISA مستقيم و غير مستقيم تقسيم بندي مي‌شود. در روش مستقيم آنتي ژن يا آنتي‌بادي مورد نظر به طور مستقيم بر سطح فاز جامد پوشش داده مي شود و سپس آنتي‌بادي يا آنتي ژن مكمل نشاندار شده آن به سيستم اضافه مي‌شود. با آناليز سيگنال توليد شده مي‌توان پي به وجود آنتي ژن يا آنتي بادي مورد نظر در نمونه برد. اين روش ارزش تشخيصي چنداني نداشته و بيشتر كاربرد تحقيقاتي دارد.

در روش غير مستقيم سرم رقيق شده به آنتي ژن هاي پوشش داده شده در فاز جامد اضافه مي شود، سپس نمونه را به آن اضافه كرده و پس از گذشت زمان انكوباسيون و يك مرحله شستشو، آنتي هيومن گلوبولين نشاندار شده با آنزيم به چاهك اضافه مي شود. اين روش براي تعيين آنتي بادي اختصاصي يا تيتراسيون آنتي بادي در سرم استفاده مي‌شود. ‌

روش هاي ELISA ساندويچ و ELISA رقابتي يا مهاري از ديگر انواع متداول اين تكنيك هستند. روش ساندويچ كه متداول‌ترين روش ELISA است، يك آنتي ژن در بين دو آنتي بادي اختصاصي قرار مي گيرد. روش هاي رقابتي نيز بر پايه رقابت دو آنتي ژن يا دو آنتي بادي براي اتصال ليگاند با مقدار محدود استوار است. اگر اضافه كردن هردو آناليت به سيستم همزمان انجام شود، روش را رقابتي مي نامند ولي چنانچه ابتدا آناليت اضافه شده و پس از يك دوره زماني انكوباسيون آناليت نشاندار اضافه گردد روش را مهاري مي نامند.

مراحل انجام يك آزمون ELISA كه تقريبا در تمام انواع آن مشترك است عبارت است از:

1) پوشش دهي، كه به معني جذب يك آنتي‌ژن يا آنتي‌بادي با سطوح جامد است.

2) اضافه كردن نمونه‌هاي مورد آزمايش.

3) گذشت مدت زمان كافي براي انجام واكنش كه به اصطلاح انكوباسيون واكنشگرها ناميده مي شود.

4) انجام عمل شستشو توسط واشر ELISA ، به منظورجدا كردن واكنشگرهاي متصل شده و واكنش داده از واكنشگرهاي آزاد و متصل نشده ‌.

5) اضافه عوامل لينك شده با آنزيم.

6) مجددا طي مدت زمان انكوباسيون براي واكنشگرها ‌.

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

8) افزودن زيرلايه آنزيم جهت تشخيص واكنش دهنده‌ها.

9) طي زمان انكوباسيون.

10) اتمام واكنش آنزيمي توسط متوقف كننده‌ها و خوانش دانسيته نوري به دست آمده توسط خواننده .ELISA

براي انجام تست ELISA بايد نمونه خون از بيمار گرفته شود و سرم آن جدا شود. براي اين كار بايد به مواردي دقت داشت. مثلا از بستن گارو براي مدتي طولاني بايد اجتناب كرد چرا كه ممكن است در پارامترهاي مورد اندازه گيري تاثير گذاشته و موجب بروز خطا شود. در هنگام جداسازي سرم نيز بايد دقت شود كه فيبرينوژن يا ذرات ديگر نباشد. پيش از انجام آزمايش بايد به كيفيت كيت هاي مورد مصرف توجه كرد، همچنين نگهداري آن‌ها بايد در دماي­C 8-2 صورت گيرد. تمامي محلول‌هاي موجود در كيت قبل از مصرف بايدخوب مخلوط شده و به دماي آزمايشگاه برسد و پس از استفاده به منظور افزايش پايداري، بلافاصله اجزاء كيت به يخچال منتقل شود. درحين انجام آزمايش بايد از نوسانات غير تدريجي دما در هنگام انكوباسيون، مانند باز بودن پنجره يا درب آزمايشگاه در محل آزمايش جلوگيري كرد. ايجاد پديده هوك باعث ايجاد نتايج پايين كاذب مي‌شود لذا توصيه مي‌شود براي جلوگيري از اين پديده سرم رقيق نشده و سرم يك دهم رقيق شده، مخلوط وآزمايش را انجام دهيم، تا اثر احتمالي هوك اصلاح شود. از آنجا كه فريز و ديفريز كردن نمونه ها باعث كاهش سطح برخي از هورمون ها مي‌شود، بايد تا حد ممكن از اين كار پرهيز شود. پيش از اندازه گيري بايد كليه ابزارهاي مورد استفاده اعم از نوك ابزار نمونه‌گيري و كيت ها استريل شوند. كه البته استفاده از ابزارهاي يكبار مصرف پيشنهاد مي‌شود و بايد قبل از استفاده لوله آزمايش هاي شيشه‌اي آن‌ها را با اسيد سولفوريك رقيق شستشو داده و با آب مقطري كه دوبار تقطير شده آبكشي انجام داد. از به كار بردن محلول‌هاي شستشوي نامناسب يا آب مقطر ناخالص بايد پرهيز كرد. ضمنا بايد از كاركرد صحيح دستگاه‌ها و تجهيزات مورد استفاده به عنوان مثال از صحت طول موج فيلترهاي خواننده ELISA به كمك استفاده از ماده رنگي با ثبات، نظير بيكرومات پتاسيم يا عملكردصحيح دستگاه واشر ELISA اطمينان حاصل كرد.

شيكر ELISA SHAKER) ELISA)

تكان دادن ميكروپليت ها )shaking( از مهم‌ترين بخش هاي تكنيك ELISA است، چرا كه تاثير زيادي در تغيير رنگ محيط آنزيمي پس از افزودن محلول اسيدي دارد. استفاده از روتاتور معمولي با قطر چرخش زياد و تعداد دور كم و در نتيجه تكان دادن آهسته ميكروپليت‌ها باعث خوب مخلوط نشدن معرف‌ها و در نتيجه ادامه و پيشرفت جزئي واكنش در طي زمان و به روز خطا مي‌شود. همچنين تكان شديد اين پليت ها نيز باعث آلوده شدن چاهك هاي ميكرو پليت با هم مي‌شود. شيكر ELISA دستگاهي است كه براي مخلوط كردن محتويات ميكروپليت‌ها به كار گرفته مي شود. شيكر ELISA با حركت سريع با قطر چرخش كم باعث اختلاط مناسب معرف‌ها و در نتيجه پيشرفت واكنش در طي زمان مي‌شود. شيكرهاي امروزي مجهز به سيستم كنترل زمان و كنترل دور به صورت ديجيتال است.

واشر ELISA washer)ELISA)

