

آزمون های ایمنو فلورسانس (Immunofluorescence Methods)

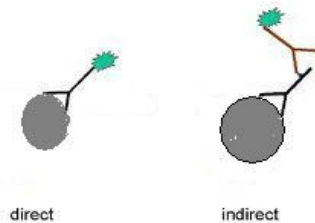
مقدمه:

در روش های ایمنو فلورسانس (IF) از ماده فلورسنت یا فلوروکروم بعنوان نشانگر استفاده می شود که توانایی جذب نور با طول موج پایین تروسطاع نمودن نوری با طول موج بالاتر را دارند. رایج ترین فلوروکروم ها فلورسئین ایزوسیانات (FITC)، رودامین (RB)، قرمز تگزاس (Tx Red) هستند که به ترتیب نورهای فلورسانس سبز، نارنجی و قرمز دارند.

روشهایی که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت انجام می شوند به دو گروه مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می شوند.

روش ایمنو فلورسنت مستقیم یا **Direct Immuno Fluorescence Assay (DIFA)**: این روش کاربرد محدودتری دارد و برای جستجوی آنتی ژنهای ذره ای (particular) مانند میکروبها و سلولها و همین طور رسوب کمپلکس های ایمنی مورد استفاده قرار می گیرد، در این روش آنتی بادی اختصاصی متصل به مواد فلورسانس استفاده می شود. پس از اتصال آنتی ژن به آنتی بادی فلورسنت، لام با میکروسکوپ فلورسنت بررسی می شود.

روش ایمنو فلورسنت غیرمستقیم یا **Indirect Immuno Fluorescence Assay (IIFA)**: این روش کاربرد زیادی در تشخیص بیماریهای خود ایمنی و بیماریهای عفونی دارد و اغلب برای جستجوی آنتی بادی در مایعات بیولوژیک خصوصاً سرم استفاده میشود که در این روش آنتی بادی اولیه نشاندار نبوده ولی با اضافه کردن یک آنتی بادی ثانویه نشاندار قابل شناسائی خواهد بود.



روش غیر مستقیم مزیتهای زیادی دارد از جمله اینکه اولاً نیازی به کونژوگه کردن آنتی بادی اول با فلوروکروم نمی باشد. ثانیاً حساسیت این روش بیشتر است چون چندین آنتی بادی ثانویه فلورسنت میتواند به آنتی بادی اولیه متصل شده و میزان نور ساطع شده را افزایش دهد. ثالثاً دارای هزینه های کمتری است.

روش کار: بررسی تیتراژ آنتی بادی ضد توکسو پلاسما در سرم بیماران مشکوک به توکسوپلاسموز

یا بررسی تیتراژ آنتی بادی ضد آنتی ژنهای هسته ای (ANA) در سرم بیماران مشکوک بیماریهای خود ایمنی

۱- در آزمون **Toxoplasma** سرم بیمار را به نسبت های ۱/۱۰۰ ، ۱/۲۰۰ ، ۱/۴۰۰ با بافر فسفات رقیق نمائید.

- در آزمون **ANA** سرم بیمار را به نسبت های ۱/۲۰ ، ۱/۴۰ ، ۱/۸۰ ، ۱/۱۶۰ با بافر فسفات رقیق نمائید.

۲- مقدار ۲۰ میکرولیتر از سرم های رقیق شده و کنترل های مثبت و منفی را به حفره های لام اضافه نمائید. (مانند شکل زیر)

رقت چهارم	رقت سوم	رقت دوم	رقت اول	Pos	Neg
-----------	---------	---------	---------	-----	-----

۳- لام را ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه در داخل یک ظرف مرطوب انکوبه نمائید.

۴- محتویات سطح لام را با استفاده از پیست بافر فسفات شستشو دهید.

۵- لام را بمدت ۱۰ دقیقه (دو بار هر بار ۵ دقیقه) با بافر فسفات شستشو دهید و در نهایت لام را با آب مقطر شستشو دهید و آن را

خشک نمائید. توجه کنید در موقع خشک کردن به حفره ها دست نزنید.

- ۶- ۱۰ میکرولیتر کونژوگه (آنتی بادی ضد IgG انسانی کونژوگه با FITC) به هر یک از حفره ها اضافه کنید.
- ۷- لام را بمدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه در داخل یک ظرف مرطوب قرار دهید.
- ۸- لام را مانند مرحله سه بمدت ۱۰ دقیقه با بافر فسفات شستشو دهید. برای اینکه فلورسانس سبز FITC بهتر قابل مشاهده باشد، هنگام شستشو به محلول بافر مقداری اوانس بلو اضافه نمائید تا فلورسانس قرمز رنگ خفیفی در زمینه لام ایجاد کند.
- ۹- یک قطره گلیسرین ۵۰٪ روی لام ریخته و آنرا با لامل بپوشانید و با میکروسکپ ایمنوفلورسانس بررسی نمائید.