آزمایشگاه مرجع دانشگاهی قم

سال ۱۳۹۳

ELISA

امروزه آزمایشهای سرولوژی بالینی یکی از روش های سریع و آسان در تشخیص بیماریها می باشد. این آزمایشها بر اساس اتصال آنتی بادی اختصاصی به آنتی ژن مربوطه صورت می گیرد .

انواع واکنش های Ag_Ab :

۱- واکنش ها گروه اول : واکنش های مربوط به اتصال یک Ag به یک Ab است.

۲- واکنش ها گروه دوم : واکنش های مربوط به اتصال چند Ag به چند Ab و ایجاد شبکه قابل رویت با چشم است .

۳- واکنش های گروه سوم : مربوط به واکنش Ag و Ab در بدن است مثل PPD

آزمون های سرولوژیک

۱- بررسی واکنش های گروه اول : این آزمون ها دارای حساسیت بالا هستند که شامل دونوع تکنیک Immuno Assay مثل IFA ، RIA ، Elisa و تکنیک Immunoblotting میباشد. (واکنش Ag و Ab قابل رویت نیست)

۲- بررسی واکنش های گروه دوم : این آزمون ها دارای حساسیت کم هستند و شامل پرسیپیتاسیون ، آگلوتیناسیون ، فلوکولاسیون و نوترالیزاسیون می باشند. (واکنش Ag و Ab با چشم دیده می شود)

روش رادیو ایمنواسی

در این روش ما به دنبال کمپلکس Ag-Ab با استفاده از مواد رادیواکتیو هستیم . در اینجا اگر آنتی ژن توسط رادیو ایزوتوپ نشاندار شود روش RIA گفته می شود و اگر آنتی بادی توسط رادیو ایزوتوپ نشاندار شود روش IRMA (Immunoradiometric Assay) نامیده می شود .

تکنولوژی ELISA :

در این روش بجای رادیو ایزوتوپ برای نشاندار کردن از یک آنزیم استفاده می شود . چنانچه آنتی ژن نشاندار شود EIA (Enzyme Immunoassay) و اگر آنتی بادی نشاندار شود IEMA (Immunoenzymometric Assay) نامیده می شود ELISA نامی است عمومی برای اینگونه روشها ، که به صورت رایج استفاده می شود .

واژه الایزا ELISA ، اختصاری از کلمات Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay است.

مزایای روش IEMA نسبت به EIA

نشاندار سازی آنتی‌بادی بجای آنتی‌ژن در روش IEMA مزایای متدولوژیک زیادی را به ارمغان می‌آورد، که برخی از مهمترین آنها عبارتست از:

۱- سهولت نشاندارسازی:

با توجه به اینکه درروش EIA مولکول‌های آنتی‌ژن اغلب از جنس هاپتن بوده که مولکول‌هایی با جرم مولکولی کمتر از هزار دالتون می‌باشند، لذا محدودیت گروه‌های عاملی در مولکول‌های مورد نظر، نشاندارسازی را محدود ساخته و اغلب نیاز به واکنش‌های تخصصی و پیچیده دارد. اما در روش IEMA چون نشاندارسازی بر روی مولکول بزرگ آنتی‌بادی صورت می‌گیرد که دارای انواع گروه‌های عملکردی است؛ لذا نشاندارسازی آن براحتی با روش‌های ساده و عمومی امکان‌پذیر است.

۲- افزایش ویژگی:

در روش EIA با توجه به اینکه از یک آنتی‌بادی برای شناسایی منفرد استفاده شده، درحالیکه در روش IEMA استفاده از دو آنتی‌بادی امکان شناسایی مضاعف را میسر می‌سازد، از این رو ویژگی IEMA نسبت به EIA بیشتر است.

۳- افزایش حساسیت:

باتوجه به اینکه در روش IEMA به ازاء تک تک آنالیت‌ها، کمپلکس نشاندار وجود داشته و همچنین جایگاه‌های نشاندارسازی بالقوه آن بیشتر است؛ لذا هم بدلیل رابطه یک به یک بین آنالیت و کمپلکس نشاندار و هم بیشتر بودن جایگاه‌های بالقوه نشاندارسازی، حساسیت روش IEMA نسبت به EIA بیشتر است.

۴- کاهش زمان انکوباسیون:

با نظر به اینکه واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی یک واکنش تعادلی دو طرفه بوده که طبق اصل لوشاتلیه با افزودن هر یک از مواد در یکی از طرفین معادله، تعادل به سمت طرف دیگر پیشرفت می‌نماید، از این رو بدلیل اینکه در روش IEMA غالبا رقابت وجود نداشته و برای حصول اطمینان ازکفایت آنتی‌بادی‌ها به منظور تشکیل کمپلکس در غلظت بالای آنالیت، همواره مقادیر زیادی از آنتی‌بادی بکار می‌رود؛ در نتیجه غلظت بالای مواد اولیه، سرعت به تعادل رسیدن یا زمان انکوباسیون را کاهش می‌دهد.

۵- افزایش محدوده عملکرد (Work of range):

محدوده عملکرد که محدوده قابل اندازه گیری برای آنالیت بوده و فاصله بین اولین و آخرین نقطه استاندارد را شامل می‌شود، در روش IEMA حدود صد برابر بیشتر از EIA است.

۶- کاهش اثر هوک (Hook Effect):

اثر هوک که عبارتست از کسب نتایج منفی کاذب در غلظت بالای آنالیت می‌باشد، در واکنش‌های ایمونولوژی اتفاق افتاده و معادل پدیده پروزون در واکنش‌های سرولوژی است. در این پدیده غلظت آنالیت که می‌تواند آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی باشد، از

بالاترین استاندارد نیز بسیار بالاتر بوده و لذا علیرغم زیاد بودن آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد آزمایش در سرم، نتیجه منفی کاذب حاصل می گردد.

بدلیل نتایج منحرف کننده و نامطلوبی که اثر هوک می‌تواند بر آزمون‌های ایمنی سنجی باقی گذارد، تحقیقات زیادی در زمینه شناخت این پدیده و چگونگی خنثی‌سازی آن انجام شده است؛ که یکی از آنها با توجه به اینکه پدیده هوک در روش EIA بدلیل تک مرحله‌ای و مستقیم بودن روش آزمایش، شایع‌تر از روش IEMA می‌باشد؛ عدم استفاده از این چنین کیت‌هایی می‌باشد. در شرایطی که ناچار به استفاده از چنین کیت‌ها باشیم، برای اطمینان از صحت نتیجه، اولا از کیت‌هایی استفاده شود که محدوده شروع پدیده هوک در آن قید شده باشد و ثانیا بایستی هر جواب منفی را با رقت‌های بالاتری از همان سرم تکرار نمود.

البته باید توجه داشت که اگرچه پدیده هوک غالبا در اثر فزونی آنالیت اتفاق می‌افتد، ولی تحقیقات انجام شده توسط محققان ثابت نموده که منحصرا بالا بودن میزان آنالیت تنها عاملی نیست که در بروز این پدیده دخالت داشته و لذا عوامل دیگری نیز نظیر توزیع و پراکندگی اپی‌توپ‌ها، وجود اپی‌توپ‌های مشابه و یا استفاده از دو آنتی‌بادی مونوکلونال که بر ضد دو اپی‌توپ مختلف تهیه شده‌اند، می‌تواند در بروز پدیده هوک موثر باشد؛ که نمونه آن نیز ایجاد پدیده هوک در روش‌های IEMA علیرغم دو مرحله‌ای بودن آنها می‌باشد؛ که علت آن در نتیجه استفاده از دو آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد دو اپی‌توپ مختلف می‌باشد.

ELISA یک تست سریع (Rapid) برای شناسایی و اندازه گیری آنتی بادی یا آنتی ژن در برابر ویروس ها وباکتری ها و یا مواد دیگراست .در تکنیک الایزا ، فاز جامد از یک پلیت ۹۶ خانه جنس پلی استرن یا مواد دیگر تشکیل شده است .عملکرد فاز جامد ثابت کردن آنتی ژن یا آنتی بادی در نمونه است که با اتصال به فاز جامد اتفاق می افتد.

فوائد روش ELISA نسبت به روش RIA

با تقویت فعالیت آنزیمی حساسیت سنجش قابل افزایش است

معرف ها دارای زمان نگهداری طولانی تری می باشند

سنجشهای همزمان چندگانه قابل انجام است

طیف وسیعی از انواع سنجشها می تواند صورت گیرد

دستگاهها و ابزار لازم بطور گسترده ای در دسترس است

خطر اشعه در جریان نشاندار کردن ، انجام آزمایش و دفع پسماند های آنها وجود ندارد

روشها ساده و سریع است و با روشهای اتوماتیک قابل انجام است

معایب روش ELISA نسبت به روش RIA

اندازه گیری فعالیت آنزیم می تواند به مراتب از اندازه گیری فعالیت برخی رادیو ایزوتوپ ها پیچیده تر باشد

فعالیت آنزیم می تواند توسط عواملی در نمونه تحت تاثیر قرار گیرد

طبقه بندی الایزا :

تکنیک الایزا به چند روش تقسیم می شود :

۱- Direct Elisa (الایزای مستقیم)

۲- Indirect Elisa (الایزای غیر مستقیم)

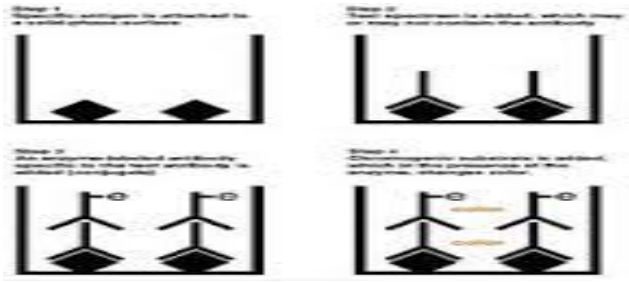
۳- Sandwich Elisa (الایزای ساندویچی)

۴-Competitive Elisa (الایزای رقابتی)

۱) الایزای مستقیم

در این روش آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه ای که باید تشخیص داده شود به طور مستقیم بر سطح فاز جامد کوت می‌شود و سپس آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن مکمل آن که نشاندار شده است به سیستم اضافه می‌شود. در صورت وجود آنتی‌ژن یا

آنتی‌بادی مورد نظر در نمونه، سیگنال مناسب ایجاد می‌شود. این روش مشابه ایمونوفلورسانس مستقیم است اما کاربرد چندانی در کیت‌های تشخیصی ندارد و بیشتر در کارهای تحقیقاتی استفاده می‌شود.



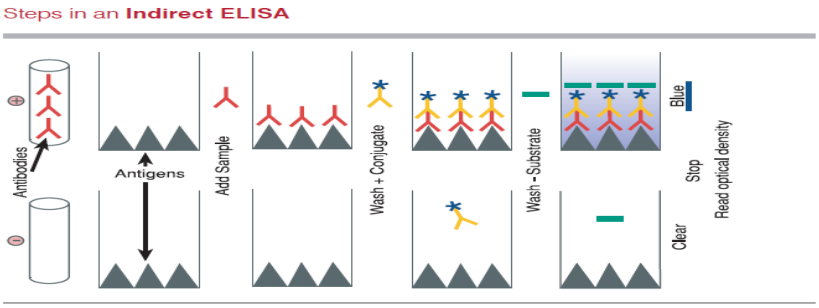
۲)الایزای غیرمستقیم

این روش برای تعیین آنتی‌بادی اختصاصی و یا تیتراسیون آنتی‌بادی در نمونه‌های سرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس آزمایش بدین نحو است که معمولا سرم رقیق شده به آنتی‌ژن‌های کوت شده در فاز جامد (میکرو ول یا چاهک) اضافه می‌شود. آنتی‌ژن کوت شده آنتی‌ژن اختصاصی مربوط به آنتی‌بادی است که قرار است در نمونه ردیابی شود.

پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو آنتی‌هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می‌شود .بر حسب اینکه چه کلاسی از آنتی‌بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع آنتی ایمنوگلوبولین مورد استفاده نیز متفاوت است مثلا برای ردیابی آنتی‌بادی کلاس IgG از آنتی‌هیومنIgG و برای ردیابی کلاس IgA از آنتی‌هیومن IgA استفاده می‌شود.

اختصاصیت سنجش مستقیما توسط آنتی‌ژن کوت شده در فاز جامد تعیین می‌شود که ممکن است کاملا خالص و اختصاصی باشد و یا نسبتا خام و غیراختصاصی باشد. سرم حاوی آنتی‌بادی اختصاصی می‌تواند در یک بافر برای جلوگیری از جذب غیراختصاصی پروتئین‌ها و جلوگیری از اشغال نقاط اتصال آنتی‌ژن رقیق شود. به چنین بافری محلول رقیق‌کننده نمونه (sample diluent) گفته می‌شود. حساسیت و ویژگی چنین روشهایی می‌تواند با بکارگیری روش Antibody capture با کاهش تداخل اثر آنتی‌بادی غیراختصاصی بهتر شود.

بهترین مثالها در مورد این روش تعیین آنتی‌بادی بر علیه توکسوپلاسما، روبلا، ویروس سیتومگال و هلیکوباکترپیلوری از کلاسهای IgM و IgA و IgG در سرم می‌باشد. البته امروزه برای تعیین IgM بر علیه این عوامل عموما از روش capture استفاده می‌شود در روش capture آنتی‌بادی‌های موجود در نمونه از کلاس IgM به روی چاهکهای کد شده با آنتی‌هیومن IgM جذب شده و سپس برای تشخیص، از آنتی‌ژن اختصاصی مربوطه که آنزیم نشاندار شده است و یا آنتی‌بادی نشاندار ضد آن به صورت مزدوج استفاده می‌شود.

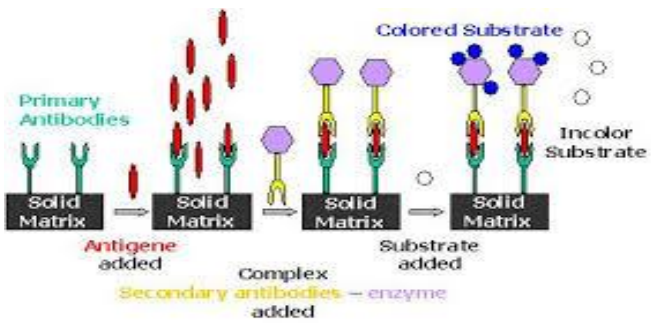


۳) الایزای ساندویچی

روش ساندویچ الایزا خود به ۲ دسته تقسیم می‌شود:

الف) روش Ag capture یا Ab sandwich:

در این روش یک آنتی‌ژن در بین ۲ آنتی بادی اختصاصی قرار می‌گیرد این روش شایعترین روش الایزا محسوب می‌شود در این روش از یک آنتی‌بادی برای به دام انداختن آنتی‌ژن بر روی چاهکهای الایزا استفاده می‌شود و آنتی‌بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده است به عنوان شناساگر عمل می‌کند. قابل ذکر است که در این روش آنتی‌ژن باید حداقل دارای ۲ ناحیه‌ی آنتی‌ژنیک متفاوت باشد تا قادر به اتصال هر ۲ آنتی‌بادی باشد مثالهای بارز این روش اندازه‌گیری PSA ، FSH، LH ، TSH



، HCG و... است.

ب) روش Antibody capture

a- Ag sandwich or direct Ab capture :

این روش برای تعیین سنجش آنتی‌بادی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدین صورت که از یک آنتی‌ژن کوت شده بر روی فاز جامد برای به دام انداختن آنتی‌بادی اختصاصی آن استفاده می‌شود و همان آنتی‌بادی از طریق بازوی دیگر خود (Fab) پذیرای همان آنتی‌ژن اما به صورت نشاندار می‌باشد در نتیجه آنتی‌بادی اختصاصی در بین ۲ آنتی ژن ساندویچ می‌گردد. در این روش آنتی‌بادی توتال از هر کلاس ایمونوگلوبولین میسر است و یکی از اختصاصی‌ترین و حساس‌ترین روشها برای تشخیص آنتی‌بادی در نمونه است مثال بارز این روش کیت اندازه‌گیری آنتی‌بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس، ترپونما پالیدوم و HBs Ab می‌باشد.

b- Indirect Ag Sandwich or Indirect Ab capture:

در این روش پس از به دام انداختن آنتی‌بادی توسط آنتی‌هیومن گلوبولین کوت شده در کف چاهکها با اضافه کردن آنتی‌ژن اختصاصی و تشکیل کمپلکس از یک آنتی‌بادی اختصاصی نشاندار بر علیه آنتی‌ژن به عنوان سیستم شناساگر استفاده می‌شود.

٤) الایزای رقابتی یا مهاری

در روشهای رقابتی اساس سنجش بر رقابت دو آنتی‌ژن یا دو آنتی‌بادی (که یکی از آن دو نشاندار است) برای اتصال به لیگاند با مقدار محدود استوار است. اگر هر دو آنالیت نشاندار و غیرنشاندار با هم به سیستم اضافه شوند روش را رقابتی می‌نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهاری یا بلوکینگ می‌نامند. در روش مهاری ممکن است در بین ۲ مرحله و قبل از اضافه نمودن آنالیت بعدی شستشو انجام شود یا انجام نشود مثال بارز روشهای رقابتی و مهارتی سنجش T_3 و T_4 می‌باشد. انواع روشهای رقابتی عبارتند از:

الف) روش رقابتی یا مهاری برای آنتی‌ژن:

اساس این روش بر رقابت بین آنتی‌ژن نشاندار و آنتی‌ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی‌بادی اختصاصی کوت شده در چاهک استوار است. در این روش مقدار آنتی‌بادی کوت شده باید محدود باشد و ملکول سیگنال دهنده همان آنتی‌ژن نشاندار است، اساس RIA و EIA کلاسیک به همین روش استوار است.

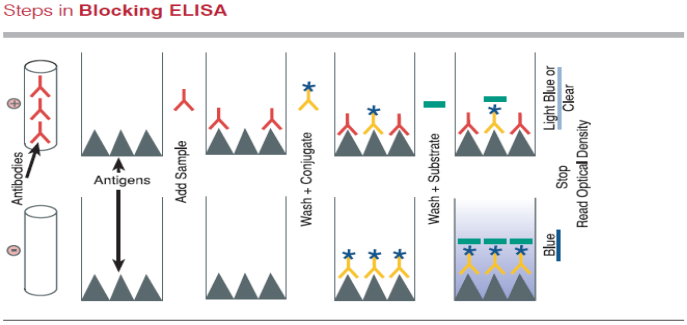
در این روش منحنی پاسخ – دوز به صورت معکوس خواهد بود، بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور مقادیر زیادی از آنالیت غیرنشاتدار موجود در نمونه به مقدار کمتری به آنتی‌بادی متصل می‌شود و در نتیجه سیگنال هم بوجود خواهد آمد. محدوده تعیین آنالیت با این روش ممکن است بوسیله استفاده از مولکول نشاندار با فعالیت اختصاصی زیاد تقویت شود اما حداقل مقدار قابل تشخیص (کمترین مقدار از آنالیت که قابل تشخیص خواهد بود) توسط تمایل آنتی‌بادی مورد استفاده تعیین می‌شود، با این وجود غلظتهای خیلی کم از هاپتن‌ها عموما توسط همین روش قابل تعیین‌اند و حساس‌ترین روشی است که می‌تواند مقادیر خیلی کم را هم تشخیص دهد.

در برخی از موارد نشاندار کردن روی خصوصیات هاپتن اثر می‌گذارد در نتیجه در روش رقابتی برای تعیین آنتی‌ژن از یک آنتی‌بادی نشاندار استفاده می‌شود، در این نوع از سنجشها این مطلب ضروری است که فاز جامد توسط آنتی‌ژن با مقدار کم و ثابت پوشیده می‌شود، در این روش آنالیت موجود در نمونه با آنالیت کوت شده در چاهک برای اتصال به آنتی‌بادی نشاندار

رقابت می‌کند. در اینجا هم منحنی استاندار معکوس است، از این روش بیشتر برای سنجش به روش کمی لومینسانس استفاده می‌شود.

ب) روش رقابتی برای آنتی‌بادی:

دراین روش رقابت بین دو آنتی‌بادی یکی در نمونه به صورت غیرنشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برای اتصال به یک آنتی‌ژن کوت شده در چاهک صورت می‌پذیرد، بدیهی است که هر چه مقدار آنتی‌بادی نمونه بیشتر باشد آنتی‌بادی نشاندار کمتری به چاهکها متصل شده و سیگنال نیز کمتر خواهد بود و در نتیجه منحنی استاندارد نیز معکوس می‌باشد. شاخص‌ترین مثال این روش اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد HBc است.



اجزاء الایزا

در متد الایزا عناصری در کنار یکدیگر قرار می گیرند که واکنش این عناصر با یکدیگر در نهایت منجر به تشخیص و اندازه گیری بیومولکول مورد نظر می گردد در ادامه به معرفی این عناصر خواهیم پرداخت.

۱. میکروپلیت های الایزا :

میکروپلیت های الایزا عمدتا شامل ۹۶ میکروول (microwell) می باشند که می تواند در جنس ، رنگ و خواص فیزیک و شیمیایی تنوع زیادی داشته باشند برای مثال جنس این میکروپلیت ها می تواند پلی استیرن ، پلی پروپیلن باشند . رنگ پلیتها نیز بسته به متد الایزا میتواند شفاف ، سیاه و یا سفید باشد.

از خواص فیزیکوشیمیایی این میکروپلیتها می توان به ظرفیت اتصال آنها اشاره کرد تقسیم بندی در این مبحث عمدتا به سه دسته پلیتهای با ظرفیت اتصال پایین ، پلیتهای باظرفیت اتصال متوسط ، و پلیت های با ظرفیت اتصال بالا تقسیم بندی می گردند از دیگر خواص فیزیکوشیمیایی میکروپلیت ها می توان به شکل ظاهری این میکروول ها اشاره کرد که می توانند ته صاف (flat buttom) ته گرد (round buttom) و v شکل (V-shaped) باشند. چنین پلیتهایی به پلیتهای خام (uncoated) معروف هستند. میکروپلیتها در متد الایزا درواقع نقش یک فاز یا محیط جداکننده را بازی می کنند. در متد الایزا بسته به متد بکار رفته بیومولکهای خاصی را در سطح داخلی این میکروول های کوت (coating) می کنند این بیومولکولها می توانندشامل آنتی ژنها ، آنتی بادی ها ، هاپتنهای متصل به پروتیین ، رسپتورها و پروتئین ها باشند.

کوتینگ این بیومولکولها به سطوح داخلی میکروولهای به دو صورت عمده انجام می شود که شامل کوتینگ به کمک اتصالات غیرکووالانسی و کوتینگ به کمک اتصالات کووالانسی.

از مزیتهای کوتینگ به کمک اتصالات کووالانسی می توان به پایین بودن مصرف بیومولکول کوت شونده ، عدم تغییرساختار فضایی بیومولکول کوت شونده ، جهت یابی فضایی درست بیومولکولها ، محکم بودن اتصالات به پلیت و بالتبع پایداری بسیار بالای میکروپلیت های کوت شده اشاره کرد .

۲. استانداردها :

در الایزا معمولا از چندین استاندارد استفاده می شود و این از آنجا ناشی می شود که رفتار برهم کنش شیمیایی آنتی بادی آنتی ژن اگر چه وابسته به غلظت است همانند دیگر واکنش های شیمیایی اما دقیقا همانند یک واکنش شیمیایی ساده از یک معادله خطی تبعیت نمی کند که بتوان با داشتن دو استاندارد به معادله آن دست یافت در واقع رفتار برهم کنش اجزا الایزا در یک معادله درجه ۲ و بالاتر مطابقت می کند. درچنین حالتی هرچه تعداد نقاط بیشتر باشد شکل درست تری از منحنی استاندارد خواهیم داشت. در الایزا از عمدتا ۶ استاندارد استفاده می گردد تا بتوان مقادیر پایین ، نرمال و بالا را مورد سنجش قرار داد .

ماتریکسی که در آن استاندارد ساخته می شود می بایست تا حد امکان به سرم انسان شبیه باشد در بعضی موارد که ساخت ماتریکس استاندارد به دلایل مختلف ازجمله عدم امکان حذف آنالیت مورد جستجودر سرم ، وجود مداخله گرهای شناخته شده و شناخته نشده ، پرزحمت و پر هزینه بودن ، استانداردها در ماتریکس های مصنوعی ساخته می شوند و از آنجایی که به ماتریکس سرم انسانی شباهت کامل ندارد می تواند بر میزان یکنواختی ، حلالیت ، فعالیت آنتی ژنیک ، ساختار کامل فضایی بیومولکول مورد مطالعه اثر بگذارد که می بایست در انتخاب یک ماتریکس مناسب برای استاندارد ها این موارد مد نظر باشد.

معمولا جهت ساخت استاندارد از بیومولکولهای بسیار خالص آن که بصورت تجاری در دسترس هستند استفاده می گردد . اگرچه برای بعضی از بیومولکولها استانداردهای بین المللی وجود دارد اما به میزان کافی دردسترس نیستند و به میزان بسیار محدود تولید می شوند و در مورد بعضی بیومولکولها ، استاندارد بین المللی وجود ندارد .

۳. کونژوگه :

کونژوگه ها در متد الایزا می تواند به اشکال عمده کونژوگه هاپتن به آنزیم و کونژوگه آنتی بادی به آنزیم و یا کونژوگه آویدین به آنزیم باشد. آنزیمی که در متد الایزا کاربرد زیادی دارد Horse Radish Peroxidase (HRP) است اما از آنزیمهای دیگری مانند آلکالین فسفاتاز هم استفاده می شود. از آنجا که در کونژوگه ها از آنزیم استفاده شده است و آنزیم ها بیومولکولهای ناپایداری محسوب می گردند چه ازنظر ساختاری و چه ازنظر فعالیت آنزیماتیک در برابر عواملی مانند دما ، آلودگی و مهار کننده ها حساس هستند.

بنابراین پایدار نگه داشتن کنژوگه ها مقوله مهمی می باشد. کنژوگه ها را معمولا در محلولهای پایدار کننده که دارای مواد نگه دارنده نیز هستند تهیه می کنند میزان پایداری کنژوگه ها به نوع این محلولهای پایدارکننده ، به غلظت این محلولها و به غلظت کنژوگه بستگی دارد البته دمای نگه داری محلولی که کنژوگه در آن تهیه شده است را نباید فراموش کرد. از آنجایی که هرچه غلظت کنژوگه در محلول پایدار کننده بیشتر باشد پایداری آن نیز بیشتر است .

اکثر شرکت های سازنده سعی بر این دارند که کنژوگه ها را بصورت غلیظ 10x و یا 20x عرضه کنند.

٤. سوبسترا و کروموژن :

سوبسترا ماده شیمیایی است که آنزیم برروی آن بصورت اختصاصی تاثیر می گذارد سپس با ردیابی رنگ یا ترکیبات ثانویه ایجاد شده از این واکنش ، سنجش آنالیت مورد نظر (آنتی بادی یا آنتی ژن) میسر می گردد .

لازم به ذکر است که این پروسه در مورد آنزیم های مختلف متفاوت است بطور مثال سوبسترای آنزیم آلکالن فسفاتاز بعنوان کروموژن (ماده رنگزا) نیز عمل می کند ، در صورتیکه در مورد آنزیم Horse Radish Peroxidase HPR،

سوبسترا آب اکسیژنه ، بعنوان معرف رنگزا عمل نمی کند و باید از ترکیب دیگری مانند TMB ، ABTS و OPD بعنوان معرف رنگزا استفاده کرد .

کروموژن یا ماده رنگزا ماده ایست که تحت تاثیر مواد تجزیه شده از سوبسترا دچار تغییر رنگ می گردد .

۵. محلول شستشو :

محلولی است متشکل از بافر PBS یا Tris به انضمام درصد مشخصی از یک دترجنت مانند Tween جهت شستشو بین مراحل الایزا ،که باعث جداسازی پیوندهای غیر اختصاصی متصل شده به چاهک می شود .

نکات مهم در مراحل شستشو چاهک ها با بافر

۱- محلول های شستشو عمدتا حاوی دترژنت می باشند که منجر به تولید حباب یا کف در حین ساخت محلول کار بافر می گردد لذا بایستی مراقب بود در زمان شستشو این حباب یا کف ها وارد چاهک ها نشوند که منجر به کاهش سطح تماس بافر با چاهک ها و کاهش اثر شستشو می گردند

۲- اندازه گیری PH بافر شستشو نهائی (محلول کار بافر) از کارهای اصولی است که بهتر است انجام گردد . به عنان مثال در بافر فسفات PH ایده آل ۷/۲ است و شرایط اسیدی یا قلیائی منجر به ظهور جذب نوری کاذب بالا یا پائین می گردد . جهت این کار تحت کنترل بودن PH آب مقطر مورد نیاز جهت تهیه بافر الزامی است

۳- تاریخ تهیه بافر روی ظرف بافر قید شود و محلول بافر تازه به تازه و به میزان نیاز تهیه گردد

۴- در واشر های اتوماتیک بایستی سرعت ریختن بافر و آسپیراسیون بافر به شکلی تنظیم گردد تا زمان خیس خوردن پلیت به طور کامل رعایت گردد .

۵- تهیه بافر غلیظ یا رقیق خارج از رنج رقت بروشور منجر به کاهش یا افزایش قدرت بافر و نهایتا سیگنال مثبت یا منفی کاذب در روش می گردد به عنوال مثال بافر که بیش از حد رقیق شده باشد قادر به جداسازی اتصالات غیراختصاصی از محیط چاهک نبوده و سیگنال مثبت کاذب حاصل می نماید و برای بافر غلیظ عکس این موضوع صدق می نماید

٦. محلول متوقف کننده :

بسته به اینکه جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم از چه متدی استفاده شود محلول متوقف کننده ممکن است مورد نیاز باشد یا نباشد. به عبارتی دیگر اگر شیوه بررسی فعالیت آنزیم کینتیک است به محلول متوقف کننده نیازی نیست و اگر end point است باید استفاده گردد. محلولهای اسیدی مانند HCl و H_2SO_4 برای توقف فعالیت آنزیم HRP و محلول NaOH برای توقف فعالیت آنزیم ALP مورد استفاده قرار می گیرد.

تعیین شاخص های عملکردی کیت های الایزا

حساسیت تشخیصی / ویژگی تشخیصی

حساسیت تشخیصی Diagnostic sensivity —

شامل تعداد افراد دارای بیماری است که دارای آزمایش مثبت می باشند و و ارزش اصلی حساسیت — تشخیصی شناساندن افراد بیمار که آزمایش منفی دارند (گروه منفی کاذب) می باشد

ویژگی تشخیصی Diagnostic Specifity —

ویژگی تشخیصی شامل تعداد افراد غیر بیمار است که آزمایش منفی دارند و و ارزش اصلی ویژگی — تشخیصی تعیین افراد غیر بیمار که نتیجه آزمایش مثبت دارند (گروه مثبت کاذب) می باشد

—

روش اندازه گیری ویژگی تشخیصی و حساسیت تشخیصی در کیت های الایزا : —

۱- اندازه گیری بر روی تعداد زیادی نمونه سرم کنترل مثبت و منفی (یا سرم رفرانس) —

۲- جداسازی افراد بیمار از غیر بیمار با روش های استاندارد و مرجع —

۳- مقایسه دو روش اندازه گیری معمول و روش مرجع و محاسبه آماری شاخص ها —

تعیین شاخص های عملکردی کیت های الایزا

حساسیت آنالیتیکال / ویژگی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال Analytical sensivity:

