

ایمونونفلومتری (Immunonephelometry)

این کلمه متشکل از سه جزء است. "نفلو" به معنی ابر (در اینجا تسامحا به معنی غبار) و "متری" به معنی سنجش میباشد.

عنوان آزمایش امروز:

ایمونونفلومتری برای سنجش کمی ایمیون کمپلکس ها (IC) در محیط محلول

با تامل در این عنوان، چند نکته روشن میشود:

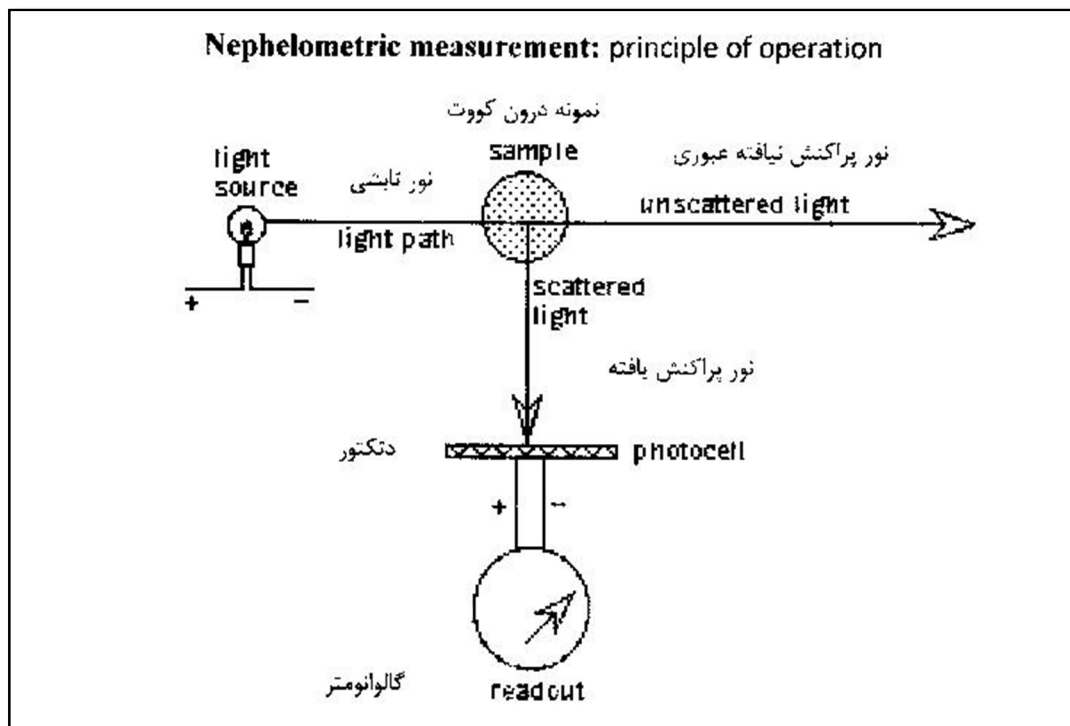
اولا نفلومتری کاربردهایی خارج از حیطه ایمونولوژی نیز دارد (مثلا در صنعت برای سنجش میزان آلودگی هوا) منتها در ایمونونفلومتری از واکنش آنتی ژن با آنتی بادی کمک میگیریم.

ثانیا همبسته های ایمونولوژیک (IC) ناشی از واکنش آنتی ژن و آنتی بادی، در محیط مایع و محلول (و نه محیط نیمه جامد آگار در SRID) شکل میگیرند.

ثالثا نتیجه این آزمایش به طریق کمی یا quantitative گزارش میگردد (که برتر از جوابهای نیمه کمی یا نیمه کیفی یا حتی کیفی قلمداد میشود).

اساس آزمایش:

واکنش سرولوژی نوع II مبتنی بر پرسپیتاسیون در محیط آبگون و سپس سنجش میزان نور لیزر پراکنده شده از محلول غیر شفاف (حاوی کمپلکس آنتی-ژن - آنتی بادی) در زاویه غیر مستقیم.



کاربردها:

اندازه گیری ایمونولوژیک آنالیت‌های مختلف در بدن اعم از مواد مرتبط با سیستم ایمنی و سایر مواد و مولکول‌ها در بدن

الف) کاربردهای ایمونولوژیک: اندازه‌گیری IgA, IgE (G1,G2,G3,G4), IgG, IgM, C3, C4, C₁INH, light chain و غیره.

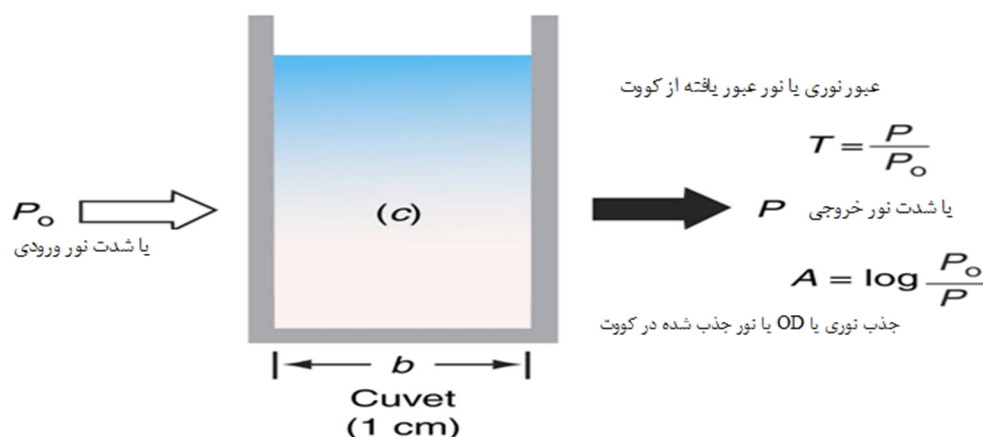
ب) کاربردهای غیر ایمونولوژیک: اندازه‌گیری ترانسفرین، آلبومین، میکروآلبومین، HbA1C، سروپلاسمین، هاپتوگلوبین و غیره.

جایگاه آزمایش بین اقران:

تکنیک نفلومتری (غبارسنجی) دارای شباهتها و تفاوت‌هایی با اقران خود یعنی با تکنیک توربیدیمتری (کدورت سنجی) و تکنیک‌های فوتومتری (نورسنجی یا اصطلاح بهتر کالریمتری و رنگ سنجی) می‌باشد.

تکنیک فوتومتری خود به دو صورت اسکپتروفوتومتری و فیلترفوتومتری قابل انجام است - بسته به توانایی دستگاه در تدارک چند طول موج مشخص بکمک ۴ تا ۸ صافی نوری (که مثلاً در دستگاه‌های الیزاریدر وجود دارد) یا تامین طیفی گسترده از طول موج‌های متفاوت به کمک منشور (prism) یا کرکره نوری (grating).

امروزه در آزمایشگاه‌ها برای سنجش ایمونولوژیک برخی آنالیت‌ها، از توربیدیمتری استفاده می‌شود که کیت‌های بکار رفته در آن آزمایش‌ها مشابه کیت‌های نفلومتری هستند (مشمول بر آنتی سرم ضد آنالیت مجهول) و گران می‌باشند اما متأسفانه برای انجام آنها از دستگاه‌های اسپکتروفوتومتر (البته با یک طول موج محدود در حکم توربیدیمتر) یا از فیلترفوتومتر (مثلاً روی اتوآنالیزورها) استفاده می‌کنند که دقت کمتری در قیاس با نفلومترها دارند.



در حین ارائه درس عملی، برحسب زمان در اختیار، مثالهایی از کاربردهای رفاکتومتری و رفلکتومتری و غیره نیز بیان خواهد شد.

تفاوت‌ها و شباهت‌های نفلومتری با اسپکتروفوتومتری و توربیدیمتری:

نام تست	چشمه نوری	ماهیت نمونه	کاربرد	ماهیت ذرات	ماهیت محلول	فیزیک عبور نور
Photometry شامل Spectrophotometry طیف سنجی نوری و Filter Photometry	طیف	محلول کاملاً شفاف و معمولاً رنگی	انواع پروتئین‌ها و مواد دیگر	مولکول $d < 0.001$	حقیقی (تک فازی)	Abs/T $I_0 \rightarrow I_1$
Nephelometry غبار سنجی	تک رنگ معمولاً از نوع لیزر قرمز رنگ	محلول غیر شفاف غیر رنگی	کمپلکس‌های ایمنی	ذرات نامحلول $d > 0.1$	کلوئیدی	$Abs/T/Scatter$
Turbidometry کدورت سنجی	تک رنگ معمولاً ۴۰۵ تا ۴۸۰ نانومتر	محلول کدر غیر رنگی	پروتئین ادرار یا CSF و غیره	ذرات درشت معلق	سوسپانسیون (کلوئیدی درشت)	$Abs/T/Reflect/$ $Scatter$

در اسپکتروفوتومتری جذب (Absorbance) را می‌سنجیم که در واقع جذب واقعی نیست بلکه مجموعه نورهای نرسیده به دکتور می‌باشد، خواه نورهایی که جذب مولکول‌های کوچک شده‌اند و خواه نورهایی که بدلیل برخورد با مولکول‌های بزرگ بازتاب پیدا کرده‌اند و به دکتور نرسیده‌اند.

نفلومتری شبیه توربیدیمتری است (از این نظر که نور جذبی و نور انعکاسی در آن تولید می‌شود) ولی اولاً دکتور آن در مسیر مستقیم نیست و ثانیاً یک منبع نور تکفام (مثل لیزر) دارد.

عوامل مؤثر بر پراکنش نور در نفلومتری:

۱- λ یا طول موج نور تابشی (که در نفلومترهای خوب، لیزر قرمز (لیزر یاقوت یا آرگون یا مشابه آنها) با طول موج حدود ۶۵۰ نانومتر است.

۲- d یا اندازه ذرات موجود در نمونه مورد بررسی (ابعاد کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی).

۳- C یا غلظت ماده‌ی مورد سنجش در نمونه. هرچه غلظت ماده مجهول بیشتر باشد، پراکنش نور بیشتر بوده و به همان نسبت، عدد نهایی جواب هم بالاتر خواهد بود.

خصوصیات نور لیزر:

۱- تک فام است (یعنی پهنای باند خیلی کم است و از یک رنگ واحد تشکیل شده است).

۲- شدید و قوی است (و تا فواصل دور با همان شدت اولیه می‌تابد).

۳- همدوس (Coherent) است (یعنی خاصیت واگرایی ندارد).

ارزشیابی و تفسیر:**مزایای نفلومتری:**

- ۱- زمان کوتاه. کل فرایند آزمایش خیلی سریع است.
- ۲- وابستگی به دیگر بیماران ندارد.
- ۳- کمی است.
- ۴- حساسیت بیشتر از توربیدیمتری و دستگاه های اتوآنالایزر
- ۵- ویژگی بالا: آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن استفاده می شود و اگر فاقد واکنش متقاطع باشد پاسخ تست بسیار دقیق است.
- ۶- سادگی کار و عدم نیاز به مهارت ویژه.

معایب نفلومتری:

- ۱- گرانی دستگاه
- ۲- گرانی کیت
- ۳- انحصار کیت به دستگاه (اصطلاحاً Closed بودن سیستم به نحوی که تنها باید از کیت های همان شرکت خریداری و استفاده کرد)
- ۴- پدیده ی منطقه ای یا Zone Phenomenon: از آنجایی که این روش، یک نوع آزمایش رسوب گذاری است، در غلظت بالای آنتی ژن می تواند پدیده ی منطقه ای اتفاق بیفتد و جواب تست اشتباه پایین تر از حد معمول گزارش شود.
- ۵- فعلاً غیرقابل استفاده برای هاپتن ها. در حال حاضر برای سنجش پروتئین های بزرگ کاربرد دارد.

ملزومات و روش کار:

الف) مواد و معرف های شامل کیت آزمایش و هر کیت شامل: ۱- بافر رقیق کننده نمونه ۲- آنتی سرم ضد آنالیت مورد آزمایش (مثلاً آنتی بادی خرگوشی ضد IgG یا C₃ یا C₄ انسانی) ۳- بافر رقیق کننده آنتی سرم ۴- کنترل ۱ یا کنترل L با غلظت اندک از آنالیت مورد آزمایش ۵- کنترل ۲ یا کنترل H با غلظت بالا از آنالیت مورد آزمایش

ب) دستگاه نفلومتر - برای آزمایش امروز دستگاه Minineph استفاده می شود که واجد ۳ بخش است:

- ب-۱- دستگاه اصلی است که دارای محلی برای قرار دادن کووت (cuvette chamber) است و ۳ بخش دیگر روی آن عبارتند از: صفحه کلید؛ صفحه نمایش؛ کارت خوان
- ب-۲- چاپگر سوزنی
- ب-۳- سمپلر دیجیتالی که سمپلر متغیر تک کاناله و دستور پذیر است (دانشجویان مقطع ارشد الزاماً باید روش کار این سمپلر را بیاموزند. یادگیری طرز کار برای دانشجویان علوم آزمایشگاهی توصیه می شود).

a. مشخصات:**b. مراحل کار (برای سنجش IgG سرم):**

- ۱- دستگاه را با کلید ON/OFF روشن می کنیم و اجازه می دهیم تا دستگاه گرم شود. (چاپگر متصل به دستگاه می باشد و همزمان روشن می شود). از آنجاییکه ارتباط آزمایشگر با دستگاه از نوع User Friendly و قدم به قدم می باشد، مراحل انجام کار روی صفحه نمایش دستگاه اعلام می شود.
- ۲- دستور تست دلخواه را طبق Chemistry Number به دستگاه می دهیم و کلید Enter را فشار می دهیم.
- ۳- Chemistry Card را یکبار از جلو به عقب در دستگاه می کشیم. (برای استفاده از کیت یکبار کشیدن کارت کافی است اطلاعات در حافظه دستگاه باقی می ماند).
- ۴- Lot Number کیت و محلول های واکنشگر را چک کرده و کلید Enter را فشار می دهیم.
- ۵- بر روی صفحه نمایش دستگاه، عبارت روبرو ظاهر می شود.

1-Y 2-N

IgG Lot xxxx OK?

- (در صورت صحیح بودن اطلاعات کلید ۱ و در صورت مغایر بودن کلید ۲ را فشار می‌دهیم و مراحل را از اول با کیت صحیح انجام می‌دهیم).
- ۶- کنترل‌های کیت و نمونه‌های مورد آزمایش را ابتدا به دمای اتاق رسانده و سپس به نسبت اعلام شده (معمولاً ۱/۱۱) رقیق سازی می‌کنیم و آماده به کار قرار می‌دهیم. (مثلاً ۵ میکرولیتر از نمونه و ۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده)
- ۷- برای هر آزمایش یک کووت (شامل: نمونه مجهول، کنترل ۱ و کنترل ۲) آماده کرده و با استفاده از پنس ۱ عدد مگنت (Stirring Bar میله همزن) در آن قرار می‌دهیم. در این آزمایش متأسفانه (خوشبختانه!) از استاندارد استفاده نمی‌شود بلکه نمودار استاندارد و نقاط روی آن برای هر آزمایش از طریق کارت هوشمند همراه کیت، به دستگاه اعلام می‌شود.
- ۸- ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده و کنترل‌ها را با دقت در ته کووت‌های مربوط به آنها می‌ریزیم.
- ۹- برای هر نمونه، شماره دلخواهی تخصیص می‌دهیم، شماره نمونه را به دستگاه داده و سپس کلید Enter را فشار می‌دهیم.
- ۱۰- کووت حاوی نمونه را درون محفظه آن در دستگاه قرار داده و به آرامی به سمت پائین می‌فشاریم و سپس کلید Enter را فشار می‌دهیم.
- ۱۱- با استفاده از سمپلر اتوماتیک (که آن را در وضعیت ۴ مرحله ای تنظیم کرده ایم و در ادامه، توضیح آن خواهد آمد) ابتدا ۴۰۰ میکرو لیتر از بافر IgG برداشته و سپس بدون جدا کردن نوک سمپلر بعد از فاصله دهی با هوا و تمیز کردن قسمت خارج نوک سمپلر، آن را داخل ویال آنتی سرم نموده و حجم ۴۰ میکرولیتر از آنتی سرم IgG را برداشته و سمپلر را بالای کووت قرار می‌دهیم. در این زمان با فشار دکمه، همزمان مواد برداشتی را به کووت داخل دستگاه اضافه می‌کنیم. دستگاه بطور خودکار بعد از ۱۰ ثانیه بلانک گیری، شروع به خواندن تست کرده و طی ۲۰ ثانیه (که این زمان بستگی به نوع کیت مورد استفاده دارد) تست را می‌خواند و در نهایت می‌توان نتیجه به دست آمده را از چاپگر دستگاه دریافت کرد.
- ج) طرز تنظیم سمپلر اتوماتیک دستگاه نفلومتر**
- ۱- ابتدا کلید On/Off (قرمز رنگ) سمپلر که پشت و زیر باطری آن قرار دارد را در وضعیت On قرار می‌دهیم. (سمپلر قبل از شروع کار باید شارژ شده باشد)
- ۲- صفحه نمایش سمپلر روشن شده و علامت E را نشان می‌دهد و دو بار فشار کلید روی برآمدگی (کلید شروع). سپس کلید M زیر صفحه نمایش را فشار می‌دهیم در هر بار فشار یکی از وضعیت‌های مربوط (dd, d, rP, P) را نشان می‌دهد با توجه به کیت‌های نفلومتری وضعیت dd را انتخاب کرده و کلید E (Enter) را فشار می‌دهیم سپس حجم اول را با فشار دکمه‌های بالا و پائین (▲▼) تعیین کرده و با فشار کلید E آن را تأیید می‌کنیم و سپس حجم دوم را به همان روش انتخاب کرده و با فشار کلید E آن را تأیید می‌کنیم.
- ۳- برای برداشت نمونه بعد از تنظیم دستگاه ابتدا نوک سمپلر را به سمپلر وصل کرده (نوک سمپلر باید بتواند حجم مورد نظر را متناسب با حجم دستگاه در خود جای دهد) سپس نوک سمپلر را داخل محلول اول برده و کلید شروع را یکبار فشار می‌دهیم حجم اولیه برداشته می‌شود در مرحله بعد کلید شروع را فشار داده تا فاصله‌ای با هوا بین دو حجم ایجاد شود نوک سمپلر را به آرامی تمیز کرده و درون محلول دوم فرو برده و دکمه شروع را می‌زنیم در این صورت دو حجم از مواد با فاصله درون نوک سمپلر قرار می‌گیرد. برای خالی کردن حجم‌های برداشته شده توسط سمپلر، آن را بالای کووت نگه داشته و بدون وارد کردن نوک سمپلر در محتویات کووت، با فشار دادن دکمه، همزمان هر دو گروه از مقادیر کشیده شده را خالی می‌کنیم. در این لحظه دستگاه نفلومتر به طور اتوماتیک شروع به سنجش نمونه می‌کند. (با توجه به اینکه فشار دادن تکه سمپلر پیش از زمان مناسب، هماهنگی برداشت و تخلیه محلول‌ها را به هم می‌ریزد در موقع کار به علامت فلش روی صفحه نمایش سمپلر توجه کنید. علامت ▲ به معنی برداشت محلول‌ها و علامت ▼ به معنی خالی شدن است).
- ۴- بعد اتمام ریختن محلول‌های مورد نظر و انجام تست برای خاموش کردن سمپلر، کلید قرمز پشت دستگاه را در وضعیت Off قرار می‌دهیم.