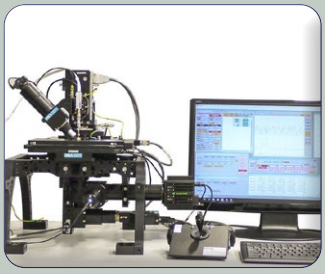
Iran Nanotechnology Laboratory Network

# Iranian Journal of laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 9 ■ Issue 1 ■ Spring 2021 ■ No.33

## What is the High-Throughput Screening (HTS) test method?



The Application of scanning electrochemical microscope in the study of corrosion of metals

Status and importance of Iran Accreditation System and general structure of certification of conformity for testing and calibration laboratories based on National Accreditation Center of Iran requirements

Honey quality tests in accordance with Iranian national standards

Introduction of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران سال نهم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۴۰۰ ■ شماره پیاپی ۳۳

نویسندگان

شراره ستوده[۱و۵*]
مرضیه انعام[۲و۵]، ساره حجی‌آبادی[۳و۵]
محمدرضا نژادمقدم[۴و۵]

*shararеh.sotudeh@gmail.com

# معرفی روش سنجش جذب ایمنی آنزیمی یا روش الایزا

## (بخش اول – اصول و کاربردهای آن)

واژه‌های کلیدی

الایزا، آنتی‌ژن، آنتی‌بادی، کمپلکس ایمنی، آنزیم کونژوگه، سوبسترا، رنگ‌سنجی.

چکیده

روش الایزا[۶] روشی ایمنوشیمی برای تعیین مقدار یک مولکول آنتی‌بادی و یا آنتی‌ژن است. در این روش از فاز جامد به‌منظور ایجاد بستری مناسب برای اتصال[۷] آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی استفاده می‌شود و سپس از آنزیم متصل به کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی به‌منظور تبدیل سوبسترا[۸] مناسب به محصول رنگی استفاده می‌شود. میزان تبدیل سوبسترا بدون رنگ به محصول رنگی توسط آنزیم را که نشانگر حضور یک آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی و نیز غلظت آن است، می‌توان با اندازه‌گیری چگالی نوری[۹] با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین کرد. این بررسی با هدف معرفی روش الایزا، کاربردهای آن، انواع روش الایزا، فواید، معایب و چالش‌ها و عوامل مهم در بهبود نتایج آزمون الایزا انجام می‌شود.

مقدمه

روش الایزا یکی از معروف‌ترین روش آزمون جذب ایمنی آنزیمی است که دارای حساسیت و ویژگی عالی بوده و قدرتمندترین روش استاندارد در تحقیقات یا کاربردهای بالینی برای پی بردن به مولکول‌های سیستم ایمنی است. مفاهیم پایه‌ای روش‌های الایزا و رادیوایمنواسی به سال ۱۹۴۱ برمی‌گردد [۱] و قبل از تکامل روش الایزا، اولین روش مورد استفاده در سنجش ایمنی روش رادیوایمنواسی[۱۰] بود که از مواد رادیواکتیو متصل به آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی به‌عنوان سیگنالی برای تشخیص حضور آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن در نمونه استفاده می‌شد. آزمایش‌های ایمنواسی، پایه اصلی آزمایش‌هایی هستند که در مطالعه بیماری‌های عفونی و غددشناسی بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین، برای تشخیص عوامل بیماری، اپیدمیولوژی بیماری و اندازه‌گیری مقدار هورمون‌ها در سطح فیزیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. آزمون الایزا در علوم مختلف زیست‌شناسی جانوری، گیاهی، ویروس‌شناسی، باکتری‌شناسی، انگل‌شناسی و سایر علوم مرتبط کاربرد دارد. روش رادیو ایمنواسی (RIA) اولین بار در سال ۱۹۶۰توسط یالو[۱۱] و برسون[۱۲] برای اندازه‌گیری انسولین پلاسما ارائه شد. در آغاز بکارگیری روش RIA، از ماده رادیواکتیو ید ۱۳۱ برای نشان‌دار کردن آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن استفاده می‌شد و سپس ترکیب کم خطرتر ید ۱۲۵ برای این منظور مورد استفاده قرار گرفت. اما خطرناک بودن مواد رادیواکتیو و همچنین معضل دفع پسماند حاصل از این مواد، موجب شد روش‌های دیگری مانند ایمنواسی آنزیمی[۱۳] برای نشان‌دار کردن آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن توسعه یافتند [۲].

کشف روش مبتنی بر آنزیم – سوبسترا موجب ایجاد جهشی در روش ایمنواسی شد که اندازه‌گیری بر پایه تغییرات رنگی قابل انجام بود و مخاطرات مواد رادیواکتیو را نداشت. روش مبتنی بر آنزیم - سوبسترا در سال ۱۹۶۹ توسط آورامز[۱۴] معرفی شد که در واقع آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن (حسب روش طراحی آزمون) با آنزیم نشان‌دار می‌شدند. مفهوم روش الایزا در سال ۱۹۷۱ در دانشگاه استکهلم در سوئد توسط انگوال[۱۵] و پرلمان[۱۶] و همچنین ویمن[۱۷] و شوورس[۱۸] در هلند به‌صورت مستقل از یکدیگر در مقالاتی بیان شد و اولین آزمایش نشان‌دار شده با آنزیم به‌صورت مرحله به مرحله توصیف شد [۳].

انگوال و پرلمان اندازه‌گیری کمی مقدار[۱۹] در سرم خرگوش را با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز به‌عنوان آنزیم نشانگر در مقاله خود ارائه دادند. در حالی که ویمن و شوورس با استفاده از آنزیم هورسرادیش پراکسیداز[۲۰] غلظت هورمون گنادوتروپین کوریونی را در ادرار انسان مورد سنجش قرار دادند [۴].

آزمون‌های برپایه ایمنی به‌طور معمول از حساسیت بالایی برخوردار هستند و به‌منظور شناسایی و کمی‌سازی ترکیبات مختلفی شامل آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌ها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، هورمون‌ها و غیره به کار می‌روند [۱]. بر این اساس، امروزه این روش در زمینه‌های مختلفی کاربرد دارد و به‌عنوان یکی از روش‌های معمول مورد استفاده در آزمایشگاه‌های خدمات تخصصی آزمون، تشخیص طبی و تحقیقاتی است [۱].