از ديگر مراحل مهم تست ELISA ، شستشو است كه در هر مرحله از تست به منظور دفع و تخليه كامل مولكول‌هاي غير اختصاصي از محيط واكنش انجام مي گيرد. شستشو به دو صورت دستي و خودكار انجام مي شود. ابتدايي ترين روش شستشو، شستشوي دستي است بدين ترتيب كه مايع شستشو را با پيپت بر روي چاهك ها ريخته و سپس آن را در سينك خالي مي كنند. فشار بالاي شستشو در روش دستي كه به علت تخليه سريع بافر به وجود ميآيد، منجر به جداشدن و حذف اتصالات اختصاصي از كف چاهك‌ها و كاهش كاذب مي‌شود، همچنين فشار پائين‌شست‌شو ناشي از تخليه آهسته بافر، باعث عدم دفع كامل اتصالات غير اختصاصي و افزايش كاذب جذب نوري مي‌شود. بهتر است در روش دستي تا نزديك لبه فوقاني چاهك ها از محلول شستشو پر شود، در صورت پر شدن لب به لب چاهك‌ها، احتمال آلودگي چاهك به چاهك افزايش پيدا مي‌كند. همچنين بايد از سرريز شدن محلول شستشو، ايجاد حباب هوا در چاهك‌ها و تماس با كف چاهك جلوگيري كرد. در هنگام تخليه چاهك‌ها نيز بايد مكش و تخليه به طور كامل انجام شده و دقت شود كه حتي ذره اي از مايع بافر در كف چاهك‌ها باقي نماند. اما اين روش شستشو (شستشوي دستي) بسيار وقت گير بوده و خطر آلودگي محيط و كاربر را در پي دارد. از اين رو دستگاه‌هاي خودكار واشر ELISA براي شستشوي پليت ها به وجود آمده است كه علاوه بر دقت و ايمني بالاتر، سريع‌تر و راحت‌تر عمل شستشو را انجام مي دهند. اين دستگاه‌ها در انواع مختلف 8 يا 12 كاناله، تك سوزنه و دوسوزنه موجود است. در انواع دو سوزنه، يك سوزن براي ريختن و ديگري براي خالي كردن محلول شستشو استفاده مي‌شود بدين ترتيب كه يك سوزن به طور دائم در حال مكش است تا اگر مايع شوينده بيشتري در هنگام پر كردن وارد چاهك ها شد ، آن‌را خالي كند و اين در حالي‌است كه در مدل تك سوزنه تمامي اقدامات توسط همان يك سوزن صورت مي گيرد.

خواننده ELISA reader) ELISA)

خواننده ELISA در واقع يك دستگاه فتومتر است كه در آخرين بخش از تست ELISA به طور اختصاصي براي خواندن نمونه هاي مربوطه طراحي شده است. وظيفه آن طيف‌سنجي نوري يا خوانش دانسيته نوري واكنش ELISA است. طول موج مشخصي از نور از پائين درون چاهك مي‌گذرد، در مسير آن فيلتر مناسبي باتوجه به نوع آنزيم و نوع سوبستراي آنزيم جهت دستيابي به طول موج مطلوب قرار داده مي شود. در بسياري از خوانشگرها سيستم تك موج يا دو موج است و جهت برطرف سازي نقص سيستم نوري ، تغييرات چاهك به چاهك حجم نهايي در چاهك ها، تصحيح جذب نوري به طور خودكار صورت مي گيرد . اين عمل توسط نوع خاصي از فيلترتحت عنوان فيلترهاي تفاضلي صورت مي گيرد. خوانش ميزان جذب محتوي چاهك‌ها توسط خواننده ELISA الزاما بايستي در زمان تعيين شده انجام شود. بعضي از دستگاه‌هاي خواننده ELISA قابليت برنامه‌ريزي زماني، نوع تشخيص و كنترل و در نهايت مشخص كردن مثبت يا منفي بودن نمونه‌هاي مجهول را دارا هستند. ‌

امروزه انواع مختلفي از خوانشگرها براي پليت ها ي ELISA در بازار موجود هستند اكثر اين خوانشگرها يك ستوني يا 96 خانه (يك پليتي) بوده كه اكثرا خودكار و تعداد اندكي نيز دستي هستند. اين دستگاه‌ها داراي فيبرهاي نوري هستند. در دستگاه‌هاي خواننده انتخاب طول موج توسط فيلترها يا گريدها (گريتينك ساختارهايي كه با تابيده شدن نور به آن‌ها، تنها نور با طول موج خاصي ازآن‌ها ساطع مي شود) انجام مي شود. براي چاپ نتايج نمونه‌هاي موردآزمايش ، يا دستگاه خود داراي پرينتر است يا مي توان آن‌را به پرينتري متصل كرد. همچنين مي توان جهت انجام محاسبات بيشتر خواننده ELISA را به كامپيوتر وصل كرد