

## دستگاه های شستشو گر الیزا (1)(Elisa Washers)

در کلیه آزمون های سنجش ایمنی اعم از رقابتی و غیررقابتی، میزان ثابتی از مولکول های نشاندار به همه لوله ها یا چاهک ها افزوده می شود. به عبارتی میزان tracer رادیواکتیو در لوله های استاندارد - کنترل و بیمار در آزمون های RIA و IRMA برابر بوده و یا میزان کونژوگه آنزیمی در چاهک های استاندارد - کنترل و بیمار در آزمون های EIA و IEMA یکسان است.

لذا پس از انجام واکنش چنانچه اتصال آنتی ژن - آنتی بادی روی سیگنال ارسالی تأثیری نداشته باشد، کلیه لوله ها یا چاهک ها دارای مولکولهای نشاندار یکسانی هستند و سیگنال همه آنها با هم برابر است. یکسان بودن سیگنال مربوط به کلیه استانداردها، کنترل ها و نمونه ها به معنای ناتوانی در سنجش و اندازه گیری است. به همین خاطر مرحله جداسازی مولکول های نشاندار واکنش داده از مولکولهای نشاندار آزاد، ضروری می باشد. اینگونه سنجشها که نیاز به جداسازی مولکول های نشاندار در دو وضعیت را دارند به سنجش های غیر یکنواخت یا Heterogonous معروف هستند.

به هر طریقی که بتوان مولکول های نشاندار آزاد و متصل را جدا کرد، رابطه ای میان غلظت و سیگنال ایجاد خواهد شد. محققان از روش های متعددی برای این امر استفاده نموده اند که در دو دسته کلی جای میگیرند:

الف - روش های فاز مایع (Liquid Phase)

ب - روش های فاز جامد (Solid Phase)

در روش های فاز مایع، اجزاء واکنش همگی در ابتدا محلول بوده و هیچکدام تثبیت نشده اند اما پس از واکنش میان آنتی ژن - آنتی بادی، مولکولهای نشاندار واکنش داده را از مولکول های آزاد مذکور جدا می کنند.

اگر یکی از اجزاء واکنش را تثبیت کرده باشند روش را فاز جامد میگویند مثلاً اگر آنتی ژن یا آنتی بادی بر روی سطحی مانند داخل چاهک ها متصل شده باشد، این روش فاز جامد خوانده میشود. در روش های فاز جامد، ساده ترین راه برای جداسازی مولکولهای نشاندار واکنش داده از مولکولهای آزاد، شستشوی ساده می باشد. امروزه بیش از 90٪ آزمونهای سنجش ایمنی در آزمایشگاه های تشخیص طبی جزء ۱- سیستم غیر یکنواخت و ۲- از نوع فاز جامد می باشند. لذا در کلیه روش های مذکور مرحله شستشو وجود دارد. در کیت های مذکور از آب شیر، آب مقطر تا محلول های پیچیده بافری برای شستشو ممکن است بهره گرفته شود.

## اهمیت مرحله شستشو

همانطور که اشاره شد اگر در آزمونهای فاز جامد غیر یکنواخت، مرحله شستشو وجود نمی داشت اصلاً هیچگونه ارزیابی کمی یا کیفی امکان پذیر نبود لذا از یک نظر مرحله شستشو جزو بنیان روش محسوب شده و نیاز آن اساسی است. اما از لحاظ کیفیت اجرای آزمون نیز این مرحله حائز اهمیت است. یعنی برای اخذ پاسخ هایی صحیح و خصوصاً دقیق باید این مرحله را به خوبی اجرا نمود. چنانچه مرحله شستشو با محلول، ابزار و شخص مناسب انجام نشود، در اغلب موارد حساسیت روش مذکور را خدشه دار می کند. بنابراین برای خارج ساختن مولکول های نشاننداری که اتصال غیر ویژه ای (Non-Specific Binding) دارند، باید این مرحله با دقت خوبی اجرا شود. برای اجرای صحیح این مرحله سه فاکتور حائز اهمیت می باشد:

۱- محلول شستشو

۲- روش شستشو

۳- فرد شستشوگر

محلول شستشو

انتخاب محلول شستشو به نوع اتصال مولکول نشاندار به فاز جامد بستگی دارد. گاهی این مولکولها با پیوندهایی که بطور غالب از نوع یونی هستند و بر هم کنش الکترواستاتیک دارند، متصل شده اند و زمانی با پیوندهایی با برهمکنش هیدروفوب، در مواردی نیز مخلوطی از این برهمکنش ها وجود دارد. برای درهم شکستن این اتصالات غیر ویژه، نوع و شدت برهم کنش مهم می باشد. مثلاً برای شکستن برهم کنش های یونی میتوان از محلول های نمکی استفاده کرد اما هر قدر میزان شدت این برهم کنش ها بیشتر باشد از قدرت یونی بیشتری بایداستفاده کرد یا به عبارتی غلظت نمک در محلول شستشو باید بیشتر باشد. در ضمن باید مراقب بود که این افزایش غلظت به پیوندهای ویژه مولکولهای نشاندار آسیبی نرساند، برای از بین بردن اتصالات غیر ویژه از نوع هیدروفوب غالباً از شوینده ها (Detergents) استفاده می شود، در اینجا نیز نوع و غلظت شوینده مهم است. در بسیاری موارد، مخلوطی از برهم کنش ها در اتصالات غیر ویژه وجود دارد لذا محلول های شستشو حاوی نمک (مانند NaCl) و شوینده (مانند Tween) 20 می باشند. نباید فراموش کرد که این محلول با مولکول های نشاننداری که بصورت ویژه متصل شده اند در تماس می باشد لذا نباید به آن آسیبی برساند. به همین خاطر محلول های شستشو از نوع بافر بوده و یا pH آنها در حدود pH خنثی می باشد.

به هر حال با توجه به نوع برهمکنش ها و شدت آنها طیف وسیعی از محلولها برای شستشو استفاده میشوند. انواع بافرهای پیچیده تا آب شیر و آب مقطر ممکن است برای این منظور بکار روند. نباید فراموش کرد که

ذیصلاح ترین منبع برای انتخاب نوع محلول شستشو، کارخانه سازنده کیت می باشد چرا که از ماهیت آنتی ژن – آنتی بادی – برهمکنش ها – شدت ها و ... اطلاع داشته و بهترین توصیه را ارائه داده است. لذا همیشه نه تنها از محلول شستشویی که متعلق به کمپانی سازنده است باید استفاده کرد، نوع محلول شستشو در کیت های مختلف یک کمپانی می تواند متفاوت باشد. لذا علاوه بر نوع کمپانی، نوع کیت و سری ساخت محلول نیز باید رعایت شود.

مثلاً برای شستشوی میکروپلیت کیت الایزای T<sub>4</sub> کمپانی RADIM فقط باید از محلول شستشوی T<sub>4</sub> کیت کمپانی مذکور که سری ساختی مطابق خود کیت دارد استفاده کرد. گاهی تغییراتی که در هر سری ساخت بوجود می آید، سبب نامناسب شدن یک محلول برای سایر اجزاء دارای سری ساخت یکسان می گردد لذا رعایت این نکته لازم می باشد.