## متدولوژی

اساس کار الایزا، استفاده از یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن متصل شده با یک آنزیم است. این آنزیم بعد از واکنش با سوبسترای، خود محصول رنگی تولید می‌کند و تغییر رنگ با استفاده از اسپکتروفوتومتر[۲۱] مخصوص سنجیده شده و در نتیجه با توجه به شدت رنگ و میزان جذب، مقدار ماده مورد سنجش تعیین می‌شود. البته حسب طراحی نوع آزمون الایزا، تثبیت آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی اختصاصی آنالیت مورد بررسی در فاز جامد، لازمه انجام آزمون است. آنتی‌ژن می‌تواند یک مولکول زیستی یا شیمیایی باشد ولی آنتی‌بادی پروتئینی است که تنها توسط سیستم ایمنی موجودات پروکاریوت یا پرسلولی برعلیه انواعی از آنتی‌ژن‌ها تولید می‌شود. این پروتئین دارای ناحیه خاصی است که قابلیت اتصال به آنتی‌ژن را داراست. آنتی‌بادی اختصاصی توانایی اتصال با آنتی‌ژن مخصوص خود را دارد و کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی را ایجاد می‌کند. تشکیل این کمپلکس اساس سنجش بر پایه ایمنی در روش الایزا است [۱ و ۵].

انجام یک آزمون الایزا در ساده‌ترین شکل طراحی، شامل (۴) مرحله کلی است:

**۱. پوشش‌دهی**[۲۲]: جذب آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر در یک فاز جامد[۲۳] فرآیند پوشش‌دهی نامیده می‌شود. فاز جامد شامل میکروتیترپلیت‌هایی از جنس پلی‌استایرن، پلی‌وینیل و پلی‌پروپیلن هستند که جنس پلی‌استایرن به دلیل شفافیت زیاد چاهک‌ها، ویژگی آب دوستی نسبی برای جذب پروتئین و همچنین قیمت مناسب، بیشتر از سایر میکروتیترپلیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. میکروتیترپلیت‌ها به‌طور معمول دارای چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای هستند. تعداد چاهک‌های بالا باعث افزایش آنالیز تعداد زیادی نمونه به‌طور هم‌زمان می‌شود. میکروتیترپلیت مورد استفاده باید توانایی جذب آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را داشته باشد [۲ و ۵].

**۲.مسدود کردن**[۲۴]: پس از پوشش‌دهی، هنوز بخش‌هایی از چاهک خالی می‌ماند که می‌تواند محل مناسبی برای اتصال آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن ثانویه و ایجاد نتایج مثبت کاذب باشد. به‌منظور افزایش ویژگی انتخابی و جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی، مرحله مسدودسازی بعد از پوشش‌دهی در مرحله اول ضروری است. لذا باید با استفاده از یک بافر مسدودکننده این مرحله انجام شود. پروتئین‌های مسدود کننده باید یک پروتئین خنثی باشند که به‌طور معمول از آلبومین سرم گاوی[۲۵]، سرم گوساله تازه متولد شده[۲۶]، کازئین، شیرخشک بدون چربی و یا ژلاتین ماهی استفاده می‌شود. این پروتئین‌ها به منافذ خالی سطح جامد که توسط مولکول‌های آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی پوشیده نشده‌اند، اتصال می‌یابد و مانع از اتصال غیراختصاصی سایر مواد در مراحل بعدی الایزا می‌شوند [۲].

**۳. تشخیص**[۲۷]: بعد از مرحله مسدودسازی، انکوباسیون با استفاده از آنتی‌بادی نشان‌دار با آنزیم صورت می‌گیرد که به شکل اختصاصی به آنتی‌ژن هدف خود که در کف چاهک پوشش‌دهی شده‌است، متصل می‌شود. شناسایی در الایزا بعد از اضافه کردن ماده واکنش دهنده با آنزیم قابل انجام است. آنزیم‌های مختلفی در الایزا مورد استفاده قرار می‌گیرند که شامل بتاگالاکتوزیداز[۲۸]، گلوکز اکسیداز[۲۹]، پراکسیداز[۳۰] و آلکالین فسفاتاز[۳۱] هستند. آلکالین فسفاتاز با سوبسترای p- نیترو- فنیل فسفات تولید رنگ زرد می‌کند که در واکنش‌های مثبت الایزا قابل اندازه‌گیری است. سوبسترای مناسب برای آنزیم پراکسیداز آمینوسالسیلیک اسید و ارتوفنیلن دی آمین است که در واکنش مثبت، رنگ قهوه‌ای تولید می‌کند. مدت زمان لازم برای تولید رنگ بین ۳۰ تا ۶۰ دقیقه است. واکنش آنزیم با سوبسترا باید به‌طور همزمان در تمامی چاهک‌ها متوقف شود که این فرآیند با استفاده از محلول‌های متوقف کننده مانند هیدروکسید سدیم (NaOH)، اسید هیدروکلریک (HCl) و یا اسید سولفوریک ($H_2SO_4$) انجام می‌شود [۱].

**۴. خوانش نتایج:** سوبسترا بعد از افزودن به محیط واکنش توسط آنزیم هیدرولیز می‌شود. سوبسترا ترکیبی کروموژنیک یا فلوروژنیک است که پس از هیدرولیز به ترتیب سیگنالی رنگی و یا فلئورسنت ایجاد می‌نماید که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مخصوص با طول موج بین ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

در مراحل ۱ تا ۳ پس از اتمام هر مرحله، انکوباسیون ضروری است و می‌تواند به‌صورت ساکن و یا لرزشی انجام شود. در طول مدت انکوباسیون به ویژه در حالت لرزشی واکنش‌پذیری به‌صورت کامل انجام می‌شود. پس از انکوباسیون مراحل ۱، ۲ و ۳ به‌منظور خارج کردن به ترتیب آنتی‌ژن، پروتئین و آنتی‌بادی نشان‌دار آزاد از محیط واکنش، شستشو انجام می‌شود. این فرآیند برای هر چاهک حداقل سه مرتبه تکرار می‌شود. محلول مورد استفاده معمولا محلول بافرفسفات سالین[۳۲] است که بیشتر حاوی یک دترجنت مثل توئین ۲۰ است [۶].

## انواع الایزا

سیستم الایزا براساس متدولوژی چگونگی اتصال و شناسایی آنتی‌ژن به چند دسته تقسیم می‌شود که عبارتند از:

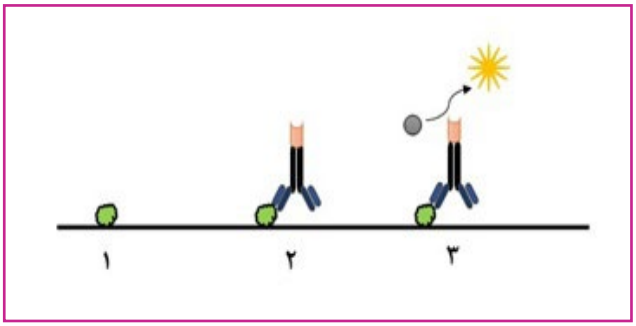
- الایزای مستقیم[۳۳]
- الایزای غیرمستقیم[۳۴]
- الایزای ساندویچ[۳۵]
- الایزای رقابتی یا مهاری[۳۶]

### الایزای مستقیم:

ساده‌ترین روش الایزا، روش مستقیم است. در این روش از یک آنتی‌بادی اختصاصی نشان‌دار شده با آنزیم به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه استفاده می‌شود (شکل (۱)). مراحل انجام روش مستقیم به شرح زیر است:

- پوشش‌دهی؛
- مسدود کردن؛
- افزودن آنتی‌بادی اختصاصی کنژوگه با آنزیم به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه؛
- افزودن سوبسترا و خوانش نتایج.

اگرچه مراحل این روش کمتر است و به دلیل وجود تنها یک آنتی‌بادی، واکنش متقاطع با آنتی‌بادی ثانویه وجود ندارد، اما معایبی دارد که سبب محدودیت استفاده از آن شده‌است. نشان‌دار کردن آنتی‌بادی اولیه با آنزیم علاوه‌بر اینکه فرآیندی زمان‌بر و پر هزینه است و تولید آنتی‌بادی برای آنتی‌ژن‌های مختلف را با محدودیت مواجه می‌کند، می‌تواند بر قدرت اتصال آن به آنتی‌ژن تاثیر منفی داشته باشد. همچنین در این روش، شدت سیگنال تولید شده کمتر از سایر روش‌هاست. لذا این روش فاقد ارزش تشخیصی است و صرفا در حوزه تحقیقات کاربرد دارد [۷]. به‌منظور رفع معایب روش مستقیم در سایر روش‌ها از آنتی‌بادی ثانویه استفاده شده‌است. آنتی‌بادی ثانویه غیر اختصاصی بوده و زنجیره ثابت آنتی‌بادی اولیه را شناسایی می‌کند. از آنجایی که آنتی‌بادی‌ها شامل ۵ کلاس هستند، تنوع آنتی‌بادی‌های ثانویه محدود و مشخص است. بنابراین، می‌توان آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم را در حجم بالا تولید و برای طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌های اختصاصی اولیه به کار برد.



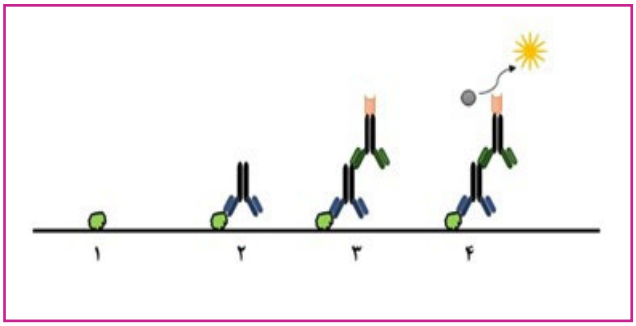

شکل (۱): روش الایزای مستقیم. (۱): تثبیت آنتی‌ژن (۲): افزودن آنتی‌بادی اولیه نشان‌دار با آنزیم (۳): افزودن سوبسترا و دریافت سیگنال.

## الایزای غیرمستقیم:

در روش غیرمستقیم، آنتی‌ژن طی دو مرحله شناسایی می‌شود. ابتدا آنتی‌ژن توسط آنتی‌بادی اختصاصی اولیه شناسایی شده و سپس آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم، آنتی‌بادی اولیه را مورد شناسایی قرار می‌دهد (شکل (۲)). مراحل انجام روش غیرمستقیم به شرح زیر است:

- پوشش‌دهی؛
- مسدود کردن؛
- افزودن آنتی‌بادی اختصاصی اولیه؛
- افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم؛
- افزودن سوبسترا و خوانش نتایج.

روش غیرمستقیم مزایای متعددی دارد. آنتی‌بادی‌های ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم، به سهولت به‌صورت تجاری در دسترس هستند و می‌توان برای شناسایی طیف وسیعی از آنتی‌بادی‌های اولیه از یک نوع آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم استفاده نمود. بنابراین، روش غیرمستقیم از انعطاف‌پذیری بالایی برخوردار است. از طرفی با اتصال اپی‌توپ‌های مختلف آنتی‌بادی اولیه به آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده، سیگنال تقویت شده و حساسیت روش افزایش می‌یابد. همچنین آنتی‌بادی اولیه نشان‌دار نشده و حداکثر واکنش ایمنی آنتی‌بادی اولیه حفظ می‌شود. البته از معایب این روش می‌توان به ایجاد واکنش متقابل در اثر حضور آنتی‌بادی ثانویه اشاره کرد که در برخی موارد منجر به ایجاد سیگنال غیراختصاصی می‌شود [۷].



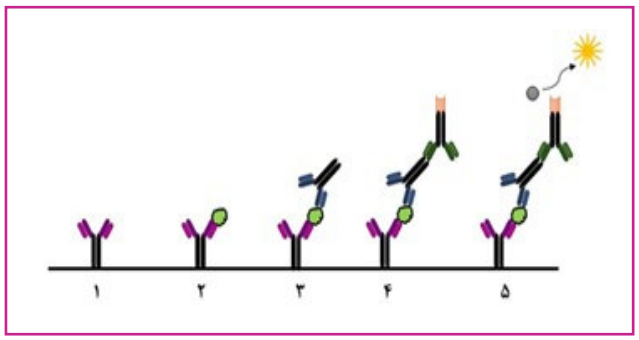

شکل (۲): روش الایزای غیرمستقیم. (۱): تثبیت آنتی‌ژن، (۲): افزودن آنتی‌بادی اولیه، (۳): افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم، (۴): افزودن سوبسترا و دریافت سیگنال.

## الایزای ساندویچ:

اگرچه روش غیرمستقیم محبوبیت زیادی دارد اما یکی از محدودیت‌های آن، غیر اختصاصی بودن فرآیند تثبیت آنتی‌ژن است. به ویژه هنگام استفاده از سرم به‌عنوان نمونه آنتی‌ژنی که همه پروتئین‌های موجود در سرم امکان اتصال به چاهک را دارند. اگر چاهک قبلا با آنتی‌بادی مشخصی که پذیرنده آنتی‌ژن مورد نظر باشد، پوشیده شود این محدودیت برطرف می‌شود مانند آنچه در روش ساندویچ انجام می‌گیرد [۸]. مراحل انجام روش ساندویچ به شرح زیر است (شکل (۳)):

- تیمار چاهک با آنتی‌بادی پذیرنده آنتی‌ژن؛
- مسدود کردن؛
- افزودن نمونه و اتصال آنتی‌ژن مورد نظر به آنتی‌بادی پذیرنده؛
- افزودن آنتی‌بادی اولیه و اتصال به آنتی‌ژن مورد نظر؛
- افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم و اتصال به آنتی‌بادی اولیه؛
- افزودن سوبسترا و خوانش نتایج.

همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، آنتی‌ژن مورد نظر بین دو لایه آنتی‌بادی قرار می‌گیرد. از این‌رو، به این روش، ساندویچ گفته می‌شود. مزیت استفاده از آنتی‌بادی پذیرنده بالا، بردن اختصاصیت و حساسیت روش است چراکه آنتی‌ژن مورد نظر را از میان سایر آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های موجود در نمونه به دام انداخته و سنجش می‌کند.

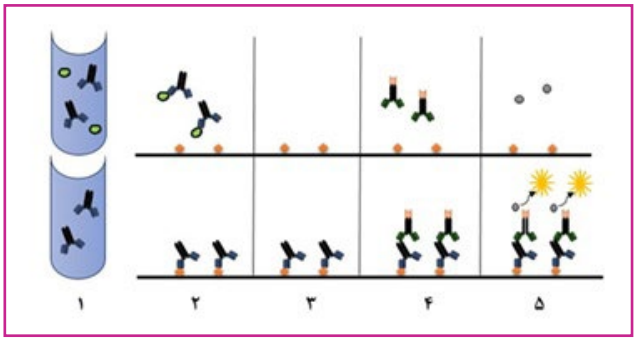



شکل (۳): روش الایزای ساندویچ. (۱): تثبیت آنتی‌بادی پذیرنده، (۲): افزودن آنتی ژن، (۳): افزودن آنتی‌بادی اولیه، (۴): افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم، (۵): افزودن سوبسترا و دریافت سیگنال.

## الایزای روش رقابتی - مهاری:

روش رقابتی یا مهاری به‌منظور شناسایی آنتی‌ژن‌هایی با مقدار کم که قادر به تولید سیگنال‌های قوی نیستند توسعه یافته است. در روش رقابتی یا مهاری همان‌گونه که از نامش پیداست، دو آنتی‌ژن برای اتصال به یک آنتی‌بادی اولیه با هم رقابت می‌کنند. بدین ترتیب که آنتی‌ژن مورد نظر با آنتی‌بادی اولیه مجاورت داده می‌شود تا به آن متصل شوند. بسته به مقدار آنتی‌ژن در محیط، تعدادی از آنتی‌بادی‌ها متصل شده و بقیه به شکل آزاد باقی می‌مانند. حال این نمونه وارد چاهک پوشیده از آنتی‌ژن دوم شده و آنتی‌بادی‌های آزاد به این آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شوند. با شستشوی چاهک، آنتی‌بادی‌های متصل به آنتی‌ژن مورد نظر از محیط واکنش خارج شده و آنچه باقی می‌ماند آنتی‌بادی‌های متصل به آنتی‌ژن‌های چاهک است. با افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم و سپس سوبسترا، سیگنال تولید می‌شود. شدت سیگنال تولید شده نشان‌دهنده مقدار آنتی‌ژن رقیب آنتی‌ژن مورد نظر است. لذا با مقدار آنتی‌ژن مورد نظر نسبت عکس دارد. مراحل روش رقابتی به شرح زیر است [۵]:

• مجاورت آنتی‌بادی اولیه با نمونه حاوی آنتی‌ژن مورد نظر؛
• افزودن محلول حاصل به چاهک پوشیده از آنتی‌ژن رقیب؛
• افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم و اتصال به آنتی‌بادی اولیه؛
• افزودن سوبسترا و خوانش نتایج.




شکل (۴): روش الایزای رقابتی. (۱): مجاورت آنتی‌بادی اولیه با نمونه، (۲): افزودن مخلوط به چاهک حاوی آنتی‌ژن مهاری، (۳): شستشو، (۴): افزودن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با آنزیم، (۵): افزودن سوبسترا و دریافت سیگنال.

درصورت حضور آنتی‌ژن در محیط (بالا) سیگنالی دریافت نمی‌شود.

## کاربردهای الایزا

روش الایزا کاربردهای گسترده‌ای دارد که از جمله آنها صنعت غذا، تولید واکسن، ایمونولوژی، تشخیص، سم‌شناسی، ردیابی دارو، صنعت داروسازی و پیوند که در ادامه بعضی از این کاربردها توضیح داده می‌شود.

### صنعت غذا

الایزا نقش عمده‌ای در صنایع غذایی دارد و بستر اصلی برای شناسایی مواد حساسیت‌زای غذایی موجود در شیر، بادام‌زمینی، گردو و تخم‌مرغ را فراهم می‌کند [۹]. پنگ[۳۷] و همکاران، الایزای ساندویچ مبتنی بر آنتی‌بادی مونوکلونال را برای تشخیص اوالبومین در غذا استفاده کردند که بیشترین علت حساسیت غذایی به ویژه در کودکان است. برای تایید اصالت محصولات غذایی می‌توان از الایزا استفاده کرد. این روش کمک زیادی به جلوگیری از ضررهای اقتصادی ناشی از تقلبات غذایی می‌کند [۱۰]. در مورد گوشت و محصولات مبتنی بر گوشت، روش الایزا، روشی قابل اعتماد است که کنترل دقیق بر محصول را فراهم می‌کند، به ویژه هنگامی که جنبه‌های مذهبی در انتخاب مواد غذایی مهم باشد. بعلاوه الایزا یک روش مهم در کنترل کیفیت ماهی، شیر و محصولات مشتق از آن، غذاهای اصلاح شده ژنتیکی، غذاهای اشعه یافته یا سایر اجزای مضر غذایی که می‌توانند به انسان منتقل شوند، است؛ پروتئین‌های غیرگوشتی مانند سویا ارزش تغذیه‌ای بالایی دارند، با این وجود به دلیل شباهت به محصول اصلی به ندرت به محصولات گوشتی اضافه می‌شوند. نظارت دقیق بر محصولات با استفاده از روش الایزا می‌تواند از چنین تقلباتی جلوگیری کند [۱۰]. تولید کیت‌های الایزا برای کاربردهای صنایع غذایی چالش برانگیز است، زیرا انتخاب دقیق نمونه‌های کنترل و استاندارد برای کالیبراسیون دقیق آزمون لازم است. علاوه‌بر این، الایزا می‌تواند چندین نوع آنالیت را در نمونه غذایی هدف قرار دهد؛ بنابراین، تولیدکنندگان باید یک مجموعه کامل از اجزای کیت را برای مولکول‌های زیستی هدف فراهم کنند [۱۱].

پارک[۳۸] و همکاران روش الایزا را برای تشخیص سه جنس مختلف کپک که با تولید مایکوتوکسین در مواد غذایی سبب کاهش کیفیت مواد غذایی می‌شوند، استفاده نمودند [۱۲].

برای شناسایی E. coli O157: H7 در غذا، روش‌های برپایه کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۳۹] به‌عنوان روش‌های استاندارد استفاده می‌شوند. روش‌های بر پایه کشت نتایج صحیحی را می‌دهد درحالی که PCR حساسیت و اختصاصیت بالایی دارد. با این وجود به دلیل روش‌های پیش غنی‌سازی، هر دو روش زمان‌بر و نیاز به شرایط آزمایشگاهی برای جلوگیری از آلودگی دارد. پانگ[۴۰] و همکاران در سال ۲۰۱۷ روش الایزا مبتنی بر کاغذ را برای شناسایی E. coli O157: H7 استفاده کردند. این روش کم‌هزینه، سریع، اختصاصی و حساس بوده و نتایج با چشم غیرمسلح قابل بررسی است [۱۳].

### تولید واکسن

الایزا به‌عنوان یک کاندید عالی در تولید واکسن عمل می‌کند. نمونه سرم از مدل حیوانی یا انسانی ایمن شده می‌تواند برای تشخیص حضور آنتی‌بادی در برابر انواع خاصی از آنتی‌ژن‌های تزریق شده به میزبان با روش الایزا آزمایش شود [۱۲]. به‌طور معمول آنتی‌ژن‌های مختلفی برای تولید واکنش‌های ایمنی در میزبان استفاده می‌شود. در این میان مواردی که پاسخ محافظتی بالاتر و اثرات جانبی کمتری را نشان دهند، انتخاب می‌شوند. چالش اصلی در استفاده از الایزا در تولید واکسن، انتخاب مناسب کنترل‌های مثبت و منفی است. در مرحله آزمایشی تولید واکسن و هنگام برخورد با نمونه‌های ناشناخته، تحلیل صحیح در این زمینه دشوار است [۱۳]. با این وجود، الایزا به‌عنوان یک روش منحصر بفرد در تشخیص پاسخ‌های ایمنی تولید شده، تایید شده‌است و به‌طور گسترده‌ای برای آزمایش‌های واکسن در سراسر جهان استفاده می‌شود [۱۴ و ۱۵].

### ایمونولوژی

سیستم ایمنی بدن می‌تواند به‌صورت سلولی یا هومورال[۴۱] (ذاتی یا اکتسابی) عمل کند [۱۶]. اندازه‌گیری و کنترل تغییرات پاسخ ایمنی زیربنای تشخیص بیماری‌های ایمنی است. مطالعات مختلف الایزا را به‌عنوان یک روش استاندارد سریع و مقرون به صرفه در این اندازه‌گیری‌ها نشان داده‌اند

[۱۷]. مطالعات زیادی در مورد کاربرد الایزا در ایمونولوژی گزارش شده‌است که بعضی از آنها روی بهینه‌سازی بیشتر پروتکل الایزا، اعتبارسنجی، حساسیت و اختصاصیت آن در آزمایش‌های بالینی تمرکز کرده‌اند [۱۸]. در این بخش، برخی از این نمونه‌ها را شرح می‌دهیم.

■ **خودایمنی:** عفونت‌های متعدد، عوامل محیطی و نقص سیستم ایمنی بدن سبب پاسخ‌های خود ایمنی از طریق فعال‌سازی کنترل نشده سیستم ایمنی می‌شود [۱۸]. بدن در پاسخ به انواع مختلف عوامل بیماری‌زای خارجی آنتی‌بادی تولید می‌کند.

این عوامل بیماری‌زای خارجی می‌توانند ذرات یا اپی‌توپ باشند که به سلول‌ها نفوذ می‌کنند اما بعداً بخشی از ساختار سلول‌ها می‌شوند. در چنین شرایطی آنتی‌بادی‌ها در برابر سلول‌های خودی واکنش نشان می‌دهند و منجر به فنوتیپ نقص ایمنی می‌شوند.

پولمونری آلوئولار پروتیینوزیس[۴۲] مثالی از یک بیماری خود ایمنی است که با تجمع سورفاکتانت در سیستم آلوئول مشخص می‌شود. در این بیماری آنتی‌بادی‌های خودی در برابر عامل تحریک کلنی گرانولوسیت/ ماکروفاژ[۴۳] تولید می‌شوند. وقتی یک پاتوژن وارد سیستم تنفسی می‌شود، GM-CSF برای تنظیم عفونت لازم است [۱۹]. برای مطالعه PAP، آنالیز رادیولوژی و سیتولوژی می‌تواند مناسب باشد، علاوه بر این، الایزا می‌تواند به پزشکان در شناسایی آستانه‌های مرتبط با خطر در این بیماری کمک کند.

پمفیگوئید تاولی[۴۴] یک بیماری حاد پوستی، نمونه دیگری از بیماری خودایمنی است که میزان مرگ و میر بالایی دارد. به‌طور معمول این بیماری از طریق ویژگی‌های بالینی و آنالیز بافت‌شناسی تشخیص داده می‌شود. با این حال، الایزا حساسیت و اختصاصیت بالایی را در شناسایی آنتی‌بادی‌های خودی در برابر اپی‌توپ مربوط به این بیماری نشان می‌دهد [۲۰].

ویروس ایدز نیز توسط سیستم‌های تحلیلی بر پایه الایزا مطالعه شده‌است. بیماران مبتلا به ایدز، بیشتر در معرض خطر ابتلا به انواع عفونت‌ها هستند. آزمایش الایزا نشان می‌دهد که پاسخ کم آنتی‌بادی ایمونوگلوبولین G، ممکن است نقص اصلی در این نوع بیماری باشد [۲۱]. تعدادی از آزمایش‌های مبتنی بر الایزا برای شناسایی ایدز به بازار عرضه شده‌اند که در دسترس برای کاربران نهایی در کلینیک‌ها و بیمارستان‌ها قرار گرفته‌اند.

■ **ایمنی هومورال:** الایزا پتانسیل بالایی در مطالعه پاسخ ایمنی هومورال در انواع مختلفی از عفونت‌ها نشان می‌دهد. پاسخ ایمنی هومورال شامل آنتی‌بادی و سایر اجزایی است که در مایعات بدن وجود دارد. کنترل و اندازه‌گیری این اجزا بسیار اهمیت دارد [۲۲].

به‌عنوان مثال، جذام یک عفونت قابل درمان است و یک بیماری عمده در کشورهای در حال توسعه شناخته می‌شود [۲۳]. الایزا به‌طور گسترده‌ای برای پیش‌بینی پیشرفت این بیماری در افراد آلوده استفاده شده‌است. سیستم‌های مبتنی بر الایزا و نوارهای تست برای تشخیص این امر بخصوص در مناطقی با دسترسی محدود به آزمایشگاه‌های متمرکز استفاده می‌شود. الایزا همچنین برای تشخیص آنتی‌بادی‌های پلاسماتیک علیه پپتیدهای آنتی‌ژنیک رتروویروس داخلی انسانی[۴۵] همراه با علت مولتیپل اسکلروزیس استفاده شده‌است [۲۴].کنترل دقیق مارکرهای زیستی ایمنی مرتبط با HERV از اهمیت بسزایی برای آنالیز پیشرفت بیماری بخصوص در طی درمان با اینترفرون بتا برخوردار است [۲۴].

## ■ تشخیص

در این زمینه، الایزا ثابت کرده است که می‌تواند روشی کاربردی در سراسر جهان برای تشخیص انواع بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد. تعدادی از کیت‌های تجاری الایزا برای شناسایی ایدز [۲۵]، آنفلوانزا [۲۶]، تب دانگ [۲۷-۳۰]، ابولا [۳۱]، بیماری چاگاس[۱۱ و ۳۲]. لیشمانیوز [۳۳]، بیماری لایم [۳۴]، ویروس نیل غربی [۳۵] در بازار موجود است. حتی در زمینه پاتولوژی گیاهان، روش الایزا توجه زیادی را به خود جلب می‌کند [۳۶]. در این بخش، خلاصه‌ای از کاربردهای تشخیصی الایزا آورده شده‌است.

■ **تشخیص بارداری:** تعدادی از مولکول‌های زیستی مختلف از جمله گنادوتروپین جفتی انسان[۴۶]، هورمون لوتئینه کننده[۴۷]، هورمون محرک فولیکول[۴۸]، استریول[۴۹] و هورمون تحریک کننده تیروتروپین[۵۰] می‌توانند به دلیل بارداری تولید شوند [۳۷]. الایزا می‌تواند برخی از این پروتئین‌ها را از خون مادر، بزاق یا ادرار در مراحل اولیه بارداری تشخیص دهد [۳۸]. HCG یکی از هورمون‌های رایج است که می‌تواند در اولین ماه پس از لقاح با روش الایزا تشخیص داده شود. مولکول زیستی دیگر مرتبط با بارداری، استریول است که در بزاق در هفته ۶ بارداری با روش الایزا قابل تشخیص است. آزمایش‌های اختصاصی بارداری با الایزا برای حیوانات نیز انجام شده‌است [۳۹] الایزا همچنین می‌تواند به‌عنوان یک روش قابل اطمینان برای اندازه‌گیری عفونت‌های مادرزادی مانند ایدز یا توکسوپلاسموز در دوران بارداری استفاده شود [۴۰ و ۴۱].

برای به حداکثر رساندن حساسیت و دقت تشخیص برای شناسایی بارداری در مراحل اولیه، پنل‌های نشانگر بر پایه الایزا ساخته شده‌اند که قادر به کنترل و اندازه‌گیری چندین نشانگر به‌صورت هم‌زمان در نمونه هستند [۴۲].

■ **تشخیص سرطان:** تشخیص بسیار دقیق سرطان در مراحل اولیه برای بقای بیمار حیاتی است. با این حال، نشانگرهای زیستی سرطان، بیشترین مولکول‌های زیستی

به‌عنوان آنالیت هدف هستند. پیشرفت روش الایزا در آشکارسازی نشانگرهای زیستی سرطان بسیار موفق بوده است. ژو و همکارانش، لایه‌های نانوذره طلا را در الایزا برای تقویت سیگنال تشخیص و کاهش حد آشکارسازی[۵۱] استفاده کردند. در این روش، پلاسمای اسپایک شده با آنتی‌ژن کارسینوآمبریونیک[۵۲] به‌عنوان نشانگر زیستی نمایشگر، ثابت کرد که الایزای ساندویچی مبتنی بر این نانوذرات ساده و مقرون به صرفه در آزمایش‌های بالینی است [۴۳]. گاهی به سختی می‌توان نمونه‌های آزمایش را به‌دست آورد. بنابراین، حتی حجم کم نمونه بسیار ارزشمند است. به‌عنوان مثال، در مورد سرطان تخمدان، گلیکوپروتئین CA۱۲۵ موجود در سرم، مارکر مناسبی برای تشخیص به موقع است [۴۴]. شولر و همکاران آزمایشی مقرون به صرفه مبتنی بر الایزا برای تشخیص CA۱۲۵ گسترش دادند که تنها به چند میکرولیتر سرم نیاز دارد [۴۴].

■ **تشخیص بیماری‌های عفونی:** حتی تا به امروز، سرولوژی عفونی مبتنی بر الایزا یکی از روش‌های معتبر در زمینه تشخیص و پیش‌بینی است. الایزا در سه گروه بیماری‌های عفونی، توان تشخیصی بالایی را ارائه داده است [۱۲].

- بیماری‌های مقاربتی[۵۳]؛
- بیماری‌های منطقه‌ای یا بومی، که بیشتر به آنها بیماری‌های گرمسیری گفته می‌شود؛
- توکسوپلاسما؛

## ■ سم‌شناسی

سم‌شناسی شامل مطالعه اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی روی موجودات زنده است. این قسمت تشخیص و بهبود اثرات سموم (عوامل آنتی‌ژنی با منشا گیاهی یا حیوانی) و همچنین مواد سمی (مواد سمی آزاد شده به محیط) را پوشش می‌دهد. ارتباط بین دوز ماده سمی و اثرات آن روی ارگانیسم در معرض، مسیرهای در معرض قرارگیری، منشا مواد سمی و تعیین ویژگی اندام‌های تحت تاثیر قرار گرفته، اهداف اصلی در مطالعات سم‌شناسی است. در ادامه تعداد کمی از این مثال‌ها ذکر شده‌است.

الایزای رقابتی سابقه طولانی در تشخیص آفلاتوکسین دارد. آفلاتوکسین B۱ یکی از سموم شناخته شده برنج است. آزمایش‌های ایمنی برای کنترل آفلاتوکسین اختصاصی، حساس و در عین حال سریع و ساده است [۴۵].

در مطالعه دیگری، از روش الایزا مستقیم Bio-Quant برای غربالگری منظم داروهایی مانند آمفتامین و متامفتامین در مایعات زیستی استفاده شد [۴۶] برای آنالیز واکنش متقابل ترکیبات، غلظت‌های از پیش تعیین شده موادی مانند آمفتامین و آمین‌های فاسد اندازه‌گیری شدند. داده‌های به‌دست آمده نشان داد که روش الایزا مستقیم Bio-Quant سریع و قابل اعتماد برای غربالگری احتمالی آمفتامین و متامفتامین در نمونه‌های پزشکی قانونی است [۴۷].

## ■ لیست خدمات تخصصی آزمون بر پایه روش الایزا ثبت شده در شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی

خدمات آزمایشگاهی که با روش الایزا توسط آزمایشگاه‌های ارائه دهنده خدمات تخصصی آزمون انجام می‌شود بسیار متنوع است. شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، به‌عنوان پلتفرم به اشتراک‌گذاری دستگاه‌ها و ارایه خدمات آزمایشگاهی کشور، تاکنون ۲۰ عنوان خدمت و آزمون مرتبط با روش الایزا را به شرح ذیل به ثبت رسانیده است:

- آزمون اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر و فرآورده‌های آن با خوانش‌گر الایزا[۵۴]؛
- آزمون اندازه‌گیری حداکثر اکسیژن مصرفی[۵۵] با خوانش‌گر الایزا؛
- آزمون اندازه‌گیری سموم قارچی آفلاتوکسین به روش الایزا؛
- آزمون اندازه‌گیری پروتئین (کل) در زیستی با خوانش‌گر الایزا (میکروپلیت)؛
- آزمون بررسی میزان آنتی‌اکسیدان انواع نمونه‌های زیستی (سلول، بافت و غیره) با خوانش‌گر الایزا؛
- آزمون بررسی میزان استرس اکسیداتیو انواع نمونه‌های زیستی (سلول، بافت، تخمدان، بیضه، اسپرم، تخمک، جنین و غیره) با خوانش‌گر الایزا؛
- آزمون بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید[۵۶] با خوانش‌گر الایزا؛
- آزمون تشخیص بیماری یون در گاوها به روش الایزا؛
- آزمون شناسایی مایکوتوکسین‌ها در شیر و فرآورده‌های آن با خوانش‌گر الایزا؛
- آنالیز اندازه‌گیری مایکوتوکسین (آفلاتوکسین، اکراتوکسین، زیرالنون، داکسی نیوالنول و غیره) به روش الایزا؛
- آنالیز اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها در مواد خوراکی و خوراک دام، طیور و آبزیان به روش الایزا؛
- آنالیز سنجش فعالیت کاتالاز[۵۷] در نمونه‌های زیستی با خوانش‌گر الایزا؛
- آنالیز شناسایی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن‌ها با خوانش‌گر الایزا؛
- آنالیز شناسایی آنتی‌ژن‌ها با خوانش‌گر الایزا؛
- آنالیز شناسایی انواع آنتی‌بادی‌ها با خوانش‌گر الایزا؛
- آنالیز متابولیت‌ها با خوانش‌گر الایزا؛
- آنالیز هورمون‌ها با خوانش‌گر الایزا؛
- آزمون التهاب برای بررسی بازسازی اپیدرم انسانی با روش اندازه‌گیری IL-1 α بر پایه سنجش ایمنی با روش الایزا؛
- خدمات آنالیز خوانش‌گر الایزا (میکروپلیت ریدر، میکروفتومتریک پلیت ریدر، الایزا ریدر)؛
- خدمات شستشوی الایزا.

## پی‌نوشت

۱. دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، پارک علم و فناوری یزد(شرکت آراپژوهان امین یزد)
۲. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول
۳. دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی مشهد، آزمایشگاه بیوتکنولوژی
۴. دکترای تخصصی نانوفناوری پزشکی، مرکز تحقیقات ریزفناوری زیستی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا
۵. عضو کارگروه زیست‌فناوری

6. ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay)
7. immobilize
8. substrate
9. optical density(OD)
10. radioimmunoassay (RIA)
11. Yalow
12. Berson
13.Enzyme Immunoassay (EIA)
14. Avrameas
15. Engval
16. Perlmann
17. weemen
18. Schuurs
19. Immunoglobulin G (IgG)
20. Horseradish peroxidase (HRP)
21. Spectrophotometer
22. Coating
23. Solid phase
24. Blocking
25. Bovine serum albumin (BSA)
26. Newborn calf serum (NBCS)
27. Detection(or Probing)
28. Beta galactosidase
29. Glucose oxidase
30. Peroxidase
31. Alkaline phosphatase
32. Phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween-20. (PBSt)
33. Direct ELISA
34. Indirect ELISA
35. Sandwich ELISA
36. Competitive ELISA
37. Peng
38. Park
39. Polymerase Chain Reaction (PCR)
40. Pang
41. Homoral
42. Pulmonary alveolar proteinosis (PAP)
43. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)
44. Bullous pemphigoid
45. Human endogenous retroviruses (HERV)
46. Human Chorionic Gonadotropin (hCG)
47. Luteinizing Hormone (LH)
48. Follicle-stimulating hormone (FSH)
49. Estriol (E3)
50. Thyroid-stimulating hormone (TSH)
51. Limit of detection (LOD)
52. Carcinoembryonic Antigen (CEA)
53. Sexual Transmitted Disease (StDs)
54. ELISA reader
55. VO2 max(Maximal oxygen consumption)
56. Malondialdehyde (MDA)
57. Catalase (CAT)

## مراجع


[1] R1. Aydin, S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 2015. 72: p. 4-15.

[2] Hosseini, S., et al., Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z 2018.

[3] Shah, K. and P. Maghsoudlou, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. Br J Hosp Med (Lond), 2016. 77(7): p. C98-101.

[4] Lequin, R.M., Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clin Chem, 2005. 51(12): p. 2415-8.

[5] Gan, S.D. and K.R. Patel, Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Invest Dermatol, 2013. 133(9): p. e12.

[6] Konstantinou, G.N., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Methods Mol Biol, 2017. 1592: p. 79-94.

[7] ELISA Handbook.

[8] Chaudhari, G., An overview on ELISAs techniques for analyte detection to new levels: a review. . International Journal of Multidisciplinary Educational Research, 2014. 3: p. 172-206.

[9] Peng, J., et al., Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of ovalbumin in foods. Food and Agricultural Immunology, 2014. 25(1): p. 1-8.

[10] Asensio, L., et al., Determination of Food Authenticity by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Food Control, 2008. 19: p. 1-8.

[11] Ivens, K.O., J.L. Baumert, and S.L. Taylor, Commercial Milk Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit Reactivities to Purified Milk Proteins and Milk-Derived Ingredients. Journal of Food Science, 2016. 81(7): p. T1871-T1878.

[12] Park, J.W., D.-h. Shon, and Y.-b. Kim, Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting mold contamination in agricultural commodities and comparison with conventional assays. Food and Agricultural Immunology, 2003. 15(3-4): p. 159-166.

[13] Pang, B., et al., Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157:H7 detection. Anal Biochem, 2018. 542: p. 58-62.

[14] Pizza, M., et al., Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science, 2000. 287(5459): p. 1816-20.

[15] Miura, K., et al., Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. Vaccine, 2008. 26(2): p. 193-200.

[16] Enterprise, V.W.G.o.G.H.V., et al., HIV vaccine-induced sero-reactivity: a challenge for trial participants, researchers, and physicians. Vaccine, 2015. 33(10): p. 1243-1249.

[17] Smalley, C., et al., Status of research and development of vaccines for chikungunya. Vaccine, 2016. 34(26): p. 2976-2981.

[18] Orsolini, G., et al., THU0327 Comparison of Immunoenzymatic Assay and Crithidia Immunofluorescence Test for The Detection of anti-Double Strand Dna Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Annals of the Rheumatic Diseases, 2016. 75(Suppl 2): p. 305-305.

[19] C. Janeway, Immunobiology, 5th edn. Immune System in Health and Disease. 2001, New York: Garland Science.

[20] Uchida, K., et al., Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. J Immunol Methods, 2014. 402(1-2): p. 57-70.

[21] Terato, K., et al., Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. J Immunol Methods, 2014. 407: p. 15-25.

[22] M. Akintude, , Immune abnormalities and autism spectrum disorders. 1st edition Neuroscience of Autism Spectrum Disorders. 2013.

[23] Bobosha, K., et al., Field-evaluation of a new lateral flow assay for detection of cellular and humoral immunity against Mycobacterium leprae. PLoS Negl Trop Dis, 2014. 8(5): p. e2845.

[24] Mameli, G., et al., Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. Journal of Neuroimmunology, 2015. 280: p. 66-68.

[25] Nandi, S., et al., Comparative assessment of commercial ELISA kits for detection of HIV in India. BMC Research Notes, 2014. 7(1): p. 436.

[26] Tarigan, S., et al., Characterization of the M2e antibody response following highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection and reliability of M2e ELISA for identifying infected among vaccinated chickens. Avian Pathol, 2015. 44(4): p. 259-68.

[27] Hunsperger, E.A., et al., Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. PLoS neglected tropical diseases, 2014. 8(10): p. e3171-e3171.

[28] Welch, R.J., G.J. Chang, and C.M. Litwin, Comparison of a commercial dengue IgM capture ELISA with dengue antigen focus reduction microneutralization test and the Centers for Disease Control dengue IgM capture-ELISA. J Virol Methods, 2014. 195: p. 247-9.

[29] Hosseini, S., et al., Synthesis and characterization of methacrylic microspheres for biomolecular recognition: Ultrasensitive biosensor for Dengue virus detection. European Polymer Journal, 2014. 60.

[30] Hosseini, S., et al., Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers: An exquisite outlook for fabrication of paper-based biosensors. Biosens Bioelectron, 2015. 69: p. 257-64.

[31] Schieffelin, J., et al., Clinical validation trial of a diagnostic for Ebola Zaire antigen detection: Design rationale and challenges to implementation. Clin Trials, 2016. 13(1): p. 66-72.

[32] Aria, L., et al., ELISA Chagas test IICS V. 1 evaluation for the diagnosis of Chagas disease. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 2016. 14: p. 7-13.

[33] Lauricella, M.A., et al., An rK28-Based Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Latin America. Am J Trop Med Hyg, 2016. 95(1): p. 92-8.

[34] Hinckley, A.F., et al., Lyme disease testing by large commercial laboratories in the United States. Clin Infect Dis, 2014. 59(5): p. 676-81.

[35] Prince, H.E., et al., Elimination of falsely reactive results in a commercially-available West Nile virus IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay by heterophilic antibody blocking reagents. Journal of Immunological Methods, 2017. 444: p. 24-28.

[36] Boonham, N., et al., Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. Virus Res, 2014. 186: p. 20-31.

[37] Wingeier, M., et al., Is salivary estriol detectable in very early pregnancy? The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2017. 30(2): p. 228-232.

[38] Chard, T., REVIEW: Pregnancy tests: a review. Human Reproduction, 1992. 7(5): p. 701-710.

[39] Karen, A., et al., Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. Anim Reprod Sci, 2015. 159: p. 31-7.

[40] El-Bali, M., et al., Appraisal of prenatal anti-toxoplasma gondii (IgG+ IgM)-IHA/IgM-ELISA screening in single samples via IgG avidity test. J Egypt Soc Parasitol, 2016. 46(1): p. 201-8.

[41] Makunyane, L.L., J. Moodley, and M.J. Titus, HIV transmission in twin pregnancy: Maternal and perinatal outcomes. Southern African Journal of Infectious Diseases, 2017. 32(2): p. 54-56.

[42] Senapati, S., et al., Predicting first trimester pregnancy outcome: derivation of a multiple marker test. Fertil Steril, 2016. 106(7): p. 1725-1732.e3.

[43] Chin, A.R., et al., Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. Cell Res, 2016. 26(2): p. 217-28.

[44] Scholler, N., et al., Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. Clin Cancer Res, 2006. 12(7 Pt 1): p. 2117-24.

[45] Kolosova, A.Y., et al., Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. Anal Bioanal Chem, 2006. 384(1): p. 286-94.

[46] Apollonio, L.G., et al., Matrix effect and cross-reactivity of select amphetamine-type substances, designer analogues, and putrefactive amines using the Bio-Quant direct ELISA presumptive assays for amphetamine and methamphetamine. J Anal Toxicol, 2007. 31(4): p. 208-13.

[47] Laloup, M., et al., Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA and MDA in blood and oral fluid. Forensic Sci Int, 2005. 153(1): p. 29-37.

Authors

Sharareh Sotoudeh[1,5*]

Marzieh Anaam[2,5], Sareh Hajiabadi[3,5],

Mohammad Reza Nejadmoghaddam[4,5]

*sharareh.sotudeh@gmail.com

1. Sharareh Sotoudeh, Ph.D. candidate in Microbiology, Yazd Science Technology Park (Arapajoohan Amin Yazd Co)

2. Marzieh Anaam, M.Sc. in Biotechnology, Dezful University of Medical Sciences.

3. Sareh Hajiabadi, Ph.D. candidate in Biotechnology. Research Institute of food science & Technology. Mashhad, Iran.

4. Mohammad-Reza Nejadmoghaddam,Ph.D. in medical nanotechnology, Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.

5. Biotechnology Working Group

# Introduction of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method

## Part 1
## Principles and applications

Keywords

ELISA, Antigen, Antibody, Immune Complex, Conjugated Enzyme, Substrate, Colorimetric assay.

Abstract

The ELISA technique is an immunochemical method for determining the amount of an antibody or antigen molecule. In this technique, the solid phase is used to create a suitable substrate for binding to an antigen or antibody. The enzyme attached to the antigen-antibody complex is then used to convert the appropriate substrate into a dye product. The rate of conversion of a colorless substrate to a dye product by an enzyme, which indicates the presence of an antigen or antibody and also its concentration, it can be determined by measuring the optical density with a spectrophotometer. This study aims to introduce the ELISA technique, its applications, advantages, disadvantages, challenges and important parameters in improving the results.

شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه تخصصی

# دانش آزمایشگاهی ایران

ISSN 2538-3450

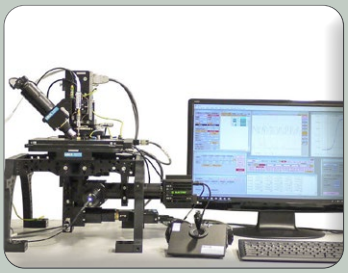
سال نهم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۴۰۰ ■ شماره پیاپی ۳۳

## روش آزمون غربالگری با توان بالا چیست؟

معرفی توانمندی مجموعه‌های عضو شبکه آزمایشگاهی بر بستر فضای مجـازی

معرفی روش سنجش جذب ایمنی آنزیمی یا روش الایزا

آزمون‌های سنجش کیفیت عسل مطابق با استانداردهای ملی ایران



کاربرد میکروسکوپ الکترونی شیمیایی روبشی در مطالعه خوردگی فلزات

جایگاه و اهمیت نظام تایید صلاحیت ایران و ساختار کلی تایید صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون براساس الزامات مرکز ملی تایید صلاحیت ایران

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir