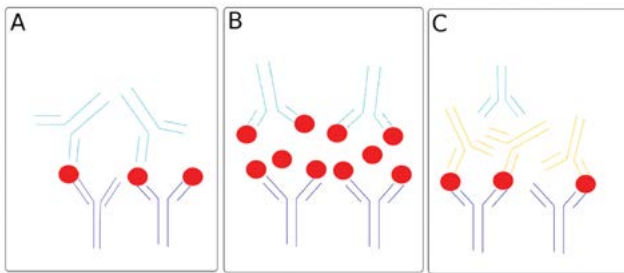


نویسندگان:

دکتر حمیدرضا ملایی^۱، مریم صادقیپور^۲، زهرا نصیری^۳، آوا جلالو^۴
 ۱-مدیر تولید ۲- مدیر تضمین کیفیت ۳و۴-کارشناسان تولید شرکت آریا تابان آزما

تأثیر Hook and Matrix effect بر روی نتایج تست‌های Lateral Flow Assay

می‌شود، می‌توان با تنظیم غلظت آنتی‌بادی آن را تغییر داد، اما تعیین دقیق آنالیت در بالاتر از محدوده دینامیکی هنوز دشوار است. روش‌هایی که برای کاهش «اثر قلاب» و افزایش محدوده دینامیکی LFIA ها انجام می‌شود عبارتند از: رقیق‌سازی سریالی نمونه‌های آزمایشی، افزایش تعداد خطوط آزمایشی با میزان متفاوتی از آنتی‌بادی تشخیصی، افزودن آنتی‌بادی‌های گیرنده ثانویه. به جز رقیق‌سازی سریالی نمونه (که تعداد مراحل کاربر را افزایش می‌دهد)، هیچ یک از روش‌های فوق را نمی‌توان با LFIAهای تجاری موجود در بازار بررسی کرد(۱).



تصویر شماره (A): روش ساندویچ معمولی که آنتی‌بادی Capture بنفش رنگ، آنتی ژن قرمز و آنتی‌بادی detection نیز فیروزه‌ای است. (B) آنتی ژن زیاد به هر دو آنتی‌بادی Capture, detection متصل شده و سبب کاهش سطح تشخیص می‌شود (C) با وجود آنتی‌بادی بلوک‌کننده (نارنجی) مانع از اتصال آنتی‌بادی detection به آنتی ژن شده و سطح تشخیص کاهش می‌یابد.

روش ایمنونواسی جریان جانبی (LFIA=Lateral Flow Immuno-Assay) یکی از موفق‌ترین آزمایش‌های تشخیصی سریع (RDT=Rapid Test) برای آزمایشات غربالگری و اورژانسی است. افزایش حساسیت، اختصاصیت و کمی‌سازی این تست، از مباحث مهم است، در نتیجه رنج تشخیصی یا محدوده دینامیکی برای ثبت یک محدوده بالینی مرتبط با یک آنالیت نیز به همان اندازه مهم خواهد بود. معمولاً محدوده دینامیکی به‌دست‌آمده توسط روش‌های آنزیماتیک ایمنونواسی، ۲برابر بزرگتر است (اگرچه محدوده‌های دینامیکی بالاتری با استفاده از روش‌های ایمنو فلورسانس FIA، کمی لومینسانس CLIA و یا رادیوایمنونواسی (RIA) به‌دست می‌آید. محدوده دینامیکی تست‌های ایمنونواسی جریان جانبی یا LFIA ساندویچی توسط «اثر قلاب» Hook Effect تحت تأثیر قرار می‌گیرد که طبق آن شدت سیگنال خط آزمایش (Test Line) با افزایش غلظت آنالیت در محدوده بالاتر از غلظت نرمال کاهش می‌یابد. کاهش شدت سیگنال روی خط Test به برهمکنش بین یک مولکول آنتی‌ژن و دو مولکول آنتی‌بادی برای ایجاد سیگنال وابسته است. در محدوده‌های بالاتر از غلظت آستانه آنتی‌ژن، احتمال چنین برهمکنش کاهش می‌یابد زیرا آنتی‌بادی‌های موجود احتمال دارد که با مولکول‌های مختلف آنتی‌ژن اتصال یافته و «اثر قلاب» در روش ایمنونواسی ساندویچی پدیدار شود، بنابراین در روش‌های ایمنونواسی که به یک آنتی‌بادی واحد متصل به آنالیت متکی است (مثلاً ایمنونواسی‌های رقابتی) این اثر را نشان نمی‌دهد.

«اثر قلاب» در LFIAهای ساندویچی ممکن است منجر به نتایج منفی کاذب یا تخمین کمتر از حد غلظت واقعی آنالیت شود. در غلظتی از آنالیت که در آن «اثر قلاب» ایجاد

غلظت آنالیت‌های مهم تشخیصی مانند تومورمارکرآنتی ژن کارسینوما مریونیک (CEA)، کلسی‌تونین، پرولاکتین و پروتئین واکنشی سی (CRP) می‌تواند در طیف وسیعی متفاوت باشد و بسته به محدوده غلظت آن‌ها، پیامدهای بالینی متفاوتی داشته باشد. تعیین کمی غلظت آنالیت با استفاده از سنجش‌های جریان جانبی، جایگزینی کم‌هزینه و کاربرپسند برای سنجش‌های آزمایشگاهی است. با این حال، سنجش‌های ایمنی از نوع ساندویچی اغلب به دلیل اثر قلاب با دوز بالا محدود شده که باعث می‌شود در صورت وجود آنالیت‌ها در غلظت‌های بسیار بالا، نتایج کاذب کمتر باشد.

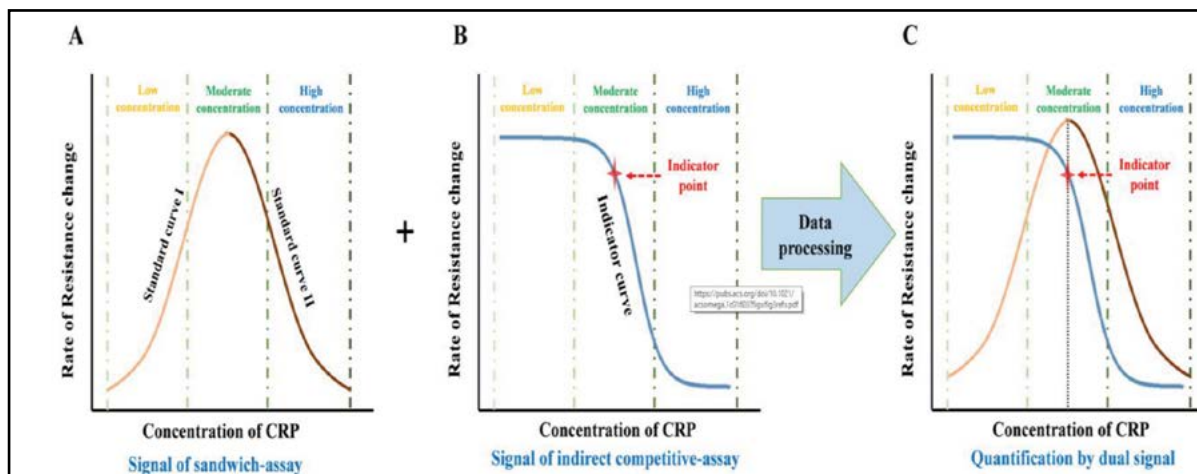
لذا براساس شواهد علمی و عملی می‌توان برای رفع اثر هوک در برخی از تست‌ها، یک تکنیک مبتنی بر سینتیک واکنش ارائه داد که این مشکل را حل و دامنه دینامیکی آن‌ها را به طور قابل توجهی افزایش دهد. بنابراین با تبدیل یک سنجش ایمنی جریان جانبی رقابتی به یک سنجش ساندویچی، می‌توان محدوده تشخیصی را بزرگ‌تر کرده و علاوه بر حذف اثر هوک، سبب افزایش دقت در تست محدود شده به اثر قلاب گردید (۲).

استفاده از سنجش‌های جریان جانبی (LFA) در دستگاه‌های POCT، عمدتاً به دلیل سهولت نسبی در استفاده و هزینه‌های پایین تولید، در حال گسترش است. در تست‌های کیفی که معمولاً نتیجه‌ای مثبت یا منفی ارائه می‌دهد، تلاش شده تا آن‌ها را برای تشخیص کمی آنالیت‌ها بهینه کند. اکثر تست‌های LFA پس از اجرای کامل، با استفاده از نسبت شدت خط Test و Control، کمیت سنجی را انجام می‌دهد. این روش می‌تواند نتایج دقیقی را برای بسیاری از آنالیت‌ها ارائه دهد. با این حال، محدوده دینامیکی اغلب در غلظت‌های بالاتر توسط اثر قلاب محدود می‌شود. در LFA‌های ساندویچی، نسبت شدت خط Test به خط Control با افزایش غلظت آنالیت افزایش می‌یابد. غلظت بیشتر آنالیت‌ها در محلول منجر به اتصال بیشتر پروب‌های گزارشگر (مثلاً نانوذرات طلا) به خط تست می‌شود که کنتراست بالاتری را در برابر پس‌زمینه نوار تست نشان می‌دهد. با افزایش غلظت آنالیت، سیگنال خط Test از افزایش باز می‌ایستد و در عوض شروع به کاهش می‌کند و اثر قلاب را نشان می‌دهد. علت این امر اتصال بیش از حد آنالیت در نمونه به آنتی‌بادی‌های روی خط Test است که باعث مسدود شدن مکان‌های اتصال آنتی ژن به آنتی

بادی کونژوگ می‌شود. همچنین اتصال بیش از حد آنتی ژن به آنتی‌بادی‌های کونژوگ شده، سبب تجمع ذرات آنتی ژنی و ممانعت فضایی و جلوگیری از اتصال به آنتی‌بادی‌های موجود در خط تست می‌شود. غلظت خاصی که این اتفاق می‌افتد همیشه در انتهای بالایی محدوده تشخیصی آنالیت بوده و از تعیین مقدار دقیق جلوگیری می‌شود (۳).

برای نمونه، پروتئین CRP بخشی از پاسخ ایمنی حاد به عفونت، التهاب و آسیب بافتی است. سطح سرمی آن در افراد با خطرات قلبی، عفونت و بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد. غلظت CRP بین ۱ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند خطر بیماری قلبی را نشان دهد، در حالی که غلظت‌های بیشتر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند نشان‌دهنده عفونت حاد باشد. غلظت CRP در سرم می‌تواند نشان‌دهنده التهاب در بیماران آرتریت روماتوئید از ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تا بیش از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد. در موارد عفونت شدید و سپسیس، CRP می‌تواند به ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر یا بالاتر برسد. در نتیجه با وجود این محدوده دینامیکی نسبتاً بزرگ، روش‌های ایمونواسی رایج و سرپایی برای تعیین مقدار CRP با مشکل Hook Effect مواجه است و تنها بخشی از محدوده غلظتی CRP را می‌توان اندازه‌گیری کرد. به همین دلیل، در تشخیص CRP آزمایش‌های CRP با حساسیت بالا (یا hsCRP) در محدوده ۱ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده می‌شود. رایج‌ترین روش برای غلبه بر این مشکل، رقیق‌سازی سریالی نمونه و آزمایش نمونه‌های رقیق شده و رقیق نشده برای بررسی اثر هوک است. این روش، اگرچه دقیق است، اما زمان و هزینه هر نمونه را افزایش می‌دهد. رویکرد دیگر، افزایش تعداد خطوط Test در نوار LFA و اضافه کردن یک خط تست رقابتی علاوه بر خط ساندویچی اصلی است. اگرچه این تکنیک مؤثر است، اما هزینه تولید نوارهای تست را نیز افزایش می‌دهد (۴).

آنالیت‌های دیگری نیز وجود دارد که دامنه غلظتی فیزیولوژیکی وسیعی دارند و سنجش‌های آن‌ها تحت تأثیر اثر قلاب قرار می‌گیرد. نمونه‌هایی از این آنالیت‌ها شامل گنادوتروپین جفتی انسان (hCG)، Prolactin، LH، FSH است. افزایش غلظت hCG در سرم و ادرار، اغلب نشان‌دهنده وجود بارداری است و می‌توان از آن‌ها برای تعیین



تصویر شماره ۲: (A) منحنی به دست آمده با غلظت های مختلف CRP که اثر "قلاب" را در روش ساندویچی نشان می دهد. (B) منحنی شدت سیگنال اندازه گیری شده با در غلظتهای مختلف آنالیت در سنجش رقابتی. (C) روی هم قرار دادن نتایج دو روش برای تعیین موقعیت نقطه آستانه و میزان غلظت آنالیت در ایجاد پدیده هوک.

مکانیسم اثر قلاب بر اساس منحنی اشباع آنتی بادی با آنتی ژن است و در درجه اول، به غلظت آنالیت بستگی دارد و با افزایش آنالیت تمام جایگاه های اتصال روی آنتی بادی اشباع می شود. این اثر عمدتاً (اما نه منحصر) در سنجش هایی رخ می دهد که در آن ها هر سه جزء (آنتی ژن، آنتی بادی و نشانگر) به طور همزمان انکوبه می شود (سنجش تک مرحله ای). اثر قلاب در سنجش های ایمنواسی رقابتی کمتر مشاهده می شود. در صورت استفاده از حداقل آنتی بادی در ساخت کیت، مقدار اضافی آنتی ژن که به ترکیب کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی متصل نشده وجود داشته که این امر منجر به کاهش کاذب مقدار آنتی ژن اندازه گیری شده می شود که حتی می تواند در بازه مرجع قرار گیرد. در تصویر شماره ۴ منحنی اشباع آنتی بادینشان داده شده است (۶).

تولیدکنندگان معرف ها در روش های ایمنوتوربیدیمتری، اثر قلاب را با استفاده از ذرات لاتکس کونژوگه شده با آنتی بادی کاهش داده اند. در سنجش های رقابتی، اثر قلاب با اضافه کردن یک مرحله رقیق سازی یا شستشو پس از واکنش آنالیت با آنتی بادی گیرنده و قبل از افزودن آنتی بادی ردیاب حذف شده است. تولیدکنندگان معرف ها با افزایش مقدار آنتی بادی گیرنده و ردیاب و کاهش مقدار نمونه مورد نیاز، اثر قلاب را کاهش می دهند (۷).

اثر قلاب پدیده ای رایج در کار روزمره آزمایشگاهی است و به هیچ وجه نباید نادیده گرفته شود. این اثر در طیف بسیار وسیعی از غلظت ها مانند CRP (افزایش

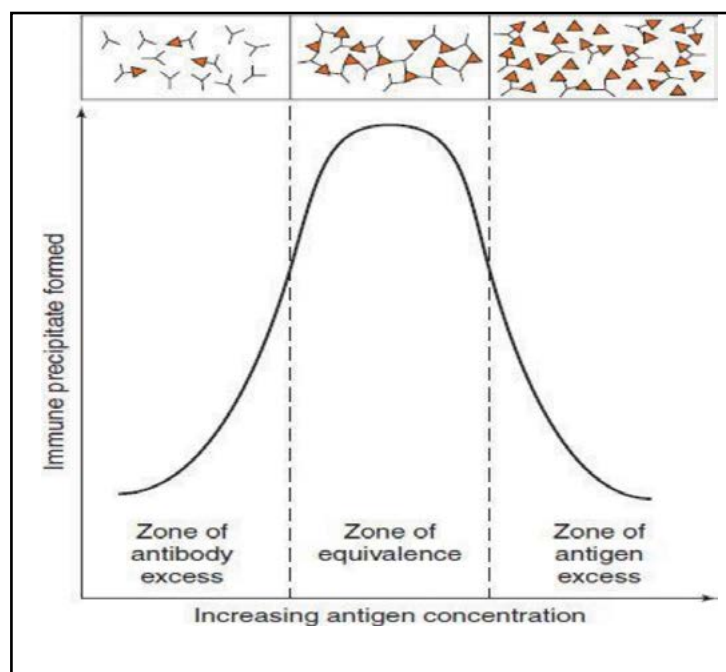
شرایط مختلف بارداری استفاده کرد. نتایج کاذب و خوانش کمتر از حد غلظت می تواند منجر به عدم تشخیص یا تشخیص اشتباه در این شرایط شود (۵).



تصویر شماره ۳) مشاهده اثر هوک در تست hCG استاندارد ۲۵۰۰۰۰ واحد در میلی لیتر (A) نمونه ۱۰/۱ رقیق شده (C) نمونه ۱۰۰/۱ رقیق شده

تأثیر گذار باشد، ماهیت و ترکیب نمونه است. نمونه سرم یا پلاسما ترکیبی پیچیده از لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، نمک و آب است. مجموع تداخلات تمام اجزای نمونه که بر روی اندازه‌گیری آنالیت هدف تأثیر می‌گذارد، به عنوان "اثر ماتریسی" شناخته می‌شود. اکثر اجزای سرم که باعث ایجاد اثر ماتریسی می‌شود، تمایل کمی به اتصال به آنالیت یا آنتی‌بادی دارد و این جزء معمولاً آنالیت یا آنتی‌بادی را پنهان می‌کند و باعث عدم واکنش اتصال آنالیت به آنتی‌بادی می‌شود. به جز این عناصر درون‌زا، مفهوم اثر ماتریسی می‌تواند به اجزای بیرون‌زا که مربوط به تأثیر نوع ضد انعقاد بکار رفته در نمونه‌گیری یا تأثیر فعال‌کننده و جداکننده سرم است، گسترش یابد. درمان با هپارین در بیماران مبتلا به انفارکتوس حاد میوکارد (AMI) بر نتیجه تعیین غلظت تروپونین I تأثیر می‌گذارد. به دلیل بار منفی پلی‌آنیون‌ها، هپارین به کاتیون‌های تروپونین متصل شده و این می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری در مولکول تروپونین یا پوشش مستقیم اپی‌توپ‌های دخیل در واکنش ایمنی با آنتی‌بادی‌های هدف شود. علاوه بر این، هپارین دارای میل ترکیبی متفاوتی به برخی از اشکال تروپونین موجود در خون بیمار در مراحل مختلف پس از سکته قلبی دارد، ضدانعقاد EDTA می‌تواند بر آزادسازی cTnI آزاد از کمپلکس cTnI-تروپونین C وابسته به یون کلسیم تأثیر بگذارد و باعث کاهش کاذب مقادیر در روش‌های مختلف شود.

علیرغم توصیه‌هایی مبنی بر اینکه نشانگرهای قلبی باید در پلاسما تعیین شود، به ویژه در بخش اورژانس، نمونه انتخابی برای تعیین تروپونین، سرم است که در لوله‌های با یا بدون ژل جداکننده و یا در لوله‌های ترومبین جمع‌آوری می‌شود. ژل مورد استفاده به عنوان جداکننده سرم، می‌تواند برخی از آنالیت‌های سرم را جذب و باعث کاهش کاذب غلظت آنها شود، مانند داروهای ضدافسردگی، و بنزودیازپین. در حدود پنج تا سی درصد از داروها می‌تواند توسط ژل جذب و اگر نمونه برای مدت طولانی‌تری (۲۴ ساعت) نگهداری شود، می‌تواند تا ۴۰ درصد افزایش جذب ایجاد شود. در صورتی که نمونه برای تجزیه و تحلیل نیاز به انجماد داشته باشد، سرم باید در



تصویر شماره ۸: منحنی اشباع آنتی‌بادی با آنتی‌ژن

۱۰۰ برابری)، آنتی‌بادی‌های ضد استافیلولیزین (افزایش ۱۰ برابری)، هورمون hCG (با افزایش غلظت ۶ برابر، IgE بیش از ۱۰۰۰ برابر)، فریتین (افزایش ۱۰۰ برابری)، و افزایش بیش از ۱۰۰۰۰ برابری تومورمارکرها (AFP موجود در بند ناف نوزادان) وجود دارد (۸).

حد آستانه‌ای، که در آن خطی بودن روش‌های کدورت‌سنجی یا توریدومتری از بین می‌رود، با معرفی ذرات لاتکس به عنوان حامل آنتی‌بادی به سمت مقادیر بالاتر تغییر می‌کند. اگر تولیدکننده، غلظت حد آستانه آنالیت را که بالاتر از آن اثر قلاب رخ می‌دهد، علامت‌گذاری نکرده باشد، تکنسین آزمایشگاهی باید این موضوع را بررسی و این داده‌ها را در دفترچه راهنمای آزمایشگاه ثبت کند. احتمال وقوع اثر قلاب با وجود نمونه‌ای با غلظت بالا و در رقت‌های ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰ کشف می‌شود. اگر در نمونه‌های رقیق‌شده مقادیر بالاتری نسبت به نمونه غیررقیق‌شده اندازه‌گیری شود، وجود اثر قلاب حتمی است و تعیین غلظت حد آستانه پس از آن انجام می‌شود. نمونه باید تا زمانی که نتایج دو رقت متوالی مطابقت داشته باشند، رقیق شود (۹).

اثر ماتریکس Matrix effect

یکی دیگر از عواملی که ممکن است در نتیجه تست

for the Detection of IgG against SARS-CoV-2 Spike Protein in Human Serum: Proof-of-Concept. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(9).

5. Kiemle J, Hindenberg S, Bauer N, Roecken M. Comparison of a point-of-care serum amyloid A analyzer frequently used in equine practice with 2 turbidimetric immunoassays used in human and veterinary medicine. *J Vet Diagn Invest*. 2022;34(1):42–53.

6. Guglielmo-Viret V, Splettstoesser W, Thullier P. An immunochromatographic test for the diagnosis of ricin inhalational poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2007;45(5):505–11.

7. Gillet P, Mori M, Van Esbroeck M, Van den Ende J, Jacobs J. Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. *Malar J*. 2009; 8:271.

8. Cavalera S, Russo A, Foglia EA, Grazioli S, Colitti B, Rosati S, et al. Design of multiplexing lateral flow immunoassay for detection and typing of foot-and-mouth disease virus using pan-reactive and serotype-specific monoclonal antibodies: Evidence of a new hook effect. *Talanta*. 2022; 240:123155.

9. Cavalera S, Colitti B, De Mia GM, Feliziani F, Giudici SD, Angioi PP, et al. Development of molecular and antigenic-based rapid tests for the identification of African swine fever virus in different tissues. *Talanta*. 2023; 258:124443.

10. Zhao M, Li G, Qiu F, Sun Y, Xu Y, Zhao L. Development and Validation of a Simple and Rapid UPLC-MS Assay for Valproic Acid and Its Comparison with Immunoassay and HPLC Methods. *Ther Drug Monit*. 2016;38(2):246–52.

11. Hou Y, Miao J, Sun Y, Shi L, Ouyang L, Chen X, et al. Ligand-binding assays validated for quantitative bioanalysis of a novel antibody-drug conjugate in monkey serum and related application in a nonclinical study. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2025; 131:107580.

یک لوله آزمایش جداگانه جمع آوری شود. علت تغییرپذیری نتایج حتی ممکن است بر اثر وجود ترکیباتی در ماتریکس کالیبراتور یا نمونه‌های کنترل باشد، زیرا ماتریکس آنها با نمونه بیولوژیکی، متفاوت است (۱۱).

بحث و نتیجه‌گیری

پدیده Hook یک چالش بیوفیزیکوشیمیایی شناخته شده است که با طراحی مناسب assay و آگاهی از روش‌های موثر در واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی می‌توان از بروز آن پیشگیری کرد. نمونه‌های بیولوژیکی مانند پرولاکتین در پرولاکتینوما، PSA در سرطان پروستات منتشر، hCG در حاملگی مولار و کلسیتونین در کارسینومای مدولاری تیروئید از نمونه‌های کلاسیک بروز Hook است. برای جلوگیری از این پدیده در محصولات تولیدی، توصیه به رقیق‌سازی نمونه، بررسی سازگاری نتیجه با وضعیت‌های بالینی، انتخاب فرمت ساندویچ دومرحله‌ای برای آنالیت‌های با خطر بالا، افزایش نسبت آنتی‌بادی‌ها، استفاده از شستشو و بلاکینگ مؤثر، طراحی اپی‌توپی غیرهمپوشان بین آنتی بادی‌های اختصاصی، بررسی دامنه خطی وسیع در کنترل کیفی از راهکارهای عملی و پیشگیری در مرحله تولید است.

References:

1. Oh J, Joung HA, Han HS, Kim JK, Kim MG. A hook effect-free immunochromatographic assay (HEF-ICA) for measuring the C-reactive protein concentration in one drop of human serum. *Theranostics*. 2018;8(12):3189–97.
2. Schofl C, Schofl-Siebert B, Karstens JH, Bremer M, Lenarz T, Cuarezma JS, et al. Falsely low serum prolactin in two cases of invasive macroprolactinoma. *Pituitary*. 2002;5(4):261–5.
3. Lourens A, Jarvis JN, Meintjes G, Samuel CM. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by use of lateral flow assay on cerebrospinal fluid samples: influence of the high-dose “hook” effect. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4172–5.
4. Kropaneva M, Khramtsov P, Bochkova M, Lazarev S, Kiselkov D, Rayev M. Vertical Flow Immunoassay Based on Carbon Black Nanoparticles