

## روشهای سنجش ایمنی و طبقه بندی الایزا

### روشهای ایمونواسی :

در بین روشهای تشخیصی، امروزه روشهای سنجش ایمنی که در آن از آنتی بادی به عنوان یک فاکتور شناساگر استفاده می شود کاربردهای وسیعی یافته است، در برخی از موارد سنجش ایمنی، واکنش آنتی بادی- آنتی ژن به طور ماکروسکوپی قابل مشاهده است در این گونه روشها به دلیل فقدان سیستم تقویت سیگنال، حساسیت روش محدود است و به همین دلیل باید کمپلکسهای بزرگ آنتی بادی - آنتی ژن تشکیل شود تا سنجش قابل تشخیص باشد مثل روشهای آگلوتیناسیون و ایمونوپرسی پیتاسیون.

در مواردیکه واکنشهای آنتی بادی و آنتی ژن قابل مشاهده نباشد باید به نحوی این واکنشها آشکار شود که این امر منجر به پدید آمدن نسل جدیدی از روشها بنام Labeled Immunoassay شد، در این واکنشها آنتی بادی یا آنتی ژن توسط موادی که دارای خاصیت رادیواکتیو، فلورسانس یا فعالیت آنزیمی هستند نشاندار می شوند که به ترتیب رادیو ایمونواسی، فلورسانس ایمونواسی و آنزیم ایمونواسی نامیده می شوند .

### رادیو ایمونواسی :

در این روشهای سنجش ایمنی آنتی بادی یا آنتی ژن با استفاده از مواد رادیو ایزوتوپ نشاندار می گردند. در این روش در صورتیکه آنتی ژن توسط رادیو ایزوتوپ نشاندار شود روش Radio Immunoassay (RIA) گفته می شود و چنانچه آنتی بادی توسط رادیو ایزوتوپ نشاندار شود روش (IRMA) Immunoradiometric Assay نامیده می شود.

### آنزیم ایمونواسی :

در این روش بجای رادیو ایزوتوپ برای نشاندار کردن از یک آنزیم استفاده می شود، در اینگونه روشها چنانچه آنتی ژن نشاندار شود Enzyme Immunoassay (EIA) و چنانچه آنتی بادی نشاندار شود روش Immunoassay (IEMA) نامیده می شود، الایزا ELISA نامی عمومی برای اینگونه روشهاست که بصورت رایج استفاده می شود و به عبارتی ارزیابی های سنجش ایمنی آنزیمی که در آنها آنتی بادی یا آنتی ژن بر روی یک فاز جامد Coat می شود بنام الایزا شناخته شده است.

فوائد و معایب روش آنزیم ایمونواسی نسبت به روش رادیو ایمونواسی به شرح زیر است:

### فوائد :

- با تقویت فعالیت آنزیمی حساسیت سنجش قابل افزایش است.
- معرفها دارای زمان نگهداری طولانی تری می باشند.
- سنجشهای همزمان چند گانه قابل انجام است.
- طیف وسیعی از انواع سنجشها می تواند صورت گیرد.
- دستگاهها و ابزار لازم بطور گسترده ای در دسترس است.
- خطر اشعه در جریان نشاندار کردن، انجام آزمایش و دفع پس ماند های آنها وجود ندارد.
- روشها ساده و سریع است و با روشهای اتوماتیک قابل انجام است.

### معایب :

اندازه گیری فعالیت آنزیم می تواند به مراتب از اندازه گیری فعالیت برخی رادیو ایزوتوپها پیچده تر باشد.

فعالیت آنزیم می تواند توسط عواملی در نمونه تحت تاثیر قرار گیرد.

### طبقه بندی روشهای سنجش ایمنی :

سنجش های ایمنی با روشهای مختلف قابل انجام اند و بر اساس شاخصهای متفاوتی قابل تقسیم بندی می باشند. این شاخصها شامل شیوه آنالیز (کمی-کیفی) نوع آنالیت (آنتی ژن- آنتی بادی) سیستم سنجش (نشاندار بودن در مقابل عدم نشاندار بودن- رقابتی یا غیر رقابتی) و شرایط سنجش ( فاز محلول یا فاز جامد- تعادلی یا غیر تعادلی) می باشند.

یکی از اولین تقسیم بندیهای ایمونواسی تقسیم بندی بر اساس نشاندار بودن معرفهای سنجش است. بر اساس واکنشهای تعادلی آنتی ژن- آنتی بادی واکنشهای ایمونواسی نشاندار شده به ۲ دسته عمده تقسیم می شوند:

۱. تیپ I یا سنجش با افزایش معرف یا افزایش آنتی بادی (Reagent excess)

۲. تیپ II یا سنجش با محدودیت معرف یا افزایش آنالیت (Reagent Limited)

### تیپ I:

این نوع از سنجشهای ایمنی بعنوان Two Site Immunometric Assay، یا ایمونواسی غیر رقابتی یا Immunoenzymometric Assay نامیده میشوند. در این روشها آنتی بادی نشاندار می شود و سنجش آنالیت که به آنتی بادی متصل شده است مستقیما اندازه گیری می گردد، چنانچه برای نشاندار کردن آنتی بادی از رادیوایزوتوپ استفاده شود واکنش IRMA و اگر از آنزیم برای نشاندار کردن استفاده شود IEMA نامیده می شود. اکثر این نوع سنجشهای ایمنی با استفاده از آنتی بادی منوکلونال که دارای اختصاصیت برای یک اپی توپ آنتی ژنیک هستند صورت می گیرد و این واکنشها دارای اختصاصیت بالایی میباشند.

### تیپ II:

این نوع از سنجشهای ایمنی، سنجشهای ایمنی با محدودیت معرف (آنتی بادی) یا افزایش آنالیت نامیده می شوند که بر اساس نشاندار شدن آنالیت و محدودیت در مقدار آنتی بادی استوار است. در صورتیکه در این روش برای نشاندار کردن آنالیت از رادیو ایزوتوپ استفاده شود واکنش Radio Immunoassay (RIA) و چنانچه از آنزیم استفاده شود Enzyme Immunoassay (EIA) نامیده می شوند.

### طبقه بندی الایزا

سیستم الایزا بر اساس شیوه شناسی تحلیلی به چند گروه تقسیم می شود که عبارتند از:

#### ۱- الایزای مستقیم ( Direct ELISA )

در این روش آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه که باید تشخیص داده شود بطور مستقیم بر سطح فاز جامد کوت می شود و سپس آنتی بادی یا آنتی ژن مکمل آن که نشاندار شده است به سیستم اضافه می شود. در صورت وجود آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر در نمونه 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.

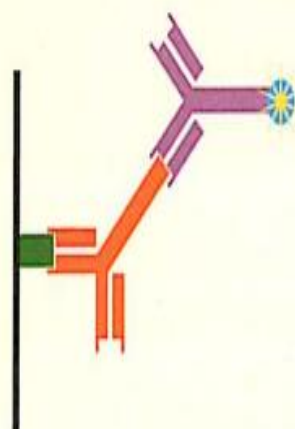
( شکل ۱ )



شکل ۱

## ۲- الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA)

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 معمولا سرم رقیق شده به آنتی ژن های کوت شده در فاز جامد (میکروول یا چاهک) اضافه می شود. آنتی ژن کوت شده آنتی ژن اختصاصی مربوط به آنتی بادی است که قرار است در نمونه



شکل ۲

ردیابی شود، پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود. (شکل ۲) برحسب اینکه چه کلاسی از آنتی بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع آنتی هیومن مورد استفاده نیز متفاوت است مثلا برای ردیابی آنتی بادی کلاس IgG از آنتی هیومن IgG و برای ردیابی کلاس IgA از آنتی هیومن IgA استفاده می شود.

اختصاصیت سنجش مستقیما توسط آنتی ژن کوت شده در فاز جامد تعیین می شود که ممکن است کاملا خالص و اختصاصی و یا نسبتا خام و غیر اختصاصی باشد.

سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی می تواند در یک بافر برای جلوگیری از جذب

غیراختصاصی پروتئین ها و جلوگیری از اشغال نقاط اتصال آنتی ژن رقیق شود. به چنین بافری محلول رقیق کننده نمونه (Sample diluent) گفته می شود. حساسیت و ویژگی چنین روشهایی می تواند با به کارگیری روش Capture Antibody با کاهش تداخل اثر آنتی بادی غیر اختصاصی بهتر شود.

بهترین مثالها در مورد این روش تعیین آنتی بادی بر علیه توکسو پلازما، روبلا، ویروس سیتومگال و هلیکوباکتر پیلوری از کلاسه های IgA، IgM و IgG در سرم می باشد. البته امروزه برای تعیین IgM بر علیه این عوامل عموما از روش Capture استفاده می شود، در روش Capture آنتی بادی های موجود در نمونه از کلاس IgM بر روی چاهک های کوت شده با آنتی هیومن IgM جذب شده و سپس برای تشخیص، از آنتی ژن اختصاصی مربوطه که توسط آنزیم نشاندار شده است (و یا آنتی ژن و آنتی بادی نشاندار ضد آن بصورت توامان) استفاده می شود.

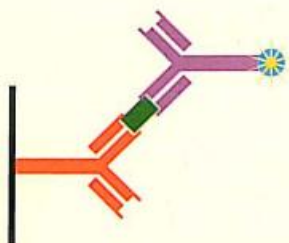
### ۳- الایزای ساندویچ

روش ساندویچ الایزا خود به دو دسته تقسیم می شود:

#### الف) روش Ab Sandwich یا Ag Capture

در این روش یک آنتی ژن در بین دو آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد، این روش شایعترین روش الایزا محسوب می شود، در این روش از یک آنتی بادی برای به دام انداختن آنتی ژن بر روی چاهکهای الایزا استفاده می شود و آنتی بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده است به عنوان شناساگر عمل می کند.

قابل ذکر است که در این روش آنتی ژن باید دارای حداقل دو ناحیه آنتی ژنیک باشد تا قادر به اتصال به هر دو آنتی بادی باشد، مثالهای بارز این روش اندازه گیری TSH, LH, FSH, PSA, HCG، و... است. (شکل ۳)



شکل ۳

#### ب) روش Antibody Capture

##### Direct Ab Capture or Ag Sandwich -a

این روش برای تعیین سنجش آنتی بادی مورد استفاده قرار می گیرد بدین صورت که از یک آنتی ژن کوت شده بر روی فاز جامد 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 نشاندار می باشد، در نتیجه آنتی بادی اختصاصی در بین دو آنتی ژن ساندویچ می گردد. (شکل ۴)

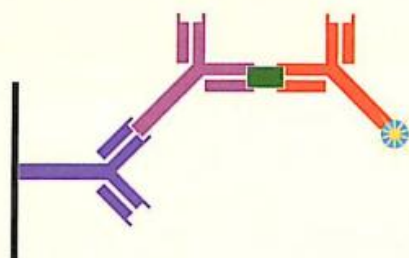


شکل ۴

در این روش تعیین آنتی بادی توتال از هر کلاس ایمونوگلوبولین میسر است و یکی از اختصاصی ترین و حساس ترین روشها برای تشخیص آنتی بادی در نمونه است. مثال بارز این روش کیت اندازه گیری آنتی بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس و تریپونما پالیدوم و HBS Ab می باشد.

##### Indirect Ag Sandwich or Indirect Ab Capture - b

در این روش پس از به دام انداختن آنتی بادی توسط آنتی هیومن گلوبولین کوت شده در کف چاهکها با اضافه کردن آنتی ژن اختصاصی و تشکیل کمپلکس، از یک آنتی بادی اختصاصی نشاندار بر علیه آنتی ژن به عنوان سیستم شناساگر استفاده می شود. (شکل ۵)



شکل ۵

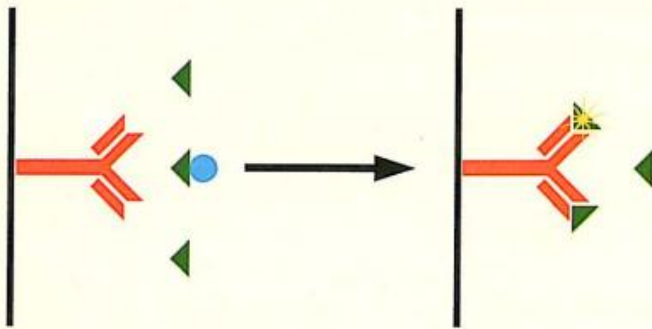
### ۴- الایزای رقابتی یا مهارتی

در روشهای رقابتی اساس سنجش بر رقابت دو آنتی ژن یا دو آنتی بادی (که یکی از آن دونشاندار است) برای اتصال به لیگاند با مقدار محدود

استوار است. اگر هر دو آنالیت نشاندار و غیرنشاندار با هم به سیستم اضافه شوند روش رقابتی می نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهارتی یا بلاکینگ می نامند. در روش مهارتی ممکن است در بین دو مرحله و قبل از اضافه نمودن آنالیت بعدی شستشو انجام شود یا انجام نشود، مثال بارز روشهای رقابتی و مهارتی سنجش T4 و T3 می باشد. انواع روش های رقابتی عبارتند از:

### الف) روش رقابتی یا مهارى برای آنتى ژن:

اساس این روش بر رقابت بین آنتى ژن نشاندار و آنتى ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتى بادی اختصاصی کوت شده در چاهک استوار است. در این روش مقدار آنتى بادی کوت شده باید محدود باشد و ملکول سیگنال دهنده همان آنتى ژن نشاندار است، اساس RIA و EIA کلا سیک بر همین روش استوار است. ( شکل ۶ )



شکل ۶

در این روش منحنی پاسخ-دوز به صورت معکوس خواهد بود، بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور مقادیر زیادی از آنالیت غیر نشاندار موجود در نمونه به مقدار کمتری به آنتى

بادی متصل می شود و در نتیجه سیگنال کمتری هم بوجود خواهد آمد.

محدوده تعیین آنالیت با این روش ممکن است بوسیله استفاده از مولکول نشاندار با فعالیت اختصاصی زیاد تقویت شود اما حداقل مقدار قابل تشخیص (کمترین مقدار از آنالیت که قابل تشخیص خواهد بود) توسط تمایل آنتى بادی مورد استفاده تعیین می شود، با این وجود غلظت‌های خیلی کم از هاپتن‌ها عموماً توسط همین روش قابل تعیین اند و حساس ترین روشی است که می تواند مقدار کمتر از fmol را هم تشخیص دهد.

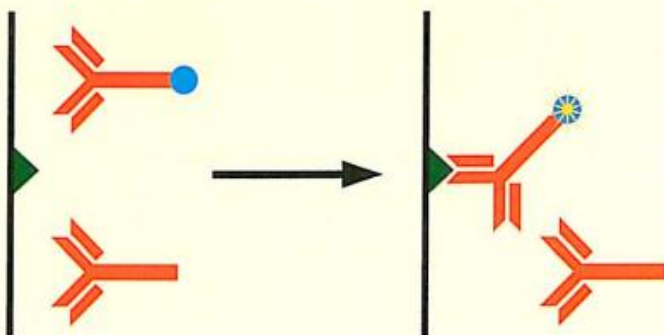
در برخی از موارد نشاندار کردن روی خصوصیات هاپتن اثر می گذارد در نتیجه در روش رقابتی برای تعیین آنتى ژن از یک آنتى بادی نشاندار استفاده می شود، در این نوع از سنجش‌ها این مطلب ضروری است که فاز جامد توسط آنتى ژن با مقدار کم و ثابت پوشیده می شود، در این روش آنالیت موجود در نمونه با آنالیت کوت شده در چاهک برای اتصال به آنتى بادی نشاندار رقابت می کند. در اینجا هم منحنی استاندارد معکوس است، از این روش بیشتر برای سنجش ایمنی به روش کمی لومینسانس استفاده می شود.

### ب) روش رقابتی برای آنتى بادی:

در این روش رقابت بین دو آنتى بادی یکی در نمونه به صورت غیر نشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برای اتصال به یک آنتى ژن کوت شده در چاهک صورت می پذیرد، بدیهی است که هر چه مقدار آنتى بادی در نمونه بیشتر باشد آنتى 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 برای این روش اندازه گیری آنتى بادی بر ضد HBc (HBc Ab) است.

( شکل ۷ )



شکل ۷

## دستگاهها و تجهیزات مورد استفاده در الایزا

در آزمایشگاههای تشخیص طبی، دستگاهها و وسایل مختلفی برای انجام آزمایشات سنجش ایمنی مورد استفاده قرار می گیرند که دانستن چگونگی بکارگیری و کالیبراسیون آنها از اهمیت فوق العاده ای برخوردار می باشد. این وسایل و دستگاهها شامل انواع سمپلرها و تقسیم کننده ها، وسایل شستشو و دستگاه خوانشگر الایزا می باشند.

### سمپلرها و تقسیم کننده ها (Pipettes & Dispensers)

#### سمپلرها:

سمپلرهای بکار رفته در سنجش ایمنی معمولاً به صورت تک، ۸ و ۱۲ کاناله می باشند و برای استفاده از آنها از نوکهای یکبار مصرف استفاده می گردد. در سمپلرهای چند کاناله هر کانال دارای یک پیستون بوده و برای کالیبراسیون نیز باید هر یک از کانالها به صورت جدا بررسی و کالیبره شوند. نوکهای یکبار مصرف نیز در کیفیت و اندازه با یکدیگر متفاوت بوده و باید در موقع انتخاب به این مسئله توجه شود.

#### تقسیم کننده ها (Dispensers)

تقسیم کننده های اتوماتیک نیز بصورت تک و ۹۶ کاناله می باشند که استفاده از آنها زیاد شایع نیست.

### مسائل و مشکلات مربوط به سمپلرها و تقسیم کننده ها

۱. نتایج غیر قابل انتظار بالا و یا پایین : این نوع مشکلات را می توان در یک ردیف و یا یک ستون از پلیت الایزا مشاهده کرد. اغلب نیز این نتایج ناشی از کالیبره نبودن یک و یا چند کانال و یا مسدود شدن کانالها می باشد. دلایل دیگر برای این مسئله می توانند نشت از پیستون و یافیت نبودن نوک سمپلر می باشند.

۲. وجود تغییرات زیاد در خوانده ها: این نوع مشکلات معمولاً ناشی از عدم فیت بودن صحیح نوک سمپلر و وجود پیستونهای دارای نشت می باشند. در مورد تقسیم کننده های اتوماتیک وجود پمپی که نشت داشته و یا لوله هایی که درست فیت نشده اند نیز می توانند باعث بروز این مشکل گردند.

۳. خوانده های غیر قابل انتظار در چاهک ها: این مشکل گاهی در اثر استفاده از سمپلرهای اتفاقی می افتد که هم برای تقسیم کردن کونزوگه و هم اسید بکار رفته اند و پیستون و یا سر آنها به اسید آغشته شده است. این مشکل بصورت تصادفی و با خوانده های غیر منتظره پایین در تعداد اندکی از چاهکها خود را نشان می دهد. علت این مسئله نیز بخار اسید است که در پیستون وجود دارد. اسید باعث کاهش فعالیت آنزیم کونزوگه شده و نتایج افت خواهند نمود. آلودگی زیاد با اسید حتی می تواند منجر به تاثیر بر روی سوبسترا نیز شود. به منظور چک نمودن اینکه آیا پیستون سمپلر به اسید آلوده شده یا خیر، چند میکرولیتر آب مقطر با نوک سر سمپلر کشیده و آنرا بر روی کاغذ PH بچکانید تا این مسئله آشکار شود.

۵. کالیبراسیون پی پت ها و تقسیم کننده ها : صحت کار سمپلر و تقسیم کننده در نتایج کلی سنجش ایمنی از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. همانند سایر دستگاهها، سمپلر و تقسیم کننده ها نیز باید به صورت متناوب (معمولاً هر سه ماه یکبار) کالیبره شوند.

دو روش کالیبراسیون برای سمپلرها و تقسیم کننده ها وجود دارد:

## ۱. کالیبراسیون بر اساس روش وزنی (Weighting or Gravimetric Method)

این روش در سمپلرهایی که دارای ظرفیت حجمی ۲۰۰ میکرولیتر به بالا هستند قابل انجام است. در این روش ظرفی را بر روی ترازو قرار داده و ترازو را صفر می‌نمائیم. سپس دمای مقداری آب مقطر را مشخص نموده و با استفاده از

سمپلر مورد آزمایش آن را درون ظرف ترازو ریخته و وزن آن را مشخص می‌نمائیم. این عمل تا بیست بار انجام شده سپس میانگین وزن ها، انحراف معیار و ضریب تغییرات را محاسبه می‌نمائیم. چنانچه میزان ضریب تغییرات (CV) بیش از ۳٪ باشد، این سمپلر از دقت کافی برخوردار نبوده و قابل استفاده نمی‌باشد. در مرحله دوم برای پی بردن به صحت سمپلر میانگین وزنهای بدست آمده را در فاکتور تصحیحی (Correction Factor) که برای تبدیل وزن به حجم بر اساس دمای آب مقطر و فشار هوای محل بدست می‌آید ضرب می‌نمائیم. سپس اختلاف حجم بدست آمده با حجم اعلام شده برای سمپلر را بدست آورده آنرا بر حجم اعلام شده تقسیم می‌کنیم. این مقدار، مقدار واقعی انحراف بود و حد آن نباید از ۵ درصد بیشتر باشد. مجموع دقت و صحت که تحت عنوان خطای کل (Total error) می‌باشد نیز نباید از ۸ درصد بیشتر باشد.

نکاتی که باید در ارتباط با این روش رعایت نمود عبارتند از :

- دمای اتاق در حین آزمایش باید مابین  $20^{\circ}\text{C}$  -  $25^{\circ}\text{C}$  با اختلاف  $0.5^{\circ}\text{C}$  و رطوبت در حد ۶۰-۹۰٪ باشد.
- نور آفتاب نباید مستقیماً بر روی سمپلر و یا آب بتابد و دمای آب و محل باید با نوک سمپلرها یکسان باشد.
- ترازو در محلی عاری از لرزش و کنترل شده از نظر دما باشد.
- آب مورد استفاده باید فاقد گاز، دو بار تقطیر و هم دمای اتاق باشد.

## ۲. روش رنگ سنجی (Spectrophotometric or Colorimetric Method)

این روش در مورد کالیبراسیون کلیه سمپلرها کاربرد دارد. اساس کار در این روش تهیه یک رنگ استاندارد می‌باشد. معمولاً از رنگ سبز خوراکی و یا رنگهای دیگر همچون پارا نیترو فیل (PNP) استفاده می‌شود. روش کار به این صورت می‌باشد که بعنوان مثال برای سمپلر ۵۰ میکرولیتری، ۱۰ لوله تمیز انتخاب نموده و در هر یک ۵ میلی لیتر آب ریخته، سپس به کمک سمپلر، ۵۰ میکرو لیتر از محلول رنگ غلیظ (Stock) که از پودر رنگ اصلی تهیه شده اضافه می‌کنیم. سپس خوب لوله ها را مخلوط کرده و در طول موج مشخص برای هر رنگ با بلانک آب مقطر قرائت می‌کنیم.

میانگین، انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) کل لوله ها را محاسبه می‌نمائیم. CV بدست آمده نماینده دقت سمپلر می‌باشد. برای بررسی صحت سمپلرها با این روش نیاز به وسایل حجمی صحیح می‌باشد که در این بین پی‌پت و بالن ژوژه کلاس A دارای صحت کافی می‌باشند.

در این قسمت نیز دقیقاً با رقتی که نمونه رنگ را در داخل لوله ها رقیق نموده ایم (۱:۱۰۱) رنگ را با استفاده از پی‌پت و بالن ژوژه کلاس A رقیق می‌کنیم و در طول موج  $630\text{nm}$  با بلانک آب مقطر قرائت انجام می‌گیرد. حال مقدار جذب نوری بدست آمده را بعنوان مقدار رفرانس تلقی نموده و جذب نوری بدست آمده از سمپلر را از این مقدار کم نموده و نتیجه حاصل را بر جذب نوری رفرانس تقسیم می‌کنیم، مقدار اختلاف نشاندهنده عدم صحت سمپلر می‌باشد. با ضرب نمودن این اختلاف در عدد ۱۰۰، درصد سوگرایی (Bias) بدست می‌آید. جهت محاسبه خطای کل (Total error) نیز میتوان درصد سوگرایی را با مقدار بدست آمده از دقت سمپلر (CV%) جمع نمود.

در زیر روش استاندارد ساخت رنگهای روتین مورد استفاده در کالیبراسیون سمپلرها ارائه گردیده است:

### رنگ سبز خوراکی:

ابتدا بسته به نوع سمپلر با حل نمودن مقادیر خاص از پودر رنگ سبز خوراکی در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر غلظت‌های ذیل را تهیه می‌کنیم:

برای سمپلرهای با حجم کمتر از ۱۰ میکرولیتر: ۱۵۵۰mg/dl

برای سمپلرهای با حجم ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر: ۱۵۵mg/dl

برای سمپلرهای با حجم ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر: ۱۵/۵mg/dl

سپس طبق روش ارائه شده فوق نمونه‌ها را آماده نموده و جذب نوری آنها را در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت می‌کنیم.

### رنگ پارا نیترو فنل (PNP):

ابتدا باید استوک غلیظ رنگ را در سود ۰/۰۱ نرمال تهیه نمود (مثلاً غلظت ۴/۲gr/dl)، سپس از استوک تهیه شده بسته به نوع سمپلر غلظت‌های ذیل را در آب مقطر تهیه می‌نمائیم.

برای سمپلرهای با حجم کمتر از ۱۰ میکرولیتر: ۴۲۰mg/dl

برای سمپلرهای با حجم ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر: ۴۲mg/dl

برای سمپلرهای با حجم ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر: ۴/۲mg/dl

سپس طبق روش ارائه شده فوق نمونه‌ها را آماده نموده و جذب نوری آنها را در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت می‌کنیم.

### کالیبراسیون سمپلرهای ثابت و متغیر

در سمپلرهای ثابت، حجم عنوان شده برای سمپلر مورد بررسی قرار می‌گیرد و در سمپلرهای متغیر معمولاً در سه حجم سمپلر شامل: ۵۰٪ حجم نهایی، کمتر از ۱۰٪ حجم نهایی و حجم اصلی یا نهایی سمپلر، بررسی صورت می‌پذیرد.

## حفظ و نگهداری سمپلرها

### نگهداری روزانه

بطور استاندارد باید روزانه سمپلرها و تقسیم کننده ها را به منظور افزایش عمر کاری و کارکرد مناسب آنها تمیز نمود. در مواردیکه سمپلر مشکوک به آلوده شدن پیستونهاست باید آن را باز و تمیز نمود. همچنین به هیچ وجه نباید در پایان کار نوک سمپلر به آنها متصل باقی بماند. تقسیم کننده را نیز در پایان کار باید با آب مقطر تمیز کرد و سر آنها را حتی المقدور خشک نمود تا بافر یا نمک در آنها خشک نشده و رسوب ننماید. سمپلرها در فواصل مشخص بسته به مقدار استفاده از آنها باید باز شده و تمیز شوند، پیستون آنها گریس خورده و حلقه های آنها در صورت لزوم تعویض شوند. قسمتی که نوک به آن متصل می شود از نظر خراشیدگی و شکستگی چک شود تا باعث هیچگونه نشستی نشود. در پایان این مراحل نیز باید پی پت ها و یا تقسیم کننده ها را مجدداً کالیبره نمود.

### وسایل شستشو

شستشو به دو صورت دستی و اتوماتیک صورت می گیرد.

#### ۱. شستشوی دستی

ساده ترین روش برای شستشو ریختن مایع شستشو با سمپلر به داخل چاهکها و در ادامه خالی کردن آنها به داخل سینک می باشد. ولی این روش وقتی که تعداد پلیت ها زیاد باشد بسیار طاقت فرسا است. از سوی دیگر، امروزه دستگاههای شوینده ۸ و یا ۱۲ کاناله که به پمپ اتصال می یابند وارد بازار شده اند که عموماً نیز دارای دو نوع سوزن (Needle) می باشند، یکی برای ریختن و دیگری برای خالی کردن محلول شستشو. این دستگاهها بسیار موثر و تقریباً سریع بوده و توسط افراد مجرب مورد استفاده قرار می گیرند.

#### ۲- شستشوی اتوماتیک

دستگاههای اتوماتیک به اشکال مختلفی وجود دارند. برخی از آنها ۸ یا ۱۲ کاناله بوده و برخی دیگر کل پلیت را شستشو می دهند. بعضی از این دستگاهها تک سوزنه و بعضی دو سوزنه هستند که در انواع تک سوزنه تمامی اقدامات توسط همان سوزن صورت می گیرد. ولی در دستگاههای دو سوزنه یک سوزن بطور دائم در حال مکش

است تا چنانچه مایع شوینده بیشتری در هنگام پر کردن وارد چاهک ها شد، آنرا خالی نماید.

### مشکلات مرتبط با شستشو

شستشو به عنوان یکی از مهمترین مراحل در الیزا تلقی شده و غیر از ترکیبات محلول شستشو نکات دیگری نیز باید در رابطه با آن مد نظر قرار گیرد. مشکلات ناشی از شستشو به سختی قابل تشخیص می باشند و تنها با خواننده هایی که به صورت اتفاقی خیلی بالا و یا پایین باشند، مشخص می شوند. اغلب تنها راه آسان و سریع برای رفع این نوع مشکلات کالیبره کردن مجدد دستگاه شوینده است.

نکاتی که در ارتباط با شستشو از اهمیت زیادی برخوردارند عبارتند از :

۱. حجم و فشار مایع شستشو که تغییر در هر یک باعث تغییر در نتایج خواهد شد.
۲. فشار مکشی که برای خالی کردن چاهکها بکار می رود باید بخوبی تنظیم شده باشد. اگر فشار مکش خیلی زیاد باشد می تواند منجر به تغییرات زیاد نتایج از یک چاهک تا چاهک دیگر شود و اگر این مقدار کم باشد بعضی از چاهکها خالی نشده و نتایج بالائی قرائت خواهد شد.
۳. زمان تخلیه یا آسپیره کردن : این زمان نیز از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. در صورتی که زمان آسپیراسیون کوتاه باشد امکان این وجود دارد که چاهکها بطور کامل تخلیه نشوند و مقداری از مایع درون چاهکها باقی بماند از سوی دیگر در صورت طولانی شدن زمان آسپیراسیون ممکن است به علت تخلیه طولانی مدت، چاهکها خشک شوند، این مسائل می توانند سبب ایجاد خطا در نتایج آزمایش شوند.
۴. تنظیم سوزن های آسپیراسیون : باید فاصله این سوزن ها تا ته چاهکها یکسان بوده و حدود  $0.5\text{mm} - 0.3\text{mm}$  باشد. این سوزن ها نباید با کف چاهکها تماس حاصل نمایند، چون می توانند مانع از عمل مکش گردند.
۵. مسدود بودن سوزنهای مکش و یا سوزن های تخلیه: معمولاً در این مورد یکسری از چاهکها بصورت مشابه از شستشوی ناکافی، برخوردار می شوند.

### کالیبراسیون دستگاه شستشو

کالیبراسیون این نوع دستگاهها حقیقتاً یک نوع کالیبراسیون نیست، بلکه تنظیم پارامترها و یا اعمال مختلف دستگاه می باشد. نکات کلی که در این مورد وجود دارد عبارتست از :

۱. حجم مایع ریخته شده درون چاهکها : این مقدار باید در ماکزیمم حد ممکن تنظیم شده (بر اساس توصیه سازنده کیت) و دقت شود که تمامی چاهکها بصورت یکسان پر شده باشند.
۲. فشار مکش : اکثراً دستگاهها در فشار مکش ۶۰-۷۰ درصد خوب کار می کنند.
۳. زمان آسپیراسیون : این زمان باید به گونه ای تنظیم شود تا مایع داخل چاهکها کاملاً خالی شود و چنانچه بیش از این مقدار تنظیم شود منجر به خشک شدن چاهکها می شود.
۴. تنظیم عمق سوزن های آسپیراسیون : عمق مناسب حدود  $0.5\text{mm} - 0.3\text{mm}$  بالای کف چاهکها است.
۵. تنظیم افقی سوزن ها: در پلیتهایی که چاهکهای آنها صاف می باشند (F wells & C wells) سوزنها باید نزدیک دیواره قرار گیرند و در انواعی که کف چاهک گرد است، (U wells) سوزنها باید در مرکز چاهکها قرار گیرند.

## حفظ و نگهداری دستگاه

روزانه دستگاه را جهت درستی حجم تخلیه، بازده آسپیراسیون و تمیز بودن سوزنهای آن چک نمایید. پس از استفاده روزانه باید با آب مقطر چند بار عمل شستشو را انجام داد تا نمک در لوله ها یا سوزنهای آن رسوب نکند. در زمانهای مشخص نیز دستگاه باید باز شده و لوله ها از نظر نشت چک شوند. قسمت‌های مکانیکی تمیز و روغن کاری شوند و دستگاه مجدداً تنظیم گردد.

## الایزایدر یا خوانشگر الایزا (ELISA Reader)

امروزه انواع مختلفی از خوانشگرها برای پلیتهای الایزا در بازار موجود می باشند. اکثر این خوانشگرها یک ستونی و یا ۹۶ خانه (یک پلیتی) بوده و اکثراً اتوماتیک و تعداد اندکی نیز دستی هستند.

بسیاری از این دستگاهها در قسمت سیستم نوری خود از فیبرهای نوری بهره می برند و سیستم تک موج یا دو موج (Dual beam) در آنها بکار گرفته شده است. خوانشگرهای دو موج از مزیت تصحیح جذب نوری برخوردارند و در آنها نقصهای ناشی از سیستم نوری، تغییرات چاهک به چاهک و حجم نهایی چاهکها بطور اتوماتیک بر طرف میگردد. این عمل توسط نوع خاصی از فیلتر تحت عنوان فیلترهای افتراقی (Differential Filters) صورت می گیرد. در دستگاههای خوانشگر انتخاب طول موج توسط فیلترها و یا گریدها صورت می گیرد. گریدها ساختارهای خاصی هستند که با تابیده شدن نور به آنها، تنها نور با طول موج خاصی از آنها ساطع می شود.

## مشکلات مرتبط با دستگاه خوانشگر الایزا

عمده ترین مشکلات ناشی از دستگاههای خوانشگر الایزا عبارتند از:

۱. عدم هر گونه قرائت جذب نوری : این مسئله می تواند ناشی از سوختن لامپ دستگاه باشد.
۲. تغییرات غیر قابل انتظار از چاهک به چاهک و یا از ردیف به ردیف دیگر: این مسئله می تواند ناشی از کثیف بودن حسگرها، کثیفی لنزهای دستگاه، کالیبراسیون نامناسب یک یا چند کانال دستگاه و یا ناپایداری لامپ دستگاه باشد.
۳. کاهش یا افزایش تدریجی جذب نوری از یک ستون به ستون دیگر: این مشکل می تواند ناشی از عدم کالیبراسیون موتوری باشد که پلیت را جابجا می نماید. در این موارد بجای عبور نور از مرکز نمونه (حالت مقعر)، نور از کناره های آنها و یا جداره چاهکها عبور می کند.
۴. جذب نوری بسیار پایین : این مشکل می تواند ناشی از استفاده از طول موج اشتباه باشد.

### کالیبراسیون دستگاه خوانشگر الیزا

برای کالیبراسیون دستگاههای خوانشگر الیزا نیاز به فیلترهای خاصی می باشد. این فیلترها که مشهور به Grey Filters هستند را می توان برای کالیبراسیون هر یک از طول موجهای دستگاه بکار برد. اغلب این فیلترها دارای سه میزان مختلف جذب نوری پایین، متوسط و بالا هستند و مقدار ۲ تا ۳ طول موج مختلف در آنها مشخص شده است. اگر در زمان کالیبراسیون با این فیلترها تغییراتی در کانالها دیده شد، باید فیلتر را از دستگاه خارج و آنرا ۱۸۰ درجه چرخاند و مجدداً به دستگاه داد تا مطمئن شد تغییرات مشاهده شده ناشی از مشکل فیلتر نیست. چنانچه به این نوع فیلترها دسترسی نداشتید می توانید از یک محلول رنگی که آنرا به مقدار یکسان درون چاهکها می ریزید، استفاده کنید. در این حالت جذب نوری را بخوانید و سپس پلیت را بیرون آورده مجدداً ۱۸۰ درجه بچرخانید و دوباره جذب نوری را قرائت کنید. چنانچه در هر دو حالت جذب نوریها یکسان بود، دستگاه کالیبره می باشد.

جهت بررسی کالیبره بودن موتوری که پلیت را جا به جا می کند، می توان از یک پلیت خالی استفاده نمود. در این حالت چنانچه بین جذب نوری خوانده شده برای ستون اول با ستون آخر اختلاف معنی داری وجود نداشت می توان به سالم بودن و کالیبره بودن موتور پی برد.

### حفظ و نگهداری دستگاه خوانشگر الیزا

نگهداری روزانه : برای کنترل روزانه دستگاه باید در هر روز طبق دستور سازنده دستگاه را کنترل نمود و در صورت نیاز آنرا تمیز کرد. برای امتحان کالیبره بودن دستگاه آنرا ۳۰ دقیقه روشن گذاشته، یکبار عمل خواندن را با یک پلیت خالی انجام داده که می بایست نتایج یکسانی در OD کل چاهکها دیده شود و بار دیگر پلیت پر را بخوانید، خوانده ها در این حالت نیز میبایست در کل چاهکها یکسان باشند. اگر نتایج در هر مرحله در تمامی ستونها یکسان نبوند، پلیت ها را بیرون آورده و ۱۸۰ درجه بچرخانید و دوباره آنها را بخوانید تا مشخص شود آیا مشکل مربوط به دستگاه است یا پلیت. در صورتیکه مشکل مربوط به دستگاه باشد دقیقاً در همان ستون یا چاهکی که مشکل قبلاً وجود داشته مجدداً مشاهده خواهد شد.

در زمانهای مشخص خوانشگرها را باید کالیبره کرد و پایداری لامپ آنها را چک نمود. فیبرهای نوری و حمل کننده پلیت نیز باید مورد بازدید قرار گرفته و در صورت نیاز تمیز شوند. پس از هر بازدید و تعمیر نیز دستگاه باید کالیبره شود.

## شاخصهای اجرایی در کیت‌های الایزا

### مقدمه

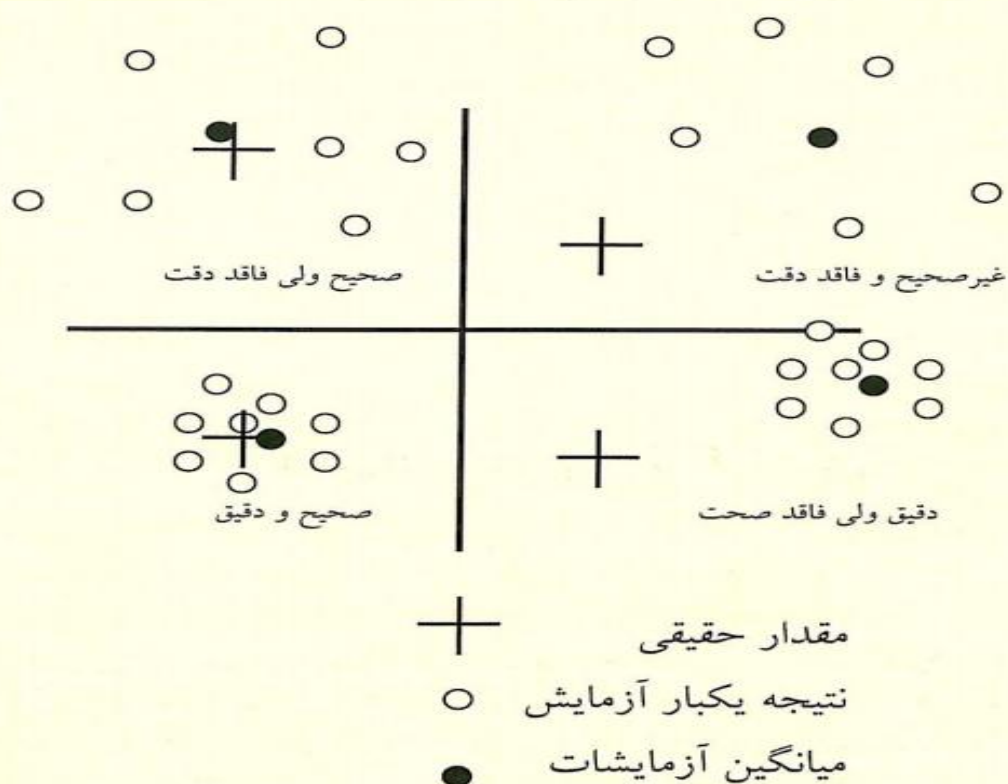
نخستین گام در ارزیابی کیت‌های الایزا و یا هر محصول آزمایشگاهی، تعیین شاخصهای اجرایی برای آن می باشد. این شاخصها از نظر تعریف شامل کلیه آزمایشاتی میباشند که دقیق و صحیح بودن عملکرد یک کیت را نشان میدهند. بسته به کمی یا کیفی بودن کیت‌های الایزا این شاخصها متفاوت میباشند. در کیت‌های کمی در مرحله نخست پس از اطمینان از درست بودن منحنی استاندارد کیت و منطبق بودن آن با منحنی معرفی شده از سوی سازنده، اقدام به بررسی شاخصهای اجرایی می نمایند. این شاخصها بترتیب عبارتند از:

۱. دقت یا بررسی تکرار پذیری کیت Precision

۲. صحت یا بررسی صحیح بودن Accuracy

۳. حساسیت

برای فهم بهتر دقت و صحت به شکل ۱ دقت فرمایید.



شکل ۱. مقایسه مابین دقت و صحت

## دقت (Precision)

نخستین معیار مهم در شاخصهای اجرایی مسئله دقت در کیت‌های آزمایشگاهی است. دقت به معنی تکرار پذیری یک آزمایش میباشد. برای محاسبه آن در اولین مرحله نیاز به تهیه یک نمونه ثابت داریم. این نمونه میتواند سرم پول یا مخلوط سرمی، سرم کنترل تجارتي، سرم کنترل کیت و یا هر نمونه ای باشد که مقدار ثابت یا پایداری داشته باشد. دومین نکته ای که میبایست به آن توجه شود این است که بهتراست به جای یک نمونه، سه نمونه را بصورت جدا مورد آزمایش قرار داد. این سه نمونه در اصل در برگیرنده مقادیر پایین، متوسط و بالای آنالیت مورد نظر ما خواهند بود و این اطمینان را به ما میدهند که در این سه طیف، کیت دارای نتایج تکرارپذیری است.

پس از تهیه نمونه دومین اقدام، تعریف سطح تکرار پذیری یا در اصل طبقه بندی دقت میباشد. از همین رو دقت را میتوان به انواع مختلفی طبقه بندی کرد:

۱. درون سنجی ۲. میان سنجی ۳. مابین سری و غیرو

### ۱. درون سنجی (Intra-assay)

در این نوع دقت میبایست با یک نمونه وضعیت تکرار پذیری را در طی یک آزمایش کاری و درون یک پلیت مورد ارزیابی قرار داد. این نوع دقت توانایی یک روش را برای تعیین مقدار یک نمونه در یک آزمایش ارزیابی می نماید. برای انجام این کار چندین استریپ از یک پلیت را با یک نمونه مورد آزمایش قرار میدهیم (حداقل ۲۰ بار) و نتایج حاصله را ثبت می نماییم. جهت محاسبه میبایست دقت نمود تا از غلظت بدست آمده و نه از OD جهت محاسبات استفاده نمود. از همین رو نخست میانگین کلیه غلظتها (X) را محاسبه نموده و انحراف استاندارد (STD) آنها را

بدست می آوریم. با تقسیم انحراف استاندارد بر میانگین و ضرب آن در عدد ۱۰۰، ضریب تغییرات (CV%) بدست می آید که نشاندهنده میزان پراکندگی نتایج بدست آمده میباشد.

$$CV \% = \frac{STD}{X} \times 100$$

با ترسیم ضریب تغییرات در غلظتهای مختلف میتوان منحنی بدست آورد که آنرا گزارش دقت (Precision profile) می نامند و میتوان از آن برای تعیین طیف کاری که بیشترین میزان تکرار پذیری را دارا باشد استفاده نمود.

### ۲. میان سنجی (Inter-assay)

اهمیت این نوع دقت در این نکته میباشد که توانایی یک روش را در تعیین مقدار یک نمونه در طی آزمایشات متعدد می سنجد.

برای تعیین این نوع دقت دو راه وجود دارد:

۱. روش نخست در طی دو آزمایش مختلف در طی یک روز و با فاصله ۲ ساعت از یکدیگر انجام میگردد. برای انجام این نوع دقت که مشهور به دقت مابین آزمایشی (Between-Run Precision) میباشد میبایست در هر بار انجام آزمایش هر نمونه را چهار بار مورد آزمایش قرار داد و محاسبات نیز همانند قبل انجام میگردد.

۲. در روش دوم مابین روزهای مختلف نتیجه آزمایش را بررسی میکنیم (Between-Day Precision).

در این روش نیز نمونه مورد آزمایش در هر بار انجام آزمایش میبایست چهار بار تست شود و بمدت ۲۰-۵ روز آزمایشات انجام گیرند.

انواع دیگری از دقت نیز وجود دارد همچون دقت مابین سری که دقت یک نوع کیت را در بین سریهای مختلف ساخت مورد ارزیابی قرار می دهد.

## صحت (Accuracy)

صحت در اصل بیانگر مقدار واقعی یک آزمایش میباشد و میزان نزدیک بودن میانگین آنالیت اندازه گیری شده را با مقدار واقعی آن مورد بررسی قرار میدهد. به اختلاف حاصل از این دو، عدم صحت یا سوگرایی یا Bias می‌گویند.

### ۱. تست همبستگی (Correlation)

جهت تعیین صحت بهترین روش مقایسه نتایج بدست آمده از کیت با مقادیر شناخته شده رفرانس یا مرجع میباشد. آزمایشی که در آن این اقدام صورت میگیرد تحت عنوان تست همبستگی شناخته میشود. جهت انجام این آزمایش میبایست از حداقل ۴۰ نمونه سرم که دربرگیرنده طیف طبیعی آنالیت میباشد استفاده نمود. نمونه ها را بصورت دوتایی، هم با روش رفرانس و هم با کیت موجود تحت بررسی قرار می‌دهیم. جهت بررسی نیز میتوان از یکسری فاکتورهای آماری استفاده نمود. فاکتورهای آماری همچون شیب منحنی (m)، ضریب همبستگی (r) و تلاقی عرض از مبدا (Y intercept) پارامترهای آماری میباشند که جهت بررسی همبستگی قابل استفاده هستند.

### ۲. تست بازیافت (Recovery)

در صورتیکه روش مرجعی برای بررسی صحت وجود نداشته باشد از روشهای غیر مستقیم همچون Recovery میتوان استفاده نمود. در این روش توانایی یک آزمایش در تعیین مقدار مشخص افزوده شده به یک نمونه سنجیده میشود. جهت انجام این آزمایش به دو چیز نیاز میباشد:

۱. مقدار غلیظی از آنالیت تحت بررسی تا بتوان با افزودن مقدار اندکی از آن به نمونه، آزمایش را انجام داد.
۲. دو یا سه نمونه مختلف بیمار یا مخلوط سرمی که مقدار آنالیت در آنها مشخص باشد و طیف کامل طبیعی آنالیت را پوشش دهند. این نمونه ها در اصل مقدار پایه خواهند بود.

برای انجام این آزمایش میبایست اقدامات زیر را انجام داد:

ابتدا باید هر یک از سه نمونه را بدو قسمت تقسیم کنیم و یکی را بعنوان شاهد و دیگری را بعنوان تست منظور نماییم. به تست مقدار مشخصی از آنالیت و به لوله شاهد نیز به همان میزان لوله تست از محلول عاری از آنالیت همچون محلول استاندارد صفر اضافه نموده و با انجام آزمایش بر روی نمونه ها از فرمول زیر برای محاسبه استفاده می‌نماییم:

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{غلظت پایه (مقدار اندازه گیری شده)}}{\text{مقدار اضافه شده}} \times 100$$

### ۳. تست خطی بودن (Linearity)

از این روش نیز میتوان برای تعیین صحت استفاده نمود. این روش با رقیق نمودن نمونه در حداقل پنج حد مختلف (۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪، ۲۵٪ و ۰٪) و انجام آزمایش بر روی آنها صورت میگیرد. با محاسبه ضریب رقت در غلظتهای بدست آمده میتوان صحیح بودن نتایج را بصورت یک خط مستقیم مشاهده نمود.

برای انجام این آزمایش یک نمونه سرمی که دارای مقادیر بالای آنالیت باشد را انتخاب نموده و از آن رقتهای مختلف در حد ۷۵٪ یا سه چهارم مقدار اولیه، ۵۰٪ یا یک دوم مقدار اولیه، ۲۵٪ یا یک چهارم مقدار اولیه تهیه می‌نماییم. سرم اولیه بعنوان رفرانس ۱۰۰ درصد و محلول رقیق کننده که در اکثریت موارد استاندارد صفر یا سرم عاری از آنالیت میباشد بعنوان رفرانس صفر، در آزمایشات خطی بودن مورد آزمایش قرار می‌گیرند.

#### ۴. بررسی تداخلات Interference

یکی از موارد مهم موثر بر روی صحت یک کیت مسئله تداخلات میباشد. تداخلات میتوانند هم باعث سوگرایی مثبت یا نتایج مثبت کاذب و هم سوگرایی منفی یا نتایج منفی کاذب در آزمایشات گردند. از عوامل مختلفی که باعث بروز تداخل میگردند میتوان به تاثیر هتروفیل آنتی بادی، فاکتور روماتوئیدی و اثر هوک اشاره نمود. آنتی بادیهای هتروفیل گروهی از آنتی بادیها هستند که در پی تماس مستقیم و یا غیر مستقیم با حیوانات در انسان ایجاد میشوند. این آنتی بادیها با چسبیدن به قسمتهای Fc ملکولهای آنتی بادی میتوانند باعث سوگرایی مثبت و منفی در آزمایشات گردند.

فاکتور روماتوئیدی از عوامل دیگر تداخل کننده محسوب میشود. جنس این فاکتور از جنس IgM بوده و بر علیه قسمت Fc ملکولهای IgG میباشد. این فاکتور را میتوان در بسیاری از بیماران مبتلا به بیماریهای خود ایمنی مشاهده نمود.

گاهاً در آزمایشات یک مرحله ای با فرمت ساندویچی که در نمونه مقدار بسیار زیادی از آنالیت وجود داشته باشد میتوان جوابهای منفی مشاهده نمود که به این پدیده اثر هوک (Hook Effect) اطلاق میگردد. مکانیسم این اثر بدین شکل میباشد که در آزمایشات ساندویچی یک مرحله ای با افزودن نمونه و آنتی بادی نشاندار شده بصورت همزمان، بدلیل وجود مقدار بسیار زیاد آنالیت، هر دو آنتی بادی (آنتی بادی نشاندار در محلول و آنتی بادی موجود در کف چاهکها) توسط ملکولهای آنالیت اشغال میگردند و امکان ایجاد پل رابط مابین آنتی بادی موجود در کف چاهک و آنتی بادی نشاندار در محلول از بین میرود. حاصل این مسئله مشاهده نتایج منفی کاذب در آزمایشات میباشد و بهترین مثال عملی آنرا نیز میتوان در خانمهای باردار دارای مقدار زیادی هورمون HCG دید. در این گروه از افراد چنانچه آزمایشات بصورت یک مرحله ای یعنی افزودن نمونه بیمار با کونزوگه صورت گیرد، احتمال مشاهده نتایج منفی کاذب وجود دارد. برای رفع این مشکل نیز میتوان با رقیق کردن نمونه مورد آزمایش و یا با دومرحله ای کردن آزمایشات تاثیر اثر هوک را از بین برد.

#### حساسیت (Sensitivity)

حساسیت بنا به تعریف به کمترین مقدار آنالیت که از صفر قابل تفکیک باشد اطلاق میگردد. حساسیت به دو گروه آنالیتی و عملکردی تقسیم بندی میشود.

#### حساسیت آنالیتی (Analytical Sensitivity)

در این نوع حساسیت که اکثر سازندگان کیتها از آن استفاده می نمایند، ۲۰ بار استاندارد صفر را مورد آزمایش قرار می دهند و ۲ انحراف استاندارد بالاتر (در تستهای ایمنومتریکی) و یا پایین تر (در تستهای رقابتی) را محاسبه می نمایند. جهت مشاهده این نتیجه میبایست حتماً به بروشور کیت مراجعه نمایید و چنانچه حساسیت یک کیت بطور مثال ۰/۲ IU/ml ذکر گردیده بود گزارشات نتیجه کمتر از این حد خطا میباشد.

#### حساسیت عملکردی (Functional Sensitivity)

این نوع حساسیت منطبق بر میزان دقت در نمونه هایی با مقادیر بسیار پایین میباشد. در این روش با رقیق نمودن نمونه یا سرم دارای مقدار پایین آنالیت و رسم منحنی Precision profile برای آن، غلظتی که در آن میزان دقت حداکثر به ضریب تغییرات (%CV) ۲۰ درصد رسیده باشد بعنوان حساسیت تلقی میگردد. جهت تعیین این نوع حساسیت میبایست نمونه سرم با غلظت پایین آنالیت را انتخاب نمود، از آن رقتهای مختلف تهیه کرد و بر روی هر رقت چندین بار آزمایش را انجام داد و ضریب تغییرات (%CV) را محاسبه نمود. کمترین مقداری از آنالیت که در آن ضریب تغییرات به کمتر از ۲۰ درصد رسیده باشد به عنوان حساسیت عملکردی تلقی میگردد.

## نکات عملی و حل مشکلات در تست‌های الایزا

### ۱- جمع آوری و نگهداری نمونه

تقریباً در تمام سنجش‌های ایمنی از سرم به عنوان نمونه استفاده می‌نمایند با این حال گاهی ممکن است آزمایشگر به دلایلی نظیر کافی نبودن میزان سرم و یا پرهیز از نمونه‌گیری مجدد از نمونه پلازما برای سنجش یک آنالیت استفاده نماید. در اینگونه موارد باید بروشور کیت به دقت بررسی شود تا نوع نمونه توصیه شده برای آن سنجش خاص مشخص گردد. بویژه اگر در کیت استفاده از پلازما نیز توصیه شده باشد باید مشخص شود که از چه نوع ماده ضد انعقادی می‌توان برای بدست آوردن پلازما استفاده کرد. اگر پلازما با استفاده از سیترات سدیم تهیه شده باشد به دلیل رقیق شدن پلازما ممکن است سنجش با صحت کافی انجام نشود. برخی از ضد انعقادها بر سنجش تاثیر سوء دارند برای مثال در استفاده از پلاسمایی که از EDTA به عنوان ضد انعقاد استفاده شده است باید با احتیاط برخورد شود. EDTA، یک شلات کننده قوی یونهای فلزی است و روی (Zn)، کوفاکتور آنزیم آلکالین فسفاتاز را مهار می‌نماید.

- فلورید سدیم که به عنوان نگهدارنده قند استفاده می‌شود می‌تواند فعالیت آنزیم اوره آز را مهار کند بنابراین در سنجش‌هایی که از آنزیم اوره آز به عنوان ماده نشانگر استفاده شده است تداخل می‌کند. علاوه بر این باید توجه داشت که سدیم آزاید یک مهار کننده قوی آنزیم پراکسیداز است و هرگز نباید در سنجش‌هایی که نشانگر آنزیمی آنها پراکسیداز است از نمونه حاوی سدیم آزاید استفاده شود.

- در هنگام گرفتن نمونه باید توجه شود که طولانی شدن بستن تورنیکه ممکن است منجر به تغییر در پروتئین‌های حامل در خون شود که این مسئله در سنجش برخی از آنالیت‌ها تاثیر می‌گذارد.

- گاهی لیپمی در سنجش برخی از آنالیت‌ها تداخل می‌نماید بویژه زمانی که آنالیت مورد سنجش یک مولکول آب‌گریز است. در این شرایط توزیع آنالیت بین دو فاز آب‌گریز و آب‌دوست به دلیل وجود لیپید مختل می‌شود. در مورد برخی از آنالیت‌ها که به پروتئین حامل متصل می‌شوند برخی از عناصر سرمی نظیر اسید چرب آزاد ممکن است در اتصال آنالیت به پروتئین حامل تداخل نمایند و سبب سنجش کاذب میزان آنالیت آزاد شوند. این اثر در سنجش هورمونهای تیروئیدی که بصورت آزاد در سرم وجود دارند اهمیت دارد بنابراین ممکن است که در اندازه‌گیری برخی از آنالیت‌ها وضعیت ناشتایی ضروری باشد.

- در زمان جداسازی سرم از لخته باید از ایجاد همولیز اجتناب شود چرا که همولیز می‌تواند یک عامل مداخله‌گر در سنجش‌های ایمنی آنزیمی باشد. هموگلوبین به دلیل ماهیت پروتئینی، فعالیت پراکسیدازی و همچنین به دلیل وجود مولکول آهن و هم (Heme) علاوه بر اثر تداخلی می‌تواند سرعت واکنش پراکسید هیدروژن و کروموزن را تسریع کند و بطور کاذب باعث افزایش جذب نوری شود. علاوه بر این هموگلوبین واکنش آنتی ژن و آنتی بادی را دستخوش تغییر می‌کند و زمان به تعادل رسیدن واکنش را افزایش می‌دهد. همولیز بویژه در سنجش هورمون T4 (Free T4) آزاد اثر دارد که سنجش آنرا بطور کاذب کاهش می‌دهد.

- در هنگام نمونه‌گیری باید به تغییرات روزانه، فیزیولوژیک و تاثیر داروها بر برخی از آنالیت‌ها توجه نمود.

- اکثر آنالیت‌های قابل اندازه‌گیری با روش سنجش ایمنی آنزیمی تا حدودی در درجه حرارت اتاق و یخچال (۸-۲۰ درجه) پایدار هستند. با این حال در مورد برخی از آنالیت‌ها نظیر ACTH و PTH باید نکات خاصی رعایت شود. برای مثال در مورد ACTH حداکثر زمان مجاز برای نگهداری نمونه پلازما بر روی خون ۲ ساعت توصیه شده است و در این حالت نیز باید حداکثر ظرف مدت ۳۰ دقیقه پس از نمونه‌گیری برای جداسازی پلازما عمل سانتریفوژ انجام شود. بهتر است که در صورت نگهداری پلازما روی خون به مدت بیشتر از ۲ ساعت این عمل در یخچال انجام شود. پایداری ACTH پس از جدا شدن از خون در یخچال و حتی در فریزر -۲۰ درجه مناسب نمی‌باشد و باید توجه داشت که نمونه پلازما برای سنجش ACTH باید در لوله‌های پلاستیکی نگهداری شود.

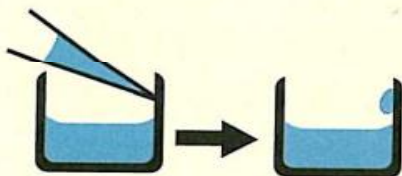
با این حال اغلب آنالیت ها نظیر TSH، T3، T4، PRL، FSH و LH در درجه حرارت یخچال تا یک هفته و در فریزر ۲۰- درجه تا چندین ماه پایدار می مانند.

- از دوباره ذوب و فریز کردن سرم باید پرهیز شود، اما برخی از آنالیت ها نسبت به فریز و ذوب شدن مجدد مقاوم هستند، مثلا پروژسترون کاهش ۱ درصدی را در هر بار فریز و ذوب شدن نشان می دهد. این امر در مورد تستوسترون نیز صادق است.

## ۲- نکات مهم در مورد نحوه صحیح کار با سمپلر

اضافه نمودن معرف ها و نمونه به چاهک های الایزا یکی از مهمترین عوامل در اجرای یک سنجش صحیح و دقیق است. با توجه به اینکه این عمل توسط سمپلر انجام می شود قبل از انجام هر آزمایش باید از کالیبره بودن سمپلر اطمینان حاصل شود.

برای استفاده بهینه از سمپلرها ۱۰ نکته می تواند مفید واقع شود. این نکات عبارتند از:



۱- پیش مرطوب کردن (Prewet) نوک سمپلرها: معمولا در سمپلرهایی که برای حجمهای بیش از ۱۰ میکرولیتر استفاده می شوند باید ۲ تا ۳ مرتبه نوک جدید را با نمونه پر و خالی نمود.

۲- در دمای اتاق کار کنید. کلیه مواد و وسایل باید به دمای اتاق برسند.

۳- معاینه نوک ها قبل از ریختن نمونه: به آرامی کناره های نوک را با دستمال تمیز کنید و مراقب باشید دستمال با نوک سر سمپلر تماس نیابد.

۴- روش استاندارد استفاده از سمپلر به کار رود. در مواردیکه نمونه ها غلیظ یا چسبنده باشند، از روش معکوس نیز می توان استفاده کرد که در آن ابتدا پیستون را تا انتها فشار داده نمونه راکشیده، بعد با فشردن تا اولین ایست نمونه را خالی می نماییم.

۵- توقف یکسان پس از هر بار کشیدن: پس از کشیدن نمونه باید بطور یکنواختی یک لحظه تامل نمود و بعد نمونه را در لوله یا ظرف هدف خالی کرد.

۶- سمپلر را مستقیم از داخل نمونه خارج کنید. باید دقت شود تا نمونه با کناره های سمپلر تماس حاصل نکند.

شکل ۱

۷- تماس دست با نوک سمپلر و سمپلر را به حداقل برسانید. این امر به دلیل جلوگیری از انتقال حرارت بدن شما به نوکها و یا سمپلر و بر هم خوردن ظرفیت آنها می باشد.

۸- نوک سمپلر را تا حد صحیح در نمونه پایین ببرید. معمولا مقدار صحیح حدود ۲-۵mm پایین تر از تقعر سطح نمونه در لوله است.

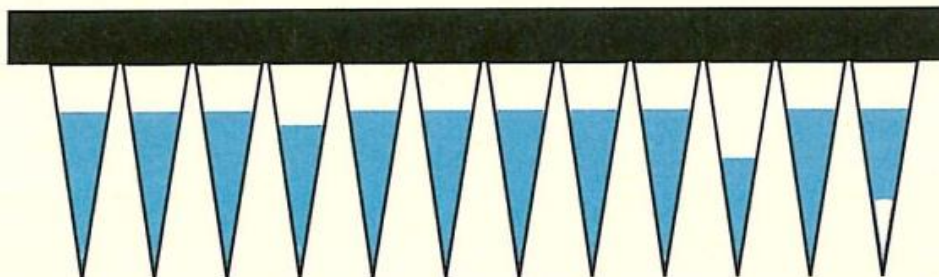
۹- از نوک سمپلر مناسب استفاده نمایید. باید تنها نوکهایی که کاملا با سمپلر فیت می شوند استفاده شوند.

۱۰- از سرعت و فشار ثابت برای فشردن پیستون سمپلر استفاده نمایید. برای هر سمپلر از فشار و رها سازی ملایمی برای کشیدن نمونه ها و خالی کردن آنها استفاده کنید.

بهترین روش برای ریختن معرف ها به داخل چاهک های الایزا در شکل (۱) نشان داده شده است. در موقع ریختن معرف ها و نمونه باید به نکات زیر توجه شود:

- در صورت عدم استفاده از روش استاندارد، فقط از اولین مکث سمپلر استفاده شود بدین معنی که برای تخلیه حجم برداشتی پیستون سمپلر را فقط تا مکث اول به پائین فشار دهید. در صورتی که پیستون تا مکث دوم پائین آورده شود ایجاد حباب می نماید که در سیستم سنجش تداخل می کند.

- معرف ها و نمونه نباید از بالا به داخل چاهک چکانده شوند.



شکل ۲

- نوک سمپلر نباید با ته چاهک تماس یابد.

- نوک سمپلر نباید با زاویه ای شدید به دیواره چاهک تماس داده شود، در این صورت ممکن است که مقداری از سرم یا معرف به دیواره باقی بماند.

در صورتی که از سمپلرهای چند کاناله استفاده می شود باید حتما سطح مایع در تمام نوک سمپلرها چک شود و برای وجود حباب و یا بسته بودن نوک سمپلر بررسی شود. برای برداشت حجم مناسب، پیستون سمپلر را تا مکث اول به طرف پائین فشار دهید و برای خالی کردن حجم برداشت شده نیز تا مکث اول پیستون را به طرف پائین فشار دهید. (شکل ۲)

### ۳- نکات مهم در مورد شستشو

- عملیات شستشو جهت جدا کردن ترکیبات اتصال یافته به کف چاهک از ترکیباتی که متصل نشده اند صورت می گیرد. این عمل با خالی کردن چاهک از محتویات داخل آن و سپس اضافه نمودن محلول شستشو به چاهک انجام می شود.

- قبل از هر چیز باید به روش تهیه محلول شستشو که در بروشور کیت ذکر شده است توجه شود. محلولهای شستشو اغلب به صورت غلیظ تهیه شده و باید توسط آزمایشگر رقیق شوند. تهیه محلول شستشو بصورت مناسب در سنجش های ایمنی بسیار اهمیت دارد چرا که محلول شستشوی غلیظتر از حد توصیه شده، منجر به تخریب و جدا شدن مولکولهای اتصال یافته می شود، در مقابل کاهش توانایی محلول شستشو به دلیل رقیق سازی زیاد، باعث عدم جدا شدن اتصالات غیراختصاصی و ایجاد جذب زمینه ای بالا می شود.

- مرحله شستشو باید حداقل سه بار برای هر چاهک انجام شود. بعد از هر بار اضافه کردن محلول به چاهک، باید محلول اضافی تخلیه شده و یا آسپیره گردد. در آخرین مرحله از شستشو و پس از خروج کامل محلول از چاهک با برگرداندن پلیت، باید محلول اضافی داخل چاهک را با کوبیدن بر سطح یک کاغذ یا دستمال نم گیر خالی نمائید.

- در هنگام شستشوی چاهک ها باید اطمینان حاصل شود که محلول تمام چاهک ها را پوشانده است. از سر ریز شدن محلول چاهک ها باید اجتناب شود.

- در برخی روشها برای شستشوی بهتر، یک زمان انتظار بنام Soak time ذکر می شود بدین ترتیب که پس از ریختن محلول درون چاهک ها مدتی صبر کرده و بعد چاهک را خالی می کنیم. این زمان از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه متغیر است. در صورتی که در بروشور کیت این زمان توصیه شده باشد حتما رعایت گردد.

- در مورد شستشوی اتوماتیک با دستگاه واشر حتما باید توجه شود که سرعت ریختن محلول و آسپیراسیون محلول

تنظیم باشد چرا که افزایش یا کاهش این سرعت بر سنجش تاثیر خواهد داشت.

- به دلیل اینکه در محلول شستشو از دترژنت استفاده می شود در هنگام تهیه محلول شستشوی آماده کار ممکن است که کف یا حباب ایجاد شود. از وارد شدن حباب یا کف به داخل چاهک ها باید جلوگیری شود چون این حباب ها سطح تماس محلول را با چاهک کم نموده و اثرات شستشو را کاهش می دهند.
- قبل از شروع عملیات شستشو پیشنهاد می شود که pH آب مقطر که برای رقیق کردن محلول استفاده می شود، و نیز pH محلول شستشوی آماده کار چک شود. در صورتی که pH محلول شستشو بسیار اسیدی یا قلیائی باشد بر سنجش تاثیر می گذارد. در صورتی که بر طبق توصیه تولید کننده کیت، از آب مقطر به عنوان محلول شستشو استفاده می نمائید حتما pH آب را چک نمائید.
- محلول آماده کار برای شستشو باید بطور تازه تهیه شود و حتما بر روی ظرف آن تاریخ ساخت قید شود. به هر حال برای تعیین پایداری محلول آماده کار به بروشور کیت مراجعه کنید.

#### ۴- نکات مهم در مورد میکرو پلیت

پس از خارج ساختن پلیت از یخچال به دلیل تغییرات سریع درجه حرارت ممکن است بر سطح چاهک ها بخار تشکیل شود که پایداری پلیت را کاهش می دهد بنابراین توصیه می شود که تا قبل از رسیدن دمای پلیت به دمای اتاق آنرا از کیسه مخصوص نگهداری پلیت خارج نکنید.

پس از استفاده از پلیت، باقیمانده چاهک ها را سریعاً به یخچال منتقل نمائید. دقت نمائید که در کیسه مخصوص پلیت، نمگیر وجود داشته باشد.

در موقع خوانش پلیت حتماً با یک دستمال بدون پرز زیر چاهک ها را تمیز نمائید.

در بین مراحل سنجش نباید وقفه ای ایجاد شود چرا که ممکن است منجر به تبخیر محتویات چاهک ها شود.

در مرحله انکوباسیون سوبسترای TMB به هیچ وجه از فویل آلومینیومی برای پوشاندن سطح پلیت استفاده ننمائید.

#### ۵- نکات مهم در مورد سوبسترا و کنژوگه آنزیمی

در موقع رقیق کردن کنژوگه غلیظ و تهیه کنژوگه آماده کار به پایداری ذکر شده آن در بروشور کیت توجه شود.

کنژوگه را فقط با محلول رقیق کننده که توسط تولید کننده توصیه شده است رقیق نمائید.

سوبستراهای دو محلولی را بر طبق روش گفته شده در بروشور تهیه نموده و به مدت زمان پایداری آن پس از تهیه توجه نمائید.

از مخلوط کردن دو سوبسترا یا دو کنژوگه آنزیمی از دو سری ساخت با شماره های مختلف اجتناب نمائید.

برای تهیه کنژوگه آماده کار و یا سوبسترای آماده کار حتماً از ظروف تمیز استفاده کنید.

برای تعیین کارایی کنژوگه پراکسیداز و سوبسترای TMB به ترتیب زیر عمل نمائید:

- به دو لوله تمیز مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده کار اضافه کنید. در مورد TMB این سوبسترا باید شفاف و بدون رنگ باشد.
- به یکی از لوله ها ۱۰ میکرولیتر از کنژوگه آماده کار اضافه کنید. پس از چند دقیقه رنگ آبی حاصل می شود.
- به همان لوله ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه کنید. رنگ آبی به زرد تبدیل می شود.
- به لوله دوم که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترا است ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمائید. هیچگونه تغییر رنگی نباید حاصل شود.
- در صورتی که نتایجی غیر از موارد ذکر شده مشاهده شد با تولیدکننده کیت تماس حاصل نمائید.

## حل مشکلات (Trouble Shooting)

### ۱. دلایل احتمالی عدم تولید سیگنال و یا تولید سیگنال ضعیف:

- حذف یا فراموش شدن انجام یک مرحله از الیزا مثلاً اضافه نکردن کونژوگه آنزیمی یا سوبسترا.
- عدم تهیه مناسب سوبسترا بویژه در مواردی که سوبستراها بصورت دو محلولی هستند.
- محلول شستشو غلیظ تهیه شده است.
- کونژوگه آنزیمی یا سوبسترا غیر فعال شده اند.
- درجه حرارت انکوباسیون مناسب نمی باشد و حرارت انکوباسیون کمتر از حد لازم است.
- حجم سوبسترای اضافه شده به چاهکها کافی نمی باشد.
- استفاده از فیلتر نامناسب برای قرائت نتایج (استفاده از فیلتر ۴۰۵ به جای ۴۵۰ نانومتر باعث کاهش جذب نوری قرائت شده می شود)
- معرف ها به درجه حرارت اتاق نرسیده اند و هنوز برای انجام آزمایش سرد هستند.
- خراشیده شدن ته چاهک با نوک سمپلر.
- معرف های کیت منقضی شده اند.
- معرف ها به دلیل نگهداری غیر صحیح با کاهش فعالیت مواجه شده اند.
- اسیدی بودن pH آب مقطر استفاده شده جهت ساخت محلول شستشو (pH آب مقطر و محلول شستشو چک شوند)
- مقدار نمونه برداری کمتر از مقدار لازم است. (سمپلرها باید به صورت ادواری چک شوند)
- آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی میکروبی کنترل مثبت یا استانداردها.
- ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت.
- دفعات و شدت شستشو زیاد است.
- بیخ زدگی معرفهای کیت.

### ۲. دلایل احتمالی جذب زمینه ای بالا - افزایش جذب نوری استانداردها یا نمونه ها:

- غلظت کونژوگه آنزیمی زیاد است و رقت کونژوگه طبق بروشور تهیه نشده است.
- درجه حرارت انکوباسیون نامناسب است و درجه حرارت، بالاتر از حد تعیین شده برای سنجش می باشد.
- فرآیند شستشو کافی نبوده است و یا محلول شستشو بصورت رقیق تهیه شده است.
- آلودگی آنزیمی در نمونه های سرمی وجود دارد.
- آلودگی متقاطع با دیگر نمونه ها و یا کنترل مثبت اتفاق افتاده است.
- برای قرائت جذب نوری از فیلتر صحیح استفاده نشده است. در صورتیکه توصیه شده باشد از فیلتر رفرانس استفاده شود و این امر انجام نشود یک جذب زمینه ای بالا مشاهده می شود.
- سوبسترا قبل از مصرف با نور در تماس بوده است.
- محتویات چاهکها در طی انکوباسیون تبخیر شده اند.
- نوک سمپلر با سوبسترا یا کونژوگه آنزیمی آلوده شده است.
- سوبسترا با یونهای فلزی یا عوامل اکسید کننده آلوده شده است.
- استفاده از انکوباتور خشک به جای مرطوب (در صورتی که در بروشور کیت انکوباتور مرطوب توصیه شده باشد).
- اتصالات غیر اختصاصی آنتی بادیها
- اشکال در دستگاه الیزا ریدر (دستگاه باید بصورت دوره ای چک شود).

### ۳. دلایل احتمالی در زمانیکه شکل منحنی استاندارد نا مناسب است:

- شستشو به خوبی انجام نشده است.
- رقیق سازی محلولها به خوبی انجام نشده است و یا خطا در پی پت کردن معرف ها وجود دارد.
- معرف ها به خوبی مخلوط نشده اند.
- ته چاهکها از طرف خارج آلوده شده است و کثیف می باشد.
- از معرف هایی با سری ساخت متفاوت استفاده شده است.

### ۴. دلایل احتمالی دقت ضعیف یا دوپلیکیت های ضعیف:

- خطا در پی پت کردن معرف ها
- خراش دادن سطح چاهک ها با نوک سمپلر
- انتقال محلول ها از چاهک های کناری
- استفاده از حجم نا مناسب محلول ها
- وجود رسوب یا پارتیکل در نمونه و کنترل ها
- کثیف بودن سطح خارجی چاهک ها
- وجود اثر حاشیه ای (Edge effect)
- ایراد در دقت سمپلرها
- ناهمگونی در کوتینگ چاهکها

### ۵. دلایل احتمالی در زمانیکه تمام چاهکها دارای رنگ هستند:

- سوبسترا آلوده شده است.
- محلول شستشو آلوده شده است.
- رقیق سازی به خوبی انجام نشده است.
- شستشو به خوبی انجام نشده است.
- محلول متوقف کننده آلوده است.

## توضیحاتی در ارتباط با بروشور کیت‌های الایزا

بروشور که برخی اوقات از آن به عنوان Kit Instruction و یا Technical Manual نام برده می شود شناسنامه کیت است و تمام آنچه را که یک مصرف کننده لازم دارد باید در آن گنجانده شود. متأسفانه گاهی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به بروشور فقط به عنوان دستورالعمل انجام کار با کیت نگاه می شود و گاهی اوقات سایر قسمتهای بروشور که شاید اهمیت کمتری از روش انجام کار با کیت نیز ندارند، مورد توجه قرار نگرفته و اصلاً خوانده نمی شوند. در اینجا بخش های مختلف یک بروشور استاندارد به ترتیب ذکر شده و اهمیت هر بخش نیز بیان می شود، امید است که همکاران محترم با توجه به اهمیت بخشهای مختلف قبل از شروع به انجام هر تست بروشور کیت را بطور کامل قرائت نمایند.

### ۱-مقدمه (Introduction)

در این بخش در مورد مشخصات ساختاری و اهمیت بالینی و تغییرات فیزیولوژیک و یا پاتولوژیک آنالیت مورد نظر صحبت می شود. در این بخش ذکر می شود که چه نوع آنالیتی مورد اندازه گیری قرار می گیرد (آنالیت تام یا آزاد و...)

### ۲-اساس آزمایش (Principle)

در این قسمت اساس آزمایش توضیح داده می شود بدین نحو که نوع تست (روش غیر مستقیم - ساندویچ و یا رقابتی) و آنتی بادی و یا آنتی ژنهای مورد استفاده و همچنین نوع ماده نشاندار (آنزیم و نوع آن و ...) بیان می شود و شمه‌ای خلاصه از روش انجام آزمایش بیان می گردد، توجه به این بخش بسیار مهم است، چرا که بخش های دیگر بروشور نظیر روش انجام تست، شکل منحنی استاندارد و یا نحوه محاسبه نتایج ارتباط مستقیمی با این بخش دارند. برای مثال زمانی که در بخش اساس آزمایش ذکر شود که روش رقابتی است مصرف کننده کیت باید توجه کند که در مورد کیت‌های کمی زمانی که منحنی استاندارد کیت رسم می شود پایین ترین استاندارد از نظر مقدار، بالاترین جذب نوری را خواهد داشت و منحنی استاندارد کیت بصورت معکوس و نزولی می باشد و در مورد کیت‌های کیفی، کنترل مثبت کیت دارای جذب نوری کمتری از کنترل منفی کیت می باشد.

### ۳-محتویات کیت (Kit Contents)

در این بخش تمام اجزا که در کیت تعبیه شده است با ذکر مشخصات آنها بیان می شود. در این بخش ممکن است برای هر جزء توضیحی خلاصه از ساختمان و ترکیب آن ماده ذکر شود و غلظت استانداردها نیز در این بخش بیان می شود ولی ممکن است با توصیه ای مواجه شویم که "غلظت دقیق استاندارد بر روی ویال ها نوشته شده است" که باید به این مطلب توجه جدی شود. آماده مصرف بودن و یا نیاز به آماده سازی در مورد کونژوگه، استانداردها و دیگر اجزاء کیت در این بخش نوشته می شود و این آگاهی را به مصرف کننده می دهد که حتماً بخش های بعدی بروشور بویژه بخش آماده سازی معرف ها را به خوبی مطالعه نماید. مصرف کننده، کلیه اجزاء تعبیه شده در کیت را باید با این بخش از بروشور مطابقت داده و تایید نماید.

## اجزاء کیت الایزا:

### الف) پلیت (فاز جامد)

شامل پلیت‌های ۹۶ یا ۴۸ خانه‌ای از جنس پلی استیرن می باشد. در هنگام تولید پلیت کوت شده آنتی بادی یا آنتی ژن را در بافر کوتینگ با غلظت مشخص حل کرده و داخل این چاهکها با حجم مشخص می ریزیم. در طی یک زمان انکوباسیون این آنتی ژن یا آنتی بادیها به کف چاهکها متصل می شوند. این اتصال به اشکال مختلفی صورت می گیرد که ساده ترین آنها جذب غیر فعال (خود به خودی) و اتصالات غیر کووالان (فعل و انفعالات آب گریز - آب دوست) می باشد. بعد از پایان مرحله کوتینگ و اتصال آنتی ژن یا آنتی بادیها به کف چاهکها مرحله بلاکینگ و پایدار کردن پلیت انجام می شود. این مرحله به منظور پر کردن فضاهای خالی ما بین آنتی ژنها و آنتی بادیهای متصل شده صورت می گیرد تا در طول انجام تست و ریختن سرم بیمار، آنتی ژن یا آنتی بادی دیگری در این فضاهای خالی کوت نشود. این کار عموماً با استفاده از پروتئینهای BSA، کازئین و ژلاتین انجام میشود.

### ب) کونژوگه

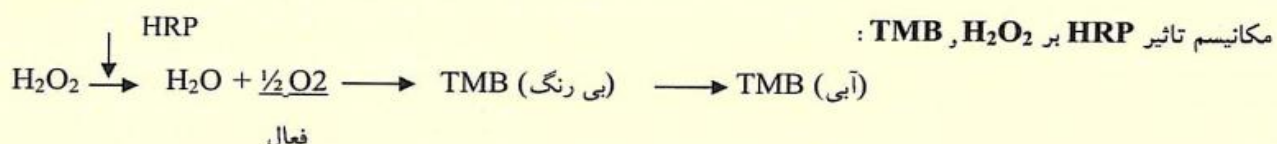
کونژوگه در واقع آنتی ژن یا آنتی بادی است که با آنزیم لیبل شده است. آنزیمهای مختلفی جهت لیبل کردن استفاده می شوند که مهمترین آنها HRP (Horseradish Peroxidase) و ALP (آلکالین فسفاتاز) می باشند. نقش آنزیم در واکنشهای شیمیایی به عنوان یک کاتالیزور می باشد و در مقدار کم باعث افزایش سرعت واکنش می شود.

### ج) سوبسترا

سوبسترا، ماده شیمیایی است که آنزیم بر روی آن بصورت اختصاصی تاثیر می گذارد. سپس با ردیابی رنگ یا ترکیبات ثانویه ایجاد شده از این واکنش، سنجش آنالیت مورد نظر (آنتی بادی یا آنتی ژن) میسر می گردد. لازم به ذکر است که این پروسه در مورد آنزیمهای مختلف متفاوت می باشد. بطور مثال سوبسترای آنزیم ALP به عنوان کروموژن (معرف رنگزا) نیز عمل می کند، در صورتیکه در مورد آنزیم HRP، سوبسترا (آب اکسیژنه  $H_2O_2$ ) به عنوان معرف رنگزا عمل نمی کند و باید از ترکیب دیگری مانند TMB به عنوان معرف رنگزا استفاده کرد.

#### د) کروموژن

کروموژن یا معرف رنگزا ماده ایست که تحت تاثیر مواد تجزیه شده از سوبسترا دچار تغییر رنگ می گردد



#### ه) محلول شستشو

محلولی است متشکل از بافر PBS یا Tris به انضمام درصد مشخصی از یک دترجنت مانند Tween جهت شستشو بین مراحل الایزا که باعث جداسازی پیوندهای غیر اختصاصی متصل شده به چاهک می شود.

#### و) محلول متوقف کننده

یک محلول اسیدی یا قلیایی می باشد که به واکنش آنزیم با سوبسترا پایان بخشیده و معمولاً باعث تغییر رنگ حاصل از معرف رنگزا می شود.

#### ز) استانداردها

عبارتند از آنتی ژن یا آنتی بادی در غلظت های مشخص جهت رسم منحنی و سنجش به روش کمی که در مقابل استانداردهای جهانی تعیین ارزش شده اند.

#### ۴- مواد مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد

تمام آنچه که برای انجام تست لازم است ولی در کیت تعبیه نشده است نظیر وسایل و دستگاهها (سمپلر، دستگاه خوانشگر) و حتی آب مقطر مورد استفاده برای رقیق کردن معرف ها (ساخت محلول شستشو و...) در این بخش باید بیان شود.

#### ۵- هشدارهای توصیه ای (Precautions)

در این بخش هشدارهائی در مورد وجود مواد شیمیایی خطرناک موجود در معرف های کیت و همچنین توصیه هایی در مورد مواد تهیه شده از منابع انسانی (سرم یا پلاسما) داده می شود که باید کلیه مواد تهیه شده از منابع انسانی از نظر وجود هپاتیت B، C و HIV چک شده باشند با این حال پرسنل باید در هنگام حمل و نگهداری و انجام آزمایش با معرف های کیت و همچنین نمونه های بالینی احتیاط های لازم را به کار گیرند.

#### ۶- جمع آوری نمونه و محل نگهداری آن

این بخش یکی از مهمترین بخش های بروشور است چرا که در این بخش نوع نمونه مناسب برای تست مشخص می شود، در اینجا بیان می گردد که آیا مصرف کننده مجاز به استفاده از انواع پلاسما تهیه شده از ضد انعقاد های مختلف به جای نمونه سرم می باشد یا خیر؟ مصرف کننده کیت باید حتماً به این توصیه توجه خاصی مبذول نماید به دلیل اینکه استفاده از نمونه ای که در کیت توصیه نشده است ممکن است منجر به جوابهای اشتباه گردد. زمان و درجه حرارت نگهداری نمونه تا انجام تست در این بخش از بروشور ذکر می شود که باید به توصیه کیت به درستی عمل شود.

## ۷-روش کار (Procedure)

این بخش شامل سه قسمت اصلی است :

### الف) توجهات عمومی

در این قسمت به یکسری از هشدارها در مورد عدم استفاده از معرف هائی با سری ساخت های مختلف، به دما رسیدن معرف ها زمانی که تست در درجه حرارت اتاق انجام می شود و مواردی از این قبیل اشاره می شود که باید مورد توجه قرار گیرند.

### ب) آماده سازی معرف ها

در این قسمت در صورتی که برخی از معرف ها نیازمند آماده سازی قبل از انجام تست باشند بیان می گردد. نحوه حل نمودن معرف های لیوفلیزه و نحوه تهیه کونژوگه و یا سوبسترای آماده کار از محلول های غلیظ در این قسمت بیان می شود که بسیار اهمیت دارد و مصرف کننده باید از آنها اطلاع داشته باشد چرا که عدم توجه به این بخش مشکلات اساسی در انجام تست را به دنبال خواهد داشت.

### ج) روش انجام تست

در این بخش به روشی روش انجام تست شامل تعداد چاهکهای مورد نیاز برای استفاده از استانداردها و کنترل ها، حجم نمونه، حجم کنترل ها و استانداردها، مراحل شستشو و تعداد دفعات آن و سایر موارد ذکر می شود. معمولاً خلاصه ای از کل روش انجام تست بصورت شماتیک در یک جدول در این بخش و یا در صفحات آخر بروشور آورده می شود.

## ۸-کنترل کیفی (Quality Control)

در این بخش ارزشمندی و اعتبار تست انجام شده با وجود کنترل های داخلی و یا توصیه برای استفاده از کنترل های تجارتي ذکر می شود. ارزش سرم کنترل های داخلی کیت معمولاً بر روی ویال آنها ذکر شده است. استفاده از کنترل خارجی و یا یک Pooled Serum معلوم جهت کنترل کیفی کیت توصیه می گردد. علاوه بر این هر تولید کننده برای هر یک از استانداردها و کنترل ها مقادیر جذب نوری را ادعا می کند که مصرف کننده باید نتایج تست خود را با آنها مقایسه نماید. در صورت موجود بودن برگه تأیید صلاحیت (Certificate of Analysis) مقادیر جذب نوری استانداردها و کنترل ها باید با این برگه مقایسه شوند.

## ۹- محاسبه نتایج (Calculation of Result)

این بخش یکی از مهمترین قسمتهای یک بروشور است که باید مورد توجه قرار گیرد. در این بخش نحوه رسم منحنی استاندارد که یکی از مهمترین عوامل در صحت و دقت سنجش به حساب می آید مطرح می شود. مصرف کننده دقیقاً باید از همان روش رسم منحنی که توسط تولید کننده در بروشور ذکر کرده است استفاده نماید زیرا استفاده از روش دیگر برای رسم منحنی ممکن است منجر به نتایج غیر صحیح شود. در این بخش ممکن است استفاده از بلانک پیشنهاد شده باشد که جذب نوری آن باید از جذب نوری کنترل ها کم شود و در صورتیکه این کار انجام نشود ممکن است نتایج بدست آمده صحیح نباشد. طول موج قرائت نتایج در این بخش توصیه می شود که بسیار اهمیت دارد. استفاده از طول موجهای توصیه نشده در بروشور منجر به خطاهائی خواهد شد که در بخش حل مشکلات الایزا مطرح شده است. در اینجا توصیه می شود که اگر مقدار آنالیت مورد اندازه گیری بیشتر از مقدار آخرین استاندارد سنجش بود باید نمونه با رقیق کننده مناسب رقیق شده و بعد نتیجه بدست آمده در ضریب رقت ضرب شود. توجه به نوع رقیق کننده پیشنهادی تولید کننده برای بدست آوردن نتایج صحیح و دقیق ضروری است چرا که استفاده از رقیق کننده نامناسب منجر به خطای سنجش (عدم صحت و عدم دقت) می شود. مصرف کننده باید توجه داشته باشد که مجاز به گزارش نتایج بالاتر از مقدار آخرین استاندارد کیت بصورت کمی نمی باشد مگر اینکه رقت های متوالی از سرم را آزمایش نموده و در یکی از رقتها مقدار بدست آمده در محدوده استاندارد کیت قرار گرفته باشد در غیر اینصورت باید نتایج را به صورت بیشتر از X گزارش کند که X ارزش آخرین استاندارد کیت است.

## ۱۰- محدودیت های روش (Limitation of Procedure)

در این بخش علاوه بر محدودیت های موجود در مورد تفسیر نتایج تست در مورد محدودیت های موجود در سنجش نیز بحث می شود. در مورد تفسیر نتایج باید محدودیت های آنالیت در تشخیص بیماری خاص مورد نظر ذکر شود مثلاً در مورد آنالیت CEA ممکن است ذکر شود که مقدار CEA یک مدرک مستدل برای وجود یا عدم وجود یک بیماری بدخیم نمی باشد و این تست نباید برای غربالگری کانسر استفاده شود و یا در مورد آنتی بادی از کلاس IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری ذکر شود که "وجود آنتی بادی در سرم نمی تواند دلیل بر وجود بیماری باشد و باید با علائم بالینی تفسیر شود". محدودیت های سنجش نظیر اثرات فاکتور روماتوئیدی و آنتی بادی ضد آنتی بادی موش با منشاء انسانی (HAMA) که منجر به تداخل در سنجش آنالیت می شوند نیز می بایست در این بخش ذکر شوند.

## ۱۱- مقادیر مرجع (Expected Value)

در بخش مقادیر مرجع علاوه بر ذکر مقادیر مورد انتظار برای آنالیت در سنین مختلف و با تفکیک جنس ممکن است حدود اطمینان برای آنالیت نیز ذکر شود. معمولاً برای هر آنالیت در شرایط خاص یک میانگین، انحراف استاندارد و یک محدوده تعیین و نوشته می شود که این محدوده می تواند با یک حدود اطمینان ذکر شود که آزمایشگاه در هنگام گزارش نتایج باید به این محدوده توجه کند و آنرا گزارش نماید. جمعیت مورد بررسی در این بخش باید کاملاً

مشخص شده باشد و حتی محدوده سنی، جنس و نژاد در صورتی که در تعیین مقادیر مرجع موثر هستند باید ذکر شوند. در این بخش توصیه می شود که هر آزمایشگاه مقادیر مرجع خود را تعیین نماید. ساده ترین راه برای اینکار تعمیم (Transference) است بدین معنی که حداقل ۲۰ نمونه با مشخصات جمعیتی که توسط تولید کننده ذکر شده است انتخاب شده و مورد آزمایش قرار می گیرد، در صورتی که کمتر از ۱۰ درصد از نتایج خارج حد تعیین شده در بروشور کیت باشد این محدوده طبیعی مورد قبول قرار می گیرد و در غیر اینصورت مقدار مرجع آنالیت مورد نظر باید تعیین شود. در مبحث مقادیر مرجع به واحد اندازه گیری آنالیت باید توجه شود. برخی از آنالیت ها دارای یک یا چند واحد هستند مثلاً پرولاکتین سرم دارای حداقل ۲ واحد ng/ml و mIU/L است که این دو از نظر مقداری بسیار متفاوت هستند و یا در مورد IgE نیز دو واحد IU/L و ng/ml وجود دارد که هر تولید کننده ممکن است یکی از دو واحد را برای مقادیر استاندارد های خود تعریف نماید، در صورتی که آزمایشگاه علاقمند است که از واحدهای دیگر استفاده نماید باید حتماً ضریب تبدیل واحد را مورد توجه قرار داده و استفاده نماید.

## ۱۲- شاخص های اجرایی (Performance characteristics)

این بخش شناسنامه کنترل کیفی کیت است و تمام نتایج حاصل از کنترل کیفی کیت که توسط تولید کننده به انجام رسیده است در این بخش ذکر می شود، این بخش شامل تست های صحت و دقت در کیت است. تمام کیت ها باید حاوی این بخش باشند و بروشور کیت هایی که فاقد ادعای شاخص های صحت و دقت هستند ناقص محسوب می شوند.

**در این بخش ادعاهای زیر باید مورد توجه قرار گیرند :**

### - حساسیت سنجش و یا حداقل مقدار قابل تعیین

حساسیت یا حداقل مقدار قابل تعیین یکی از مهمترین فاکتورهای دقت سنجش است. مصرف کننده به هیچ وجه حق گزارش اعدادی کمتر از حد حساسیت کیت ندارد و در صورت لزوم باید بصورت کمتر از حساسیت کیت گزارش شود برای مثال اگر حداقل مقدار قابل تعیین در کیت TSH،  $0.1 \text{ mIU/L}$  باشد گزارش اعدادی نظیر  $0.05$  و  $0.01$  با این کیت درست نمی باشد و یا اگر در مورد کیت HCG حساسیت کیت  $1 \text{ IU/L}$  تعیین شده است گزارش HCG بصورت صفر درست نمی باشد و باید بصورت کمتر از یک ( $< 1$ ) گزارش شود.

### - عدم دقت

معمولاً بصورت عدم دقت درون سنجی (intra-assay) و عدم دقت میان سنجی (Inter-assay) بیان می شود. ادعای عدم دقت باید حداقل شامل سه سطح از مقادیر باشد که در محدوده استاندارد ها قرار می گیرند (ترجیحاً در مقادیر غیر طبیعی پائین، غیر طبیعی بالا و مقادیر طبیعی در حد تصمیم گیری بالینی).

### - تست خطی بودن

این تست یک روش غیر مستقیم در ارزیابی صحت سنجش است. یک سنجش صحیح غیر وابسته و مستقل از غلظت آنالیت عمل می کند، به عبارتی اگر سنجش دارای صحت باشد در تمام غلظت های آنالیت باید این صحت وجود داشته باشد. در این تست نمونه سرم یا استاندارد با غلظت بالایی از آنالیت با رقیق کننده مناسب رقیق شده و سپس تست انجام می شود، در این حالت در بروشور کیت ادعای خطی بودن ممکن است بصورت رقت ها و غلظت های مورد انتظار و یا بصورت درصد بازیافت نوشته شود. این تست نشان می دهد که سنجش آنالیت مورد نظر تا غلظت آخرین استاندارد کیت خطی است و می توان نتایج حاصل از سنجش را تا آخرین استاندارد گزارش نمود.

### -بازیافت (Recovery)

این تست نیز یک روش غیر مستقیم در ارزیابی صحت سنجش است. در این تست مقادیر مشخص از آنالیت (بصورت استاندارد یا سرم) به یک سرم با غلظت مشخص از آنالیت اضافه شده و سپس این مخلوط مورد سنجش قرار می گیرد. مقدار آنالیت اضافه شده به سرم باید بازیافت شود. نتیجه این تست بصورت درصدی از بازیافت بیان می شود.

### -تست ویژگی (Specificity)

در سنجش برخی از آنالیت ها ممکن است واکنش متقاطع با سایر آنالیت های موجود در سرم به دلیل وجود تشابه ساختمانی رخ دهد، که تولید کننده باید برای این واکنش متقاطع ادعا داشته باشد و در بروشور خود آنرا ذکر نماید، حداقل واکنش متقاطع نشان دهنده حداکثر ویژگی و اختصاصیت معرف های به کار رفته در کیت می باشد برای مثال برای کیت HCG باید ویژگی سنجش برای آنالیت های LH، FSH و TSH ذکر شده باشد.

### -تست همبستگی (Correlation)

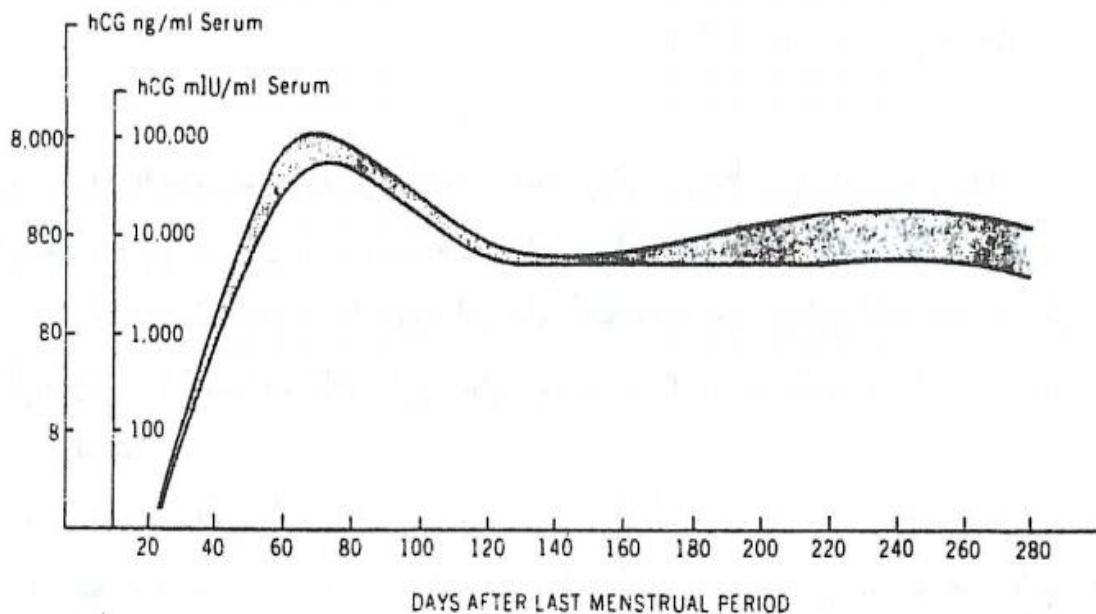
این تست روش مستقیم ارزیابی صحت در سنجش است. در این تست تولید کننده نتایج نمونه های بالینی بدست آمده از کیت خود را با یک روش مرجع مقایسه و نتایج آنرا در بروشور ذکر می کند.

### -تست اثر هوک

اثر هوک در برخی از آنالیت ها بسیار حائز اهمیت است بویژه HCG، TSH، PSA، CEA، CA19-9 که در آزمایشات آنها امکان رخ دادن پدیده هوک وجود دارد و تولید کننده پس از آزمایش باید در این مورد ادعا داشته باشد و در بروشور این ادعا ثبت شود.

## تشخیص حاملگی به روش سرولوژی\*

متداول ترین، آسان ترین، ارزانه ترین و سریع ترین راه تشخیص حاملگی، پیدا کردن هورمون گونادوتروپین جفتی انسان (human Chorionic Gonadotropin (hCG در ادرار با روشهای سرولوژی می باشد. این هورمون حدود ۳ تا ۵ روز بعد از عقب افتادن عادت ماهانه در ادرار و قبل از آن در سرم بانوان باردار قابل تشخیص است. در یک حاملگی طبیعی، حدود ۶ تا ۸ روز پس از لقاح (Conception) می توان با روشهای حساس هورمون hCG را در سرم اندازه گیری نمود. هورمون hCG در سرم به سرعت تا روز ۶۰ تا ۸۰ (حدود هفته ۸ تا ۱۰) حاملگی افزایش یافته تا بمقدار حدود ۱۰۰۰۰۰ mIU/ml برسد (۱ mIU/ml برابر یک هزارم IU/l است). سپس مقدار آن کاهش یافته و به حدود ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰ mIU/ml، در هفته ۱۵ تا ۱۶ حاملگی می رسد. این مقدار تا آخر دوره حاملگی تقریباً ثابت می ماند. بطور قراردادی، اولین روز از آخرین عادت ماهانه را (Last menstrual period (LMP، شروع حاملگی حساب می کنند که در روز چهل و یکم آن معمولاً هورمون hCG در ادرار ظاهر می شود (منحنی شماره ۱-۹). مادرانیکه دوقلو باردار هستند (Twin pregnancy)، مقدار هورمون hCG، تقریباً دو برابر مقدار طبیعی می باشد.



منحنی ۱-۹- نمودار مقدار هورمون hCG در سرم، در طول دوران حاملگی

حدود دو هفته پس از زایمان طبیعی هورمون hCG در سرم ناپدید می شود، در صورتیکه بعد از سقط

جنین ناگهانی و خودبخودی در مدت ۹ تا ۳۵ روز (بطور متوسط ۱۹ روز)، سقط جنین عمدی در مدت ۱۶ تا ۶۰ روز (بطور متوسط ۳۰ روز) و بعد از جراحی آبستنی خارج از رحمی، بین یک تا ۳۱ روز (بطور متوسط ۸/۵ روز) هورمون hCG در سرم ناپدید می‌گردد. بطور کلی معمولاً بعد از هرگونه سقط یا حاملگی خارج از رحمی، هورمون hCG در مدت یکماه غیر قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

هورمون hCG در دوران آبستنی توسط سلولهای سینیسی شیوتروفوبلاست (Syncytiotrophoblast) جفت یا پلاستا تولید شده و در سرم و مایعات بدن قابل تشخیص است. این هورمون همچنین به مقدار بسیار جزئی توسط غده هیپوفیز (Pituitary) مردان و زنان غیر باردار بصورت متناوب (Pulsatile) ترشح می‌شود. تاکنون هورمون hCG علاوه بر انسان فقط در گونه میمون سانان Primates و اسب مشاهده شده است.

وزن مولکولی هورمون hCG حدود ۴۰۰۰۰ دالتون، از جنس گلیکو پروتئین و از دو قسمت (Subunit) زنجیره‌های گلیکو پلی‌پپتیدی آلفا و بتا (Heterodimer)، درست شده که به وسیله سه پیوند غیر اشتراکی بهم متصل‌اند. مقدار قند هورمون hCG از تمام هورمونهای دیگر انسان بیشتر است. خاصیت بیولوژیکی این هورمون مربوط به زنجیره بتا ( $\beta$ -hCG) است ولی این زنجیره به تنهایی فعال نمی‌باشد. زنجیره آلفا ( $\alpha$ -hCG) توسط یک ژن روی کروموزوم ۶ کد می‌شود، از ۹۲ اسید آمینه درست شده و در ساختمان سه هورمون هیپوفیزی زیر نیز مشترک است:

- 1- Folicle-Stimulating Hormone (FSH).
- 2- Luteinizing Hormone (LH).
- 3- Thyroid-Stimulating Hormone (TSH).

زنجیره ( $\beta$ -hCG) مستقل از زنجیره ( $\alpha$ -hCG) سنتز می‌شود، توسط ۷ ژن روی کروموزوم ۱۹ کد می‌شود و ظاهراً فقط سه ژن آن فعال است. زنجیره ( $\beta$ -hCG) از ۱۴۵ اسید آمینه و زنجیره ( $\beta$ -LH) از ۱۱۵ اسید آمینه تشکیل گردیده که ۸۰ درصد از ۱۱۵ اسیدهای آمینه ناحیه آمین انتهائی (N-terminal) آنها کاملاً مانند یکدیگرند ولی ۳۰ اسید آمینه ناحیه کربوکسیل انتهائی (C-terminal) زنجیره ( $\beta$ -hCG) منحصر بفرد و آنتی ژنیک است.

در یک دوره حاملگی طبیعی، بیشتر از نود درصد مولکولهای hCG در سرم بصورت ساختمانی کامل (Intact)، و مقدار بسیار جزئی بصورت زنجیره‌های آزاد آلفا، بتا و همچنین قطعات خورد شده می‌باشند. نسبت زنجیره‌های آزاد و قطعات شکسته شده هورمون hCG به مولکول کامل، در ادرار بیشتر از سرم است. در سه ماهه اول بارداری، نسبت زنجیره بتا و در سه ماهه دوم و سوم بارداری، نسبت زنجیره آلفا بیشتر از دیگری می‌باشد. در وضعیت‌های مرضی، نسبت مولکول کامل به زنجیره‌های آزاد آلفا، بتا و قطعات شکسته شده آنها تغییر می‌کند. در بیماریهای تروفوبلاستیک (Gestational trophoblastic diseases (GTD)، هر چه نسبت قطعه ( $\beta$ -hCG) به مولکول کامل hCG در سرم بیشتر باشد، دلالت بر وخیمتر بودن بیماری دارد. بنابراین زنجیره

آزاد ( $\beta$ -hCG)، بعنوان شاخص یا مارکر بیماریهای تروفوبلاستیک شناخته می‌شود.

روشهای تشخیص هورمون hCG در ادرار:

هورمون hCG را به روشهای بیولوژیکی و سرولوژیکی در ادرار می‌توان تشخیص داد:

الف - روشهای بیولوژیکی (Bioassay) - در این روش ادرار را به حیوانات آزمایشگاهی موش خانگی، موش صحرایی، خرگوش و همچنین قورباغه (تست بوفو - رانا) تزریق می‌کنند. از آنجائی که عوامل زیادی در حساسیت و درستی این روش دخالت دارند، روشهای بیولوژیکی دیگر رایج نمی‌باشد.

ب - روشهای سرولوژیکی - چندین روش سرولوژی برای اندازه‌گیری هورمون hCG در سرم و ادرار وجود دارد که در بین آنها چند روش متداول است. حساسیت (Sensitivity) و درجه ویژگی (Specificity) این روشها بر حسب نوع آنتی‌بادی و اساس کار با یکدیگر تفاوت دارند. آنتی‌بادی ممکن است علیه تمام ساختمان هورمون hCG، زنجیره بتا یا آنتی‌بادی منوکلونال علیه اپی‌توپهای اختصاصی زنجیره بتای هورمون hCG تهیه شده باشد. امروزه بعلاوه با روشهای ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) می‌توانند هورمون hCG و سایر هورمونها را در بافتهای مختلف نیز شناسائی نمایند. از بین روشهای اندازه‌گیری هورمون hCG در مایعات بدن، روشهای زیر متداولتر می‌باشند:

- ۱ - روش وقفه یا ممانعت از آگلوتی ناسیون پاسیولا تکس Passive latex agglutination inhibition test
- ۲ - روش آگلوتی ناسیون معکوس پاسیولا تکس Reversed Passive latex agglutination
- ۳ - روش الیزا Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- ۴ - روش آر.آی.آر Radioimmuno-assay (RIA)

درجه حساسیت روشهای فوق برای تشخیص حداقل مقدار hCG در نمونه متفاوت است. بیشترین درجه حساسیت را روش RIA دارد که حداقل مقدار ۵ IU/l در نمونه را شناسائی می‌کند. روش الیزا (ELISA) نیز دارای درجه حساسیتی نزدیک به روش RIA می‌باشد. روشهای لاتکس که امروزه بنام کیت آزمون خانگی (Home test kit) معروف هستند و با نامهای تجارتي مختلف به بازار عرضه می‌شوند، درجه حساسیت آنها بستگی به نوع آنتی‌بادی ضد هورمون hCG دارد. بطور کلی درجه حساسیت کیت‌های مختلف تشخیص هورمون hCG بر حسب شرکت سازنده، قدرت آنتی‌بادی ضد هورمون (Affinity) و درجه ویژگی آنتی‌بادی (Specificity) متفاوت است.

روش وقفه یا ممانعت از آگلوتی ناسیون پاسیولا تکس، دو مرحله‌ای است و آنتی‌ژن hCG به ذرات لاتکس متصل است، در صورتیکه روش آگلوتی ناسیون معکوس پاسیولا تکس، در یک مرحله انجام می‌شود و آنتی‌بادی ضد هورمون hCG به ذرات لاتکس متصل شده است.

روشهای آگلوتی ناسیون ذرات لاتکس، معمولاً بصورت کیفی و یا نیمه کمی روی لام برای نمونه ادرار

انجام می‌شوند و درجه حساسیت آنها بر حسب نوع آنتی‌بادی شرکت سازنده حدود ۵/۳-۳/۳ mIU/ml است. در این کتاب ما به شرح روش وقفه یا ممانعت از آگلوتیناسیون پاسیولا تکس می‌پردازیم.

## آزمایش حاملگی ادرار به روش ممانعت از آگلوتیناسیون پاسیولا تکس

### اساس آزمایش:

این آزمایش، به روش سریع روی لام زمینه سیاه انجام می‌گیرد. ابتدا مقدار معینی از ادرار مشکوک را با آنتی‌بادی اختصاصی ضد هورمون hCG مخلوط می‌کنند و سپس به آن ذرات لاتکس که از هورمون hCG پوشیده شده است اضافه می‌کنند. اگر در ادرار، هورمون hCG باشد، به آنتی‌بادی اختصاصی متصل می‌شود. از آنجائی که هورمون hCG بصورت محلول است و کمپلکس آن با آنتی‌بادی بصورت ذرات بسیار ریز پر سیستاسیون می‌باشد و با چشم دیده نمی‌شود، بنابراین ذرات لاتکسی که به این کمپلکس اضافه می‌شود بعلت نبودن آنتی‌بادی اختصاصی بصورت آزاد باقی مانده و آگلوتیناسیون ایجاد نمی‌شود. از طرف دیگر چنانکه ادرار فاقد هورمون hCG باشد، آنتی‌بادی اختصاصی ضد این هورمون بطور آزاد باقی مانده و در مرحله بعد که ذرات لاتکس پوشیده از هورمون hCG اضافه می‌شود، با این ذرات ایجاد توده‌های آگلوتیناسیون را می‌کند. بنابراین چنانکه آگلوتیناسیون مشاهده نشود، آزمایش مثبت و زن باردار است ولی برعکس چنانکه آگلوتیناسیون مشاهده شود، آزمایش منفی و احتمالاً زن باردار نمی‌باشد و برای تأیید آن باید آزمایش را پس از مدتی تکرار کرد. اولین بار در ایران آزمایش حاملگی ادرار با نام تجارتي گراویندکس شناخته شد که اساس آن نیز ممانعت از آگلوتیناسیون پاسیولا تکس است.

### مواد و وسایل آزمایش تشخیص حاملگی:

- ۱- آنتی‌بادی اختصاصی ضد هورمون hCG. این آنتی‌بادی را معمولاً از تزریق قطعه بتای هورمون hCG به خرگوش یا سایر حیوانات تهیه می‌کنند. سپس آنرا با بافر رقیق کرده و به نسبت ۱/۰ درصد سدیم ازید (N<sub>3</sub>Na) بعنوان ماده ضد میکروبی به آن اضافه نموده‌اند.
- ۲- آنتی ژن. شامل ذرات لاتکس که پوشیده از هورمون hCG می‌باشد. این ذرات معمولاً محتوی ۲۵/۰ درصد فنل بعنوان مواد ضد میکروبی می‌باشد. بعضی موسسات سازنده، از ذرات لاتکس رنگی استفاده می‌کنند.
- ۳- کنترل مثبت. این کنترل معمولاً ادراری است که دارای مقدار معینی هورمون hCG می‌باشد. بعنوان کنترل مثبت می‌توان از یک ادرار شناخته شده مثبت نیز استفاده نمود.
- ۴- کنترل منفی. برای کنترل منفی می‌توان از سرم فیزیولوژی و یا یک ادرار منفی استفاده کرد.
- ۵- لام. معمولاً در هر جعبه آزمایش، یک لام شیشه‌ای صفحه تاریک قرار دارد.

- ۶- پیت پلاستیکی یکبار مصرف، همراه با آبدزدک سر آن به تعداد کافی در هر جعبه وجود دارد.
  - ۷- اپلیکاتور یا بهم‌زدن چوبی یا پلاستیکی به تعداد کافی.
- روش آزمایش بطریقه کیفی:
- روش انجام آزمایش با مواد سازنده هر موسسه ممکن است با موسسه دیگر اندکی متفاوت باشد ولی بطور کلی شامل مراحل زیر می‌باشد:
- ۱- تمام مواد و وسایل آزمایش و همچنین ادرار مشکوک باید قبل از آزمایش به درجه حرارت محیط آزمایشگاه برسند.
  - ۲- با پیت پلاستیکی یکبار مصرف همراه جعبه، یک قطره ادرار مشکوک، یک قطره ادرار کنترل مثبت و یک قطره ادرار کنترل منفی را بر روی لام قرار دهید.
  - ۳- یک قطره از آنتی‌بادی ضد هورمون hCG را با قطره چکان شیشه مربوطه بر روی هر کدام از قطره‌های ادرار روی لام اضافه کنید.
  - ۴- با اپلیکاتورهای چوبی جداگانه، قطرات فوق را مخلوط کنید. اینکار نباید بیش از سی ثانیه طول بکشد.
  - ۵- شیشه محتوی آنتی‌ژن لاتکس را به آرامی تکان داده تا بصورت سوسپانسیون یکنواختی درآمده و سپس با قطره‌چکان شیشه، یک قطره به هر کدام از قطرات روی لام اضافه کنید. اگر مواد سازنده کیت تشخیص حاملگی گراویندکس ساخت موسسه Ortho باشد، دو قطره از این آنتی‌ژن را باید اضافه کرد.
  - ۶- با اپلیکاتورهای چوبی جداگانه، قطرات هر نمونه را به آرامی مخلوط و به اندازه دایره‌ای به قطر ۵/۲ سانتی‌متر، هر کدام از آنها را پهن نمایید.
  - ۷- لام را به آهستگی در دست یا روی روتاتور حرکت دورانی داده و در عرض دو دقیقه نتیجه آزمایش را در زیر نور یک چراغ رومیزی بخوانید. چنانکه بعد از دو دقیقه نتیجه خوانده شود، ممکن است بعلت خشک شدن مواد روی لام، خودبخود ایجاد آگلوتیناسیون (Autoagglutination) شود.
- اندازه‌گیری نیمه‌کمی (Semi-quantitative) هورمون hCG در ادرار ۲۴ ساعته:
- گاهی اوقات لازم است که مقدار نسبی هورمون hCG را در ادرار محاسبه نمود. برای اینکار باید مراحل زیر را انجام داد.
- ۱- ادرار ۲۴ ساعته را در یک ظرف شیشه‌ای تمیز جمع‌آوری نموده و حجم آن را (V) محاسبه نمایید.
  - ۲- ادرار جمع‌آوری شده را بخوبی مخلوط کرده و نمونه‌ای از آنرا بردارید.
  - ۳- نمونه ادرار را بطور سری با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد نمک طعام در لوله‌های آزمایش بترتیب ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸ و غیره رقیق کنید.
  - ۴- یک قطره از هر لوله را با پیت پلاستیکی برداشته و مطابق روش کیفی برای وجود یا عدم وجود هورمون hCG آزمایش کنید.
  - ۵- آخرین لوله‌ای که آگلوتیناسیون در آن مشاهده نشود آزمایش مثبت است و تیر هورمون hCG آن

ادرار می‌باشد.

۶- مقدار هورمون hCG در ادرار ۲۴ ساعته از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$IU/24 \text{ hours} = V \times D \times S$$

V- حجم (Volume) ادرار ۲۴ ساعته.

D- مخرج کسر (Denominator) تیترو هورمون.

S- حساسیت (Sensitivity) مواد. حساسیت مواد هر جعبه در بروشور آن نوشته شده است و عبارتست از حداقل هورمون hCG که در یک میلی‌لیتر ادرار با مواد آن جعبه قابل تشخیص می‌باشد.

برای سهولت مطلب به مثال زیر توجه کنید: اگر حجم ادرار ۲۴ ساعته برابر  $V = 1580 \text{ ml}$ ، تیترو هورمون hCG ادرار برابر ۱:۸ و  $D = 8$  و حساسیت مواد آزمایش  $S = 3/5 \text{ IU/ml}$  باشد، بنابراین مقدار هورمون hCG در ادرار ۲۴ ساعته برابر است با:

$$1580 \times 8 \times 3/5 = 44240 \text{ IU}/24 \text{ hr}$$

### تفسیر آزمایش

بطور کلی در یک حاملگی طبیعی، مقدار هورمون hCG حدود ۳ تا ۵ روز بعد از عقب افتادن عادت ماهانه در ادرار برابر  $500 - 300 \text{ IU/l}$  و یک هفته بعد به  $1000 \text{ IU/l}$  می‌رسد. امروزه با افزایش حساسیت کیت‌های تشخیص هورمون و استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی یا آنتی‌بادی ضد زنجیره  $(\beta\text{-hCG})$ ، می‌توان این مقادیر هورمون را براحتی در ادرار تشخیص داد. در صورت منفی بودن آزمایش حاملگی با روش آگلوتی‌ناسیون لاتکس در ادرار و برای تأیید آن، باید آزمایش را یک هفته بعد تکرار، یا با آزمونهای حساستری مانند RIA یا الیزا، هورمون hCG را در سرم یا ادرار جستجو کرد.

معمولاً بندرت در یک آبستنی طبیعی مقدار هورمون hCG از حد معمول تجاوز می‌کند بجز بارداری چندقلو، بنابراین نباید فقط با افزایش غیر عادی مقدار هورمون hCG، به بیماریهای تروفوبلاستیک فکر کرد. افزایش غیر طبیعی مقدار هورمون hCG در سرم یا ادرار زنان در روزهای ۶۰ تا ۱۲۰ حاملگی و پایداری این افزایش در بیماریهای، مول هیداتیدفرم (Hydatidiform mole)، کوریوکاریسینوما (Choriocarcinoma)، و بطور نادر در مواردی چون کاریوکاریسینومای اولیه تخمدان و Embryonal carcinoma، Dysgerminoma و Endodermal sinus tumor مشاهده می‌شود.

بعلاوه در مردان مبتلا به تومورهای بیضه (Testicular tumor) مانند Seminomas و Teratomas و همچنین تومورهای تولید کننده هورمون hCG مانند سرطان ریه (Lung carcinoma)، از زنجیره  $(\beta\text{-hCG})$  بعنوان شاخص یا مارکر تومور استفاده می‌شود.

چنانکه سه ماه از وضع حمل و یا سقط جنین گذشته و بارداری مجددی نباشد، ولی هورمون hCG در ادرار یافت شود، احتمال بیماریهای تروفوبلاستیک وجود دارد. بعلاوه افزایش غیر طبیعی مقدار هورمون

hCG، می‌تواند موجب بروز توکسمی حاملگی قبل از هفته ۲۴ حاملگی بشود. از طرف دیگر ممکن است مقدار هورمون hCG بعد از هفته چهارم حاملگی کاهش یافته و یا افزایش طبیعی را نداشته باشد. این وضعیت در حاملگی خارج از رحمی (Ectopic pregnancy (EP و سقط جنین دیده می‌شود. در صورت پاره شدن لوله رحم (Fallopian tube) در حاملگی خارج از رحمی، کاهش هورمون hCG سریعتر صورت می‌گیرد.

امروزه با اندازه‌گیری مقدار هورمون ( $\beta$ -hCG) در سرم و انجام سونوگرافی به تشخیص و درمان حاملگی‌های غیر طبیعی (سقط‌ها، حاملگی خارج از رحم و بیماری‌های تروفوبلاستیک) کمک فراوانی می‌شود.

یکی از مسائلی که بعضاً برای پزشکان سؤال برانگیز و برای آزمایشگاه مسئله آفرین می‌شود، جواب‌های مختلف آزمایش تشخیص هورمون hCG یک بیمار است که تکرار آزمایش ممکن است نتیجه قبلی را (Reproducibility) تأیید ننماید. عوامل زیر در بروز این مسئله دخالت دارند:

۱- غیر یکنواختی یا هتروژنی (Heterogeneity) مولکول‌های hCG- مقدار اسید سیالیک Sialic acid مولکول‌های hCG در خانمها و در طول بارداری و همچنین در بیماری‌های مختلف، متغیر است. بنابراین عدم وجود مقدار ثابت و معین اسیدسیالیک، سبب بروز هتروژنی در مولکول‌های این هورمون شده و در نتیجه واکنش آنتی‌بادی علیه آن همیشه یکجور نخواهد بود. تحقیقات انجام شده، نشان داده است که رابطه مستقیمی بین مقدار اسید سیالیک، قدرت بیولوژیکی و نیمه عمر هورمون hCG وجود دارد. اگر بطور تجربی و تدریجی مقدار اسید سیالیک مولکول را کاهش دهیم، فعالیت بیولوژیکی و نیمه عمر هورمون در خون نیز کاهش می‌یابد و همچنین برعکس. در اوایل حاملگی، نیمه عمر هورمون hCG ۲ تا ۶ ساعت است که بتدریج افزایش یافته و به ۱۲ تا ۳۶ ساعت می‌رسد. از طرف دیگر در اوایل حاملگی هر ۱/۵ روز و سپس هر سه روز و در اواخر دوره حاملگی هر چهار روز مقدار سنتر هورمون hCG دو برابر می‌شود.

۲- نوع آنتی‌بادی ضد هورمون hCG- از آنجائیکه در روش‌های سرولوژی و ایمونولوژی، از آنتی‌بادی برای تشخیص و اندازه‌گیری هورمون استفاده می‌شود، بنابراین نوع آنتی‌بادی در نتیجه آزمایش دخالت دارد. بدین ترتیب که آنتی‌بادی ممکن است علیه مولکول کامل Intact hCG ( $\beta$ -hCG) یا آنتی‌بادی منوکلونال ضد شاخص اختصاصی زنجیره ( $\beta$ -hCG) باشد که در نتیجه درجه ویژگی (Specificity) و قدرت آنها (Affinity) با هم فرق دارند.

از طرف دیگر، آنزیمی را بنام الاستاز لکوسیت انسانی (Human leukocyte elastase) در سرم پیدا کرده‌اند که زنجیره بتای هورمون hCG را شکسته و سبب غیر فعال شدن آن و جدا شدن قطعه‌ای بنام قطعه مرکزی بتا ( $\beta$ -Core fragment) از مولکول می‌گردد. این مسئله سبب کاهش واکنش بعضی از آنتی‌بادی‌ها نسبت به این قطعات شکسته شده هورمون می‌شود. ادرار خانمهای باردار دارای مقدار قابل توجهی قطعه مرکزی بتا می‌باشد.

۳- مرجع رسم منحنی استاندارد هورمون- نمونه مرجع در کیت‌های اندازه‌گیری کمی هورمون hCG

(ساخت شرکتهای مختلف) که برای رسم منحنی استاندارد (Calibration) استفاده می‌شود، یکسان نیستند. بنابراین نتایج حاصله حتی برای یک نمونه بیمار اگر یک مرجع استاندارد استفاده نشده باشد، قابل مقایسه نمی‌باشند.

در سال ۱۹۳۸، اولین نمونه مرجع هورمون hCG بر اساس واحد بین‌المللی (IU)، توسط سازمان بهداشت جهانی استاندارد شد. این مرجع بعلت دارا بودن قطعات فراوان هورمون شکسته شده و از نظر بیولوژیکی غیر فعال، در سال ۱۹۶۴ مورد تجدید نظر قرار گرفت و مرجع دیگری بنام دومین استاندارد بین‌المللی هورمون hCG (Second international standard, 2nd IS-hCG) ساخته شد. این مرجع نیز بعلت دارا بودن قطعات غیر فعال و ناخالص تغییر نمود و در سال ۱۹۷۴، مرجع استاندارد بسیار خالص از مولکول کامل هورمون Intact hCG و بدون زنجیره‌های آلفا، بتا و قطعات شکسته شده ساخته شد. این استاندارد را بنام «اولین نمونه مرجع بین‌المللی هورمون» (First international reference preparation) یا به اختصار 1st IRP-hCG نامگذاری کردند که در حقیقت سومین استاندارد بین‌المللی (3rd IS-hCG) محسوب می‌شود. از نظر وزنی، قدرت بیولوژیکی 2nd IS-hCG، حدود نصف 1st IRP-hCG یا 3rd IS-hCG می‌باشد. بنابراین اگر در یک روش از مرجع 2nd IS-hCG برای رسم منحنی استفاده شود، نتیجه حاصله برابر نصف ارزشی است که از مرجع 1st IRP-hCG یا 3rd IS-hCG استفاده شده است. لازم است هنگام مطالعه مقالات و مقایسه مقادیر هورمون و یا گزارش یک آزمایش، توجه به مرجع استاندارد نیز بشود.

۴- روش آزمایش - روشهای مختلفی برای اندازه‌گیری کیفی و کمی هورمون hCG وجود دارد که درجه حساسیت یا حداقل مقداری را که شناسائی و اندازه‌گیری می‌کنند، با یکدیگر متفاوت است. بنابراین اگر بعلت پائین بودن درجه حساسیت یک روش هورمون hCG در نمونه تشخیص داده نشود، با روش حساستر دیگری، ممکن است نتیجه مثبت شود. بر همین اساس، پیشنهاد شده است که اندازه‌گیری مقدار هورمون hCG با حداقل دو کیت آزمایشگاهی مختلف، انجام گیرد.

در موارد زیر ممکن است آزمایش تشخیص حاملگی بطورکاذب مثبت شود:

- ۱- در دوران یائسگی (Menopause) و بعد از آن، به دلیل افزایش هورمون LH.
- ۲- در اواسط دوره‌های قاعدگی (Midmenstrual cycle) زنان و دختران جوان به دلیل بالا رفتن مقدار سنتر هورمون LH.
- ۳- مصرف بعضی از داروها مانند Phenothiazines و Promethazine می‌توانند مقدار هورمون LH را افزایش دهند.
- ۴- بالا بودن مقدار پروتئین ادراری (Proteinuria) به مقدار بیش از یک گرم در ادرار ۲۴ ساعته. این مسئله در روش آگلوتینی ناسیون لاتکس مؤثر است ولی در آزمایشات الیزا و RIA تأثیری ندارد.
- ۵- عفونتهای دستگاه ادراری یا بیماری التهابی لگن (Pelvic inflammatory disease) در روش آگلوتینی ناسیون لاتکس ادرار دخالت دارند.

- ۶- وجود گلبولهای قرمز بمقدار زیاد در ادرار (Hematuria) و همولیز واضح گلبولهای قرمز در سرم.
- ۷- مصرف داروهای خواب آور مانند اسید باریتوریک (فنوباریتال)، داروهای مسکن مانند متادون و سالیسیلاتها.

بعلت تشابه بسیار زنجیره بتای هورمونهای hCG و LH با یکدیگر، در صورتیکه آنتی بادی ضد هورمون hCG از درجه ویژگی Highly specific لازم برخوردار نباشد، ایجاد مثبت کاذب می شود. امروزه اگرچه با استفاده از آنتی بادی منوکلونال علیه شاخص های آنتی ژنی انتهائی زنجیره ( $\beta$ -hCG) (که در زنجیره ( $\beta$ -LH) وجود ندارد) توانسته اند آنتی بادی اختصاصی تولید کنند، ولی متأسفانه به دلیل قدرت اتصال بسیار کم Low affinity این آنتی بادی، موارد منفی کاذب زیادی دیده شده است. اخیراً توانسته اند یک آنتی بادی منوکلونال بسیار پر قدرت High affinity با درجه ویژگی بسیار Highly specific علیه اپی توپ منحصر بفرد زنجیره ( $\beta$ -hCG) تولید کنند که موارد مثبت و منفی کاذب با این آنتی بادی به حداقل می رسد.

توصیه می شود که آزمایشگاهها، برای اطمینان از کیفیت هر کیت تشخیص هورمون hCG در سرم، ابتدا یکبار با سرمی که مقدار هورمون LH آن بالا است، مانند سرم بعد از دوره یائسگی، آزمایش را انجام داده تا درجه ویژگی و حساسیت آن کیت معلوم شود.

موارد منفی کاذب تشخیص هورمون hCG در ادرار به قرار زیر می باشند:

۱- خطای آزمایشگاهی مانند عوض شدن نمونه و یا برگه آزمایش، آلوده بودن وسایل آزمایش، نداشتن تجربه کافی در انجام آزمایش و غیره

۲- عوامل مربوط به کیت تشخیص هورمون hCG، مانند حساسیت پائین کیت، محدودیت دامنه ویژگی کیت، فاسد بودن مواد کیت بعلت نگهداری در محیط های نامناسب مثلاً حرارت زیاد یا برعکس سرمای زیر صفر درجه سانتیگراد، انجام آزمایش در محیط سرد، تغییر PH مواد کیت، گذشتن تاریخ مصرف و غیره

۳- ابتدای شروع حاملگی و کم بودن مقدار هورمون hCG در نمونه.

۴- رقیق بودن ادرار بعلت مصرف زیاد مایعات.

کاربرد شناسائی و اندازه گیری هورمون hCG:

۱- تشخیص بارداری، هنگامیکه قاعدگی عقب افتاده است.

۲- تشخیص بیماریهای تروفوبلاستیک (Gestational trophoblastic diseases, GTD).

۳- پیش آگهی و کنترل درمان بیماریهای تروفوبلاستیک. در این گونه موارد تیتراژ دقیق هورمون ( $\beta$ -hCG) در سرم ضروری است.

۴- تشخیص بعضی از سرطانهاییکه زنجیره ( $\beta$ -hCG) بعنوان شاخص یا مارکر تومور برای آنها شناخته شده است.

۵- بعد از جراحی تومورهاییکه با ستر و افزایش ( $\beta$ -hCG) همراه هستند و کنترل درمان آنها.

۶- تشخیص حاملگی خارج از رحمی، سقط جنین و حاملگی های غیر طبیعی.

۷- قبل از تجویز داروئیکه اثرات سوء روی جنین (Teratogenic) دارند، مانند قرص‌های کنترل موالید، استروئیدها، آنتی‌بیوتیکهای خاص مانند تتراسیکلین و کلروآمفنیکل باید مطمئن شد که حاملگی وجود ندارد.

۸- قبل از شیمی درمانی و پرتودرمانی

۹- قبل از عکسبرداری با اشعه ایکس (X-ray).

۱۰- کنترل لانه‌گزینی جنین در باروری آزمایشگاهی (In vitro fertilization (IVF نکاتی چند درباره تشخیص سرولوژیکی حاملگی:

۱- برای خواندن نتیجه آزمایش از نور مستقیم چراغ مطالعه استفاده کنید. در صورتی که لامپ آن فلوئورسنت باشد آگلوتیناسیون واضح‌تر دیده می‌شود.

۲- مواد آزمایش را باید در یخچال ۶-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد و هرگز نباید دچار یخزدگی شوند. همچنین تاریخ مصرف آنها نیز نباید گذشته باشد.

۳- نمونه ادرار باید تازه باشد و بهتر است از زمان نمونه‌برداری بیش از ۱۲ ساعت نگذشته باشد و در طول این مدت نیز نمونه را در یخچال نگهداری نمائید.

۴- ادرار صبحگاهی که غلیظ‌تر می‌باشد برای آزمایش بهتر است، ولی از ادرار طول روز هم بشرط غلیظ بودن می‌توان برای آزمایش استفاده نمود. مقدار هورمون hCG در ادرار صبحگاهی، تقریباً برابر سرم است. وزن مخصوص (Specific gravity) یک لیتر از ادرار ۲۴ ساعته شخص سالم بین ۱۰۱۶ تا ۱۰۲۲ گرم می‌باشد. حال اگر نمونه ادراری بطور تصادفی (Random) گرفته شود و وزن مخصوص آن برابر ۱۰۲۳ یا بیشتر شد، احتمالاً بعلت تغلیظ بودن خصوصاً ادرار صبحگاهی می‌باشد، زیرا که وزن مخصوص ادرار در طول شبانه‌روز، متغیر است. بنابراین بهتر است که وزن مخصوص ادراری که برای آزمایش تشخیص حاملگی ارسال می‌شود، اندازه‌گیری و در برگه جواب آزمایش بنویسید.

۵- چنانکه نمونه ادرار را بعد از ۴۸ ساعت می‌خواهید آزمایش کنید، جهت جلوگیری از رشد میکروبها در آن باید در منهای بیست درجه سانتی‌گراد آنرا یخ بزنید. هنگام آزمایش، پس از ذوب ادرار، آنرا بهم زده و مواد رسوبی آنرا بوسیله سانتریفیوژ جدا و سپس آزمایش نمائید.

۶- حدود ۶۰ میلی‌لیتر ادرار برای آزمایش لازم است که باید شفاف باشد. در صورتی که کدورتی در آن مشهود بود باید ابتدا آنرا صاف و یا سانتریفیوژ نمائید تا کدورت آن از بین برود.

۷- نمونه ادراری که بطور مشخص پر از باکتری و کدر است، برای تشخیص حاملگی مناسب نمی‌باشد.

۸- نمی‌توان بجای ادرار از سرم برای تشخیص حاملگی با روش آگلوتینی ناسیون لاتکس استفاده کرد.

۹- شیشه‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی کیت‌هایی که ساخت یک کارخانه می‌باشند ولی شماره سری (Lot.No.) آنها متفاوت است نباید با یکدیگر مخلوط کرد زیرا که قدرت هر کدام با دیگری فرق می‌کند. البته می‌توان شیشه‌هایی که شماره‌های سری آنها با هم یکی می‌باشند و ساخت یک شرکت هستند، با هم استفاده کرد.

۱۰- لامهای شیشه‌ای برای آزمایش باید کاملاً تمیز و خشک باشند. برای تمیز کردن لامها باید فقط از

آب استفاده کرد، زیرا که بکار بردن مواد پاک‌کننده مانند صابون، پودر و حلالهای آلی می‌تواند در نتیجه آزمایش مداخله کند. ضمناً درجه حرارت لام باید مانند مواد آزمایش و نمونه ادرار در محدوده ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد محیط باشد.

۱۱- ادرار بایستی در یک ظرف شیشه‌ای و یا پلاستیکی تمیز و عاری از هرگونه مواد پاک‌کننده و یا نگهدارنده از قبیل مانتول یا تولوئین جمع‌آوری و به آزمایشگاه ارسال شود.

۱۲- قبل از انجام آزمایش، بروشور جعبه آزمایش را بدقت بخوانید، زیرا ممکن است روشهای موسسات مختلف تولیدکننده مواد تشخیص حاملگی اندکی با یکدیگر تفاوت داشته باشند.

۱۳- حدود ۴۸ ساعت قبل از آزمایش، داروهای مسکن مانند متادون و سالیسیلاتها و خواب‌آور مانند ترکیبات اسید باریتوریک (فنوباریتال) نباید مصرف کرد.

۱۴- بعضی از مواد و سرمهای تشخیصی، حاوی ماده ضد میکروبی سدیم ازید (N3Na) می‌باشند. سدیم ازید با سرب و مس، می‌تواند ترکیب قابل انفجاری را تولید نماید. بنابراین هنگام شستن این مواد، باید از آب بیشتری استفاده نمائید. بعلاوه این مواد نباید با پوست و مخاط بدن تماس حاصل نمایند.

۱۵- اگر مقدار هورمون hCG را در سرم می‌خواهید اندازه‌گیری نمائید، باید نمونه خون را بدون مواد ضد انعقادی در لوله آزمایش تمیزی بریزید و پس از انعقاد و جدا کردن لخته از دیواره لوله آزمایش با یک میله چوبی، سرم آنرا بوسیله سانتریفیوژ جدا نمائید. سرم تهیه شده را می‌توان تا مدت ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری نمائید. برای مدت بیشتر باید آنرا در ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا کمتر تا روز آزمایش نگهداری کرد. ضمناً از یخ زدن و آب کردن مکرر سرم خودداری شود.

۱۶- در صورتیکه نمونه سرم دارای خون همولیز واضح، چربی زیاد و یا کدر باشد، نتیجه آزمایش ممکن است بدرستی معلوم نشود و جواب کاذب حاصل گردد.

۱۷- بالا بودن مقدار پروتئین سرم و ادرار، در اندازه‌گیری مقدار هورمون hCG با روشهای RIA و الیزا، مشکلی ایجاد نمی‌کند ولی در روش آگلوتینی ناسیون لاتکس ادرار، سبب بروز مثبت کاذب می‌شود. به همین دلیل بهتر است که آلبومین ادرار کنترل شده و در برگه جواب آزمایش حاملگی، نتیجه آن گزارش شود.