مقاله علمی و فنی شرکتها

نویسندگان:
۱-دکتر حمیدرضا ملایی، مدیر تولید شرکت آریا تابان آزما
۲- مریم صادق پور، مدیر تضمین کیفیت، آریا تابان آزما

مروری بر تولید دستگاه‌های POCT و کیت‌های تشخیصی بافناوری ایمونواسی فلورسانس با تفکیک زمانی (TRFIA)

پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های تشخیص زیستی، به‌ویژه در شاخه آنالیزورهای ایمنواسی، باعث توسعه روش‌هایی شده است که قادرند سیگنال‌های بسیار ضعیف بیولوژیک را با حساسیت و دقت بالا آشکارسازی کنند. در این میان، روش Time-Resolved Fluorescence Immunoassay (TRFIA)یکی از پیشرفته‌ترین و حساس‌ترین تکنیک‌هایی است که توانسته محدودیت‌های بنیادی فلوئورسانس معمولی را برطرف سازد. درحال حاضر کمپانی‌های تولیدی دستگاه‌ها و کیت‌های تشخیصی محدودی مانند Getein Biotech Inc از این تکنیک در تولیدات خود استفاده می‌کنند، اما استفاده از این روش توانسته تحول چشمگیری در نتایج و تست‌های تشخیصی ایجاد نماید.

تکنیک TRFIA، بر پایهٔ ویژگی‌های منحصربه‌فرد یون‌های لانتانیدی به‌ویژه Tb^{3+}، Eu^{3+} و Sm^{3+} استوار است. این یون‌ها دارای طول‌عمر فلورسانس بسیار طولانی و طیف‌های نوری باریک است و امکان تفکیک زمانی سیگنال را فراهم می‌کند. این قابلیت به دستگاه‌ها اجازه می‌دهد نویز زمینه، تداخل اتوفلورسانس نمونه و سیگنال‌های غیر اختصاصی را به حداقل برساند و تنها سیگنال خالص ناشی از واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را اندازه‌گیری کند.[1]

اهمیت TRFIA در تشخیص‌های بالینی روزبه‌روز در حال افزایش است، زیرا رویکردهای کلاسیک مانند فلورسانس عادی، ELISA یا Gold colloid lateral flow قادر به ارائه حساسیت‌های فوق‌العاده پایین (pg/mL) نیست. با توجه به گسترش نیازهای بالینی برای تشخیص زودهنگام مثل hs-cTnI و hs-CRP، TRFIA به‌عنوان پایهٔ بسیاری از دستگاه‌های نسل جدید POCT معرفی شده است.

هدف این مقاله ارائه تحلیلی جامع و پیوسته از اصول فیزیکی TRFIA، ویژگی‌های یون‌های لانتانیدی، طراحی دستگاه، رفتار سینتیکی سیگنال، قابلیت‌های تحلیلی، و کاربردهای بالینی آن است[۲].

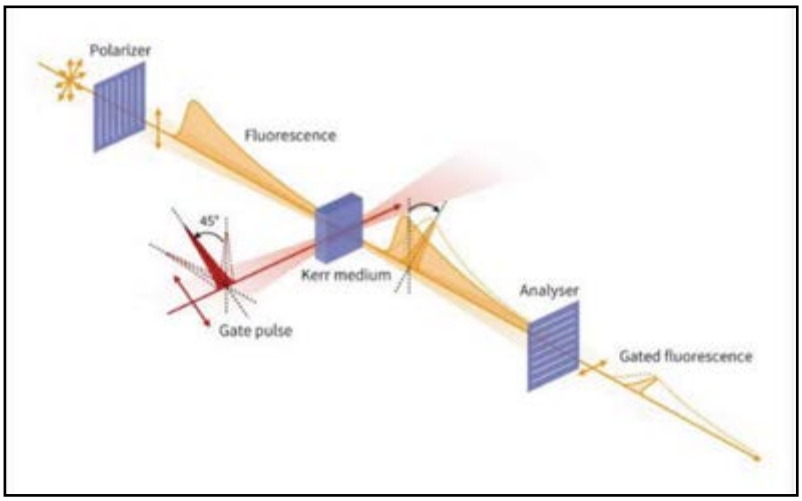
ماهیت فیزیکی Time-Resolved Fluorescence

در فلورسانس معمولی، سیگنال بلافاصله بعد از تحریک نوری اندازه‌گیری می‌شود. این روش به دلیل شدت بالای نویز پس‌زمینه در نوار نیتروسلولز، پلاسمای انسانی، بافت‌های بیولوژیک و حتی خود پلیمر کارتریج، دارای محدودیت بنیادی در SNR است. علت اصلی این مشکل هم‌پوشانی زمانی سیگنال‌های لانتانیدی با سیگنال‌های ناشی از autofluorescence است. اما درTRFIA، برچسب‌های لانتانیدی مانن Eu^{3+}دارای عمر گسیل طولانی در حد ۰٫۵ تا ۱٫۵ میلی‌ثانیه است، در حالی که تمام مولکول‌های فلورسانس خودبخودی ماتریکس در حد نانوثانیه خاموش می‌شود. این تفاوت زمانی بسیار مهم است. در TRFIA ابتدا یک پالس نور با طول‌موج تحریک کننده مناسب تابانده شده و سپس دستگاه چند صد میکروثانیه صبر می‌کند، یعنی زمانی که کل سیگنال مزاحم از بین رفته است. در این نقطه، فقط یون‌های لانتانیدی همچنان در حال گسیل نور هستند. دستگاه در یک پنجره زمانی تعریف شده (Gate Time) سیگنال را ثبت می‌کند. پیامد این فرآیند تفکیک زمانی، کاهش نویز پس‌زمینه تا چندین مرتبه و افزایش چشمگیر

حساسیت است. به همین دلیل است که TRFIA می‌تواند غلظت‌هایی را اندازه‌گیری کند که سایر روش‌ها قادر به تشخیص آن نیست[۳].

ویژگی‌های شیمیایی و نوری یون‌های لانتانیدی

یون‌های Tb^{3+}، Eu^{3+} و Sm^{3+} متعلق به عناصر سری لانتانید است که مدارات الکترونی 4f آن‌ها گسیل‌هایی با ویژگی‌های کاملاً یکتا ایجاد می‌کند. برای مثال، Eu^{3+} طیف نشری (Emission) بسیار باریک با پیک غالب در حدود ۶۱۵ نانومتر تولید می‌کند که از نظر زمانی نیز طول‌عمر بسیار بیشتری نسبت به امیترهای آلی دارد Tb^{3+} در ناحیه ۵۴۵ نانومتر و Sm^{3+} در حدود ۶۰۰ نانومتر نور منتشر می‌کنند. این تفاوت طول‌موج‌های نشر داده شده اجازه Multiplex واقعی در lateral flow یا حتی microplate-based assays را فراهم می‌کند. از طرف دیگر، یون‌های لانتانیدی به‌صورت آزاد در آب پایدار نیست و نیازمند تشکیل کمپلکس با لیگاندهای Chelator مانند DTPA یا β-diketonates است. این لیگاندها یون را در ساختار پایدار قرار داده و اجازه برچسب‌گذاری اختصاصی به آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن را فراهم می‌کند. کمپلکس حاصل نسبت به فوتوبلیچینگ مقاوم است و گسیل پایدار و قابل تکراری تولید می‌کند. مزیت دیگر این است که این کمپلکس‌ها تحریک نوری در محدوده UV دارند و گسیل در محدوده قابل‌مشاهده (Visible) ایجاد می‌کنند[۴].



اساس سیستم نوری در آنالیزورهای فلورسانس

پروتئین‌های سرمی و حتی پلیمرهای کارتریج سیگنال‌های سریع (Fast fluorescence) ایجاد می‌کند. طول‌عمر این سیگنال‌ها بین ۱ تا ۱۰ نانوثانیه است. اما یون‌های لانتانیدی دارای طول‌عمر میلی‌ثانیه‌ای است. بنابراین، اگر دستگاه چند صد میکروثانیه صبر کند، تقریباً تمام سیگنال مزاحم از بین می‌رود و تنها سیگنال خالص لانتانیدی باقی می‌ماند. این پدیده اساس تمایز TRFIA نسبت به فلورسانس کلاسیک است. نمودار شبیه‌سازی‌شده زیر نشان می‌دهد که سیگنال سریع با شیب بسیار شدید افت می‌کند، اما سیگنال Eu^{3} با شیب ملایم و پایدار تا زمان‌های طولانی باقی می‌ماند. دستگاه دقیقاً از این اختلاف بهره می‌برد تا SNR را چند برابر افزایش دهد[۵].

نمودار۱ نشان می‌دهد چرا Time-Resolved باعث حذف نویز شده و سیگنال لانتانید را به‌صورت کاملاً خالص استخراج می‌کند.

یون	نام	رنگ فلورسانس	کاربرد اصلی
Eu^{3+}	Europium	قرمز	رایج‌ترین برچسب TRFIA؛ حساسیت بالا
Tb^{3+}	Terbium	سبز	Multiplexing: تفکیک رنگی
Sm^{3+}	Samarium	نارنجی/قرمز	Multiplex: سیگنال متمایز

جدول شماره ۱) مهمترین لانتانیدهای کاربردی در روش‌های ایمنواسی

ساختار دستگاه TRFIA و نحوه خوانش سیگنال

یک دستگاه TRFIA معمولاً دارای اجزای زیر است:

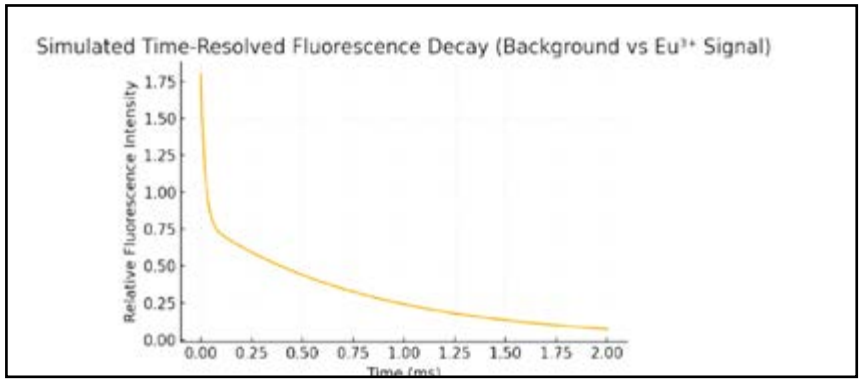
1) منبع نوری با طول‌موج تحریک مناسب
۲) سیستم اپتیکی برای جهت‌دهی نور
۳) مجموعه فیلترهای Excitation و Emission
۴) سنسور CMOS یا PMT با حساسیت بالا
۵) بخش کنترل زمان‌بندی (Timing Controller) برای تعیین Delay و Gate

رفتار سینتیکی سیگنال و حذف نویز پس‌زمینه

در این بخش، رفتار زمانی سیگنال Eu^{3+} بررسی می‌شود. پس از تابش پالس نور، ماتریکس نیتروسلولز، هموگلوبین،

۶) سیستم پردازش دیجیتال برای تبدیل سیگنال خام به نتیجه کمی.

مرحله تحریک با یک پالس بسیار کوتاه انجام می‌شود. دستگاه با دقت در حد میکروثانیه Delay را اعمال کرده و سپس در بازه Gate تعریف شده، چندین اندازه‌گیری انجام می‌دهد. میانگین‌گیری، فیلتر دیجیتال، حذف نویز و اصلاح حساسیت سنسور در این مرحله صورت می‌گیرد. سپس دستگاه با استفاده از منحنی استاندارد 4PL یا 5PL غلظت آنالیت را محاسبه می‌کند. این منحنی‌ها قادراست محدوده دینامیک گسترده TRFIA را به‌خوبی مدل‌سازی کند[٦].



نمودار ۱) شبیه سازی افت شدت فلورسانس ماتریکس در واحد زمان (میلی ثانیه)

مزیت‌های تحلیلی TRFIA

TRFIA در مقایسه با سایر روش‌های فلورسانس یا ایمنوکروماتوگرافی، مزیت‌های متعددی دارد. یکی از مهم‌ترین مزیت‌ها افزایش شدید نسبت سیگنال به نویز است، زیرا تقریبا کل پس‌زمینه زمانی حذف می‌شود. مزیت دیگر طول‌عمر سیگنال لانتانیدی است که اجازه خوانش‌های متعدد و میانگین‌گیری را بدون تخریب سیگنال می‌دهد. دامنه خطی این روش بسیار گسترده‌تر است و معمولاً چندین Log را پوشش می‌دهد. همچنین پایداری برچسب‌های لانتانیدی در شرایط نوری و شیمیایی باعث می‌شود منحنی استاندارد در طول زمان ثابت باقی بماند. از نظر قابلیت Multiplex، وجود سه یون با طول‌موج‌های انتشار کاملاً متمایز و Peak های باریک در TRFIA اجازه اندازه‌گیری همزمان چند مارکر را می‌دهد. این ویژگی در بسیاری از تست‌های عفونی و هورمونی اهمیت دارد[٧].

تحلیل عملکرد TRFIA در مقایسه با فلورسانس معمولی

در روش ایمنواسی فلورسانس معمولی، اساس اندازه‌گیری بر تحریک فوری رنگ‌زاهای آلی و ثبت هم‌زمان انتشار نور انجام می‌شود. این رنگ‌زاها معمولاً طول عمر تابشی بسیار کوتاه در حد نانوثانیه دارد؛ درنتیجه هر سیگنالی که در این بازه زمانی رخ می‌دهد، چه ناشی از آنالیت باشد و چه ناشی از پس‌زمینه، اتوفلورسانس و پراکندگی ـ هم‌زمان وارد پنجره اندازه‌گیری می‌شود. از آنجا که اکثر ماتریس‌های زیستی شامل ترکیبات فلورسانس‌دار ذاتی است و اتوفلورسانس آنها دقیقا در همین بازه زمانی (ns) رخ می‌دهد، نسبت سیگنال به نویز در فلورسانس معمولی محدود است و حساسیت این روش تحت تأثیر جدی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، رنگ‌زاهای آلی دچار فوتوبلیچینگ می‌شود، سیگنال آنها در طول زمان کاهش می‌یابد و به دلیل هم‌پوشانی طیفی قابل توجه، امکان مولتی‌پلکس‌کردن در تعداد کانال بالا وجود ندارد. همین ویژگی‌ها باعث می‌شود که فلورسانس معمولی در غلظت‌های پایین بیومارکرها، به‌ویژه در آنالیت‌های زیر حد نانوگرم بر میلی‌لیتر، با محدودیت‌های واضح مواجه باشد[٨].

در مقابل، روش TRFIA با بهره‌گیری از فیزیک متفاوت تابش نور در یون‌های لانتانیدی، اساسا پنجره زمانی اندازه‌گیری را از حوزه نانوثانیه به میکروثانیه و میلی‌ثانیه منتقل می‌کند. طول عمر تابشی یون‌هایی مانند Eu^{3+}، Tb^{3+}یاSm^{3+} در حد صدها میکروثانیه تا چند میلی‌ثانیه است. ابزار فلورسانس در این روش، ابتدا نمونه را با پالس UV تحریک می‌کند، سپس برای مدتی کوتاه (معمولاً ۵۰ تا ۲۰۰ میکروثانیه) صبر می‌کند تا تمام سیگنال‌های کوتاه‌عمر شامل اتوفلورسانس سرم، پراکندگی نور (Rayleigh/ Raman Scattering)، نویز الکترونیک اولیه و هر نوع فلورسانس ناخواسته کاملاً خاموش شود. تنها پس از خاموش‌شدن کامل این نویزها، پنجره اندازه‌گیری باز می‌شود و سیگنال لانتانید که همچنان در حال تابش است، با حساسیت بسیار بالا ثبت می‌شود. به‌دلیل همین جداسازی زمانی، نسبت سیگنال به نویز در TRFIA چندین مرتبه بزرگ‌تر از فلورسانس معمولی است و در عمل حد تشخیص (LOD) از مقادیر ng/mL به مقادیر fg/mL تا pg/mL کاهش می‌یابد[٩].

ویژگی	فلورسانس معمولی	TRFIA
نویز زمینه	بالا(Autofluorescence)	بسیار پایین
عمر فلورسانس	ns	ms
LOD	ng/mL	pg/mL
دامنه خطی	محدود	بسیار وسیع
پایداری سیگنال	متوسط؛ فوتوبلیچ بالا	بسیار پایدار
Multiplex	محدود	عالی(همزمان Eu, Tb, Sm)
کاربرد در hs-assays	نه	بله

جدول شماره۲- مقایسه ویژگی‌های TRFIA با فلورسانس معمولی

یکی دیگر از مزایای مهم TRFIA، شکل خاص طیف انتشار لانتانیدهاست. پیک‌های گسیلی آنها بسیار باریک و بدون دم طیفی بوده، درحالی‌که رنگ‌زاهای آلی معمولاً دارای طیف پهن و همپوشانی قابل توجه است. همین ویژگی باعث می‌شود که TRFIA امکان مولتی‌پلکس واقعی با چندین کانال مجزا را فراهم کند، بدون اینکه تداخل طیفی یا cross-talk رخ دهد[۱۰]. درنتیجه در تست‌های چندپارامتری، این روش از ثبات و دقت بالاتری برخوردار است. از سوی دیگر، لانتانیدها تقریبا دچار فوتوبلیچینگ نمی‌شود و سیگنال آنها حتی در صورت اندازه‌گیری‌های پی‌درپی، افت قابل توجهی ندارد؛ موضوعی که قابلیت تکرار (reproducibility) و پایداری بین‌روزی و بین‌دستگاهی را به شکل محسوسی افزایش می‌دهد.

از نظر آماری و تحلیلی نیز TRFIA به‌دلیل گستردگی بازه خطی (Dynamic Range) و شیب یکنواخت منحنی استاندارد، معمولاً دارای خطای CV کمتر از ۴ درصد و انحراف بایاس بسیار محدود در مقایسه روش‌ها (Bland–Altman) است. منحنی‌های ٤PL و5PL در این روش پایدارتر، قابل بازتولیدتر و کمتر وابسته به تغییرات محیطی هستند. در مقابل، فلورسانس معمولی به علت نویز زیاد و حساسیت کمتر، نیازمند کالیبراسیون مکرر است و منحنی استاندارد آن اغلب drift دارد، به‌خصوص اگر مهارکننده فوتوبلیچینگ وجود نداشته باشد[۱۱].

با وجود مزایای بالا، TRFIA نیازمند تجهیزات تخصصی با قابلیت time-gating و همچنین لیگاندهای شلاته‌کننده خاص برای افزایش بازده تحریک و تابش لانتانید است.

همین عوامل موجب افزایش هزینه و پیچیدگی طراحی کیت می‌شوند. اما از منظر عملکرد، به‌ویژه در تشخیص بیومارکرهای با غلظت بسیار پایین مانند cTnI با حساسیت بالا، IL-6، PCT، مارکرهای التهابی و برخی نشانگرهای ویروسی، TRFIA برتری قاطع دارد و محدودیت‌های ذاتی فلورسانس معمولی را با حذف کامل نویز زمانی و طیفی برطرف می‌کند. به همین دلیل، این روش در نسل جدید POCTهای با حساسیت بالا و نیز در پلتفرم‌های تحقیقاتی پیشرفته جایگاه اصلی پیدا کرده است[۱۲].

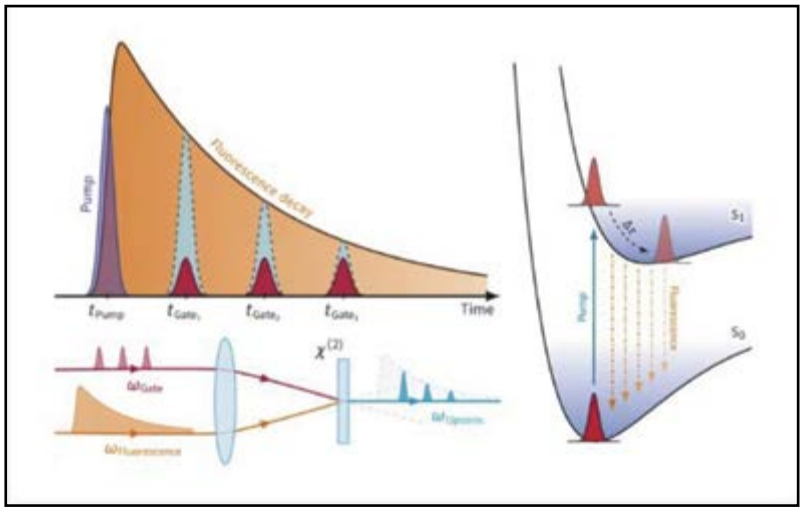
کاربردهای بالینی

TRFIA در موارد متعدد به‌کار می‌رود. برای مثال، در تست hs-CRP توانایی اندازه‌گیری غلظت‌های بسیار پایین CRP در حد pg/mL برای ارزیابی ریسک قلبی-عروقی حیاتی است. در تست hs-cTnI، تشخیص زودهنگام حمله قلبی تنها با روش‌هایی امکان‌پذیر است که حساسیت فوق‌العاده بالا دارند. روش TRFIA همچنین در تست‌های IL-6، PCT، HCG، TSH، BNP و بسیاری از پلتفرم‌های POCT عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل زیر شبیه‌سازی افت شدت فلورسانس را نشان می‌دهد که در آن فلورسانس سریع ماتریکس (Background) در ۰٫۰۵ میلی‌ثانیه خاموش می‌شود، اما سیگنال Eu^{3+} تا بیش از ۲ میلی‌ثانیه باقی می‌ماند[۱۳].

نتیجه‌گیری

TRFIA یک فناوری کلیدی در نسل جدید تشخیص آزمایشگاهی است. این روش با بهره‌گیری از یون‌های لانتانیدی دارای طول عمر طولانی، امکان حذف کامل نویز زمینه و افزایش حساسیت تا چندین مرتبه بزرگی را فراهم می‌کند. ویژگی‌های منحصر به‌فرد Tb^{3+}، Eu^{3+} و Sm^{3+} باعث شده‌اند TRFIA در بسیاری از سنجش‌های high-sensitivity و سیستم‌های POCT به استاندارد تبدیل شود. گستره کاربردهای این روش از ایمونولوژی روتین تا تشخیص زودهنگام بیماری‌های قلبی، عفونی و هورمونی در حال توسعه است. در این بررسی پلتفرم TRFIA مبتنی بر یون‌های لانتانیدی ارزیابی شد که حساسیت و اختصاصیت بالایی در تستهای تشخیصی از خود نشان می دهد. استفاده از فلوروفورهای Eu^{3+} و



اساس اندازه گیری فلورسانس به روش
TIME RESOLVED

Tb^{3+} به دلیل طول‌عمر فلورسانسی بالا (در حد میلی‌ثانیه) امکان تفکیک مؤثر سیگنال اختصاصی از نویز پس‌زمینه را فراهم می نماید. این ویژگی اجازه می دهد تا مرحله خوانش تأخیری (Time-Gated Detection) به‌طور مؤثر فلورسانس ذاتی نیتروسلولز و محیط های بیولوژیک را حذف کند. نتایج مختلف نشان می دهد که این روش برای اغلب مارکرها مناسب است، در مورد برخی تستها استفاده از منحنی های کالیبراسیونی با مدل 5PL نتایج دقیق‌تری ارائه خواهد داد که ناشی از رفتار غیرمتقارن سیگنال در غلظت‌های پایین است. ضرایب رگرسیون ($R^2 > 0.996$) نشان‌دهنده دقت بالای روش و تکرارپذیری عالی است. از نظر تشخیصی، دستیابی به LOD در محدوده پیکوگرم، TRFIA را به گزینه‌ای قدرتمند در محیط های Point-of-Care تبدیل می‌کند، جایی که سرعت و حساسیت نقش تعیین‌کننده‌ای دارند. همچنین قابلیت Multiplex با استفاده از سه لانتانید مختلف Sm^{3+}، Tb^{3+}، Eu^{3+} زمینه را برای توسعه نسل آینده تست‌های چندگانه فراهم می‌سازد. نتایج نشان می دهد TRFIA به‌واسطه ویژگی‌های اپتیکی منحصربه‌فرد و دقت کمی بالا، می‌تواند استاندارد جدیدی برای تشخیص سریع آنتی‌ژن‌های ویروسی، به‌ویژه در موقعیت‌های بالینی با محدودیت زمانی، ایجاد کند.

منابع:

1- Chen X, Hong J, Zhao H, Xiang Z, Qin Y, Zhou X, et al. Establishment and Clinical Application of a Highly Sensitive Time-Resolved Fluorescence Immunoassay for Tumor-Associated Trypsinogen-2. J Fluoresc. 2022;32(4):1501–7.

2-Cheng Y, Xie B, Liang Y, Liu X, Chen H, Li J, et al. A monoclonal antibody-based time-resolved fluorescence microsphere lateral flow immunoassay for paclobutrazol detection. Curr Res Food Sci. 2022; 5:1395–402.

3-Gao S, Yu Y, Kao S, Zheng T, Qin Y, Zhou X, et al. Establishment of a high-sensitivity time-resolved fluorescence immunoassay with PLA2R-IgG1 antibody and its clinical application in idiopathic membranous nephropathy prognosis. Clin Chim Acta. 2025; 565:120019.

4-Huang Z, Wen J, Ma G, Liu Y, Tan H. Time-resolved fluorescence immunoassay based on glucose oxidase-encapsulated metal-organic framework for amplified detection of foodborne pathogen. Anal Chim Acta. 2024; 1287:342111.

5-Huertas-Lopez A, Contreras Rojo M, Sukhumavasi W, Martinez-Subiela S, Alvarez-Garcia G, Lopez-Urena NM, et al. Comparative performance of five recombinant and chimeric antigens in a time-resolved fluorescence immunoassay for detection of Toxoplasma gondii infection in cats. Vet Parasitol. 2022; 304:109703.

6-Li L, Chen C, Liang H, Dong W, Leontiev VN, Voytov IV. Development of a time-resolved fluorescence immunoassay kit for detecting canine coronavirus and parvovirus through double labeling. Virol J. 2024;21(1):64.

7-Liu C, Chen C, Lai H, Liang H, Zhong S, Guo G, et al. A New Method for Early Screening of Gastric Cancer (G17 and CA724 Dual-Labeled Time-Resolved Fluorescence Immunoassay). Comput Math Methods Med. 2022; 2022:1704948.

8-McLean GR, Zhang Y, Ndoyi R, Martin A, Winer J. Rapid Quantification of SARS-CoV-2 Neutralising Antibodies Using Time-Resolved Fluorescence Immunoassay. Vaccines (Basel). 2022;10(12).

9-Xu Z, Zhou H, Li L, Chen Z, Zhang X, Feng Y, et al. Immunoassay System Based on the Technology of Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer. Sensors (Basel). 2024;24(5).

10-Zhang Z, Zhang J, Dai S, Xu H. A new method for screening acute/chronic lymphocytic leukemia: dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. BMC Biotechnol. 2022;22(1):27.

11- Li L, Lai H, Liang H, Guo G, Chen C, Jia Q. Development of a dual-label time-resolved fluorescence immunoassay platform for simultaneous detection of canine distemper virus and parvovirus. J Virol Methods. 2025; 340:115302.

12-Shen A, Xu X, Xu L, Nie X, Ai J, Chen W. Clinical utility of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) and a novel PCR-based point-of-care testing (POCT) for pathogen detection in pulmonary infections: a retrospective study. BMC Infect Dis. 2025.

13.Wozniak-Kosek A, Drazek L. Monitoring and optimization of POCT devices in a multi-specialty hospital in Poland: usage trends, quality assurance, and clinical impact (2017-2024). Acta Biochim Pol. 2025;72:14299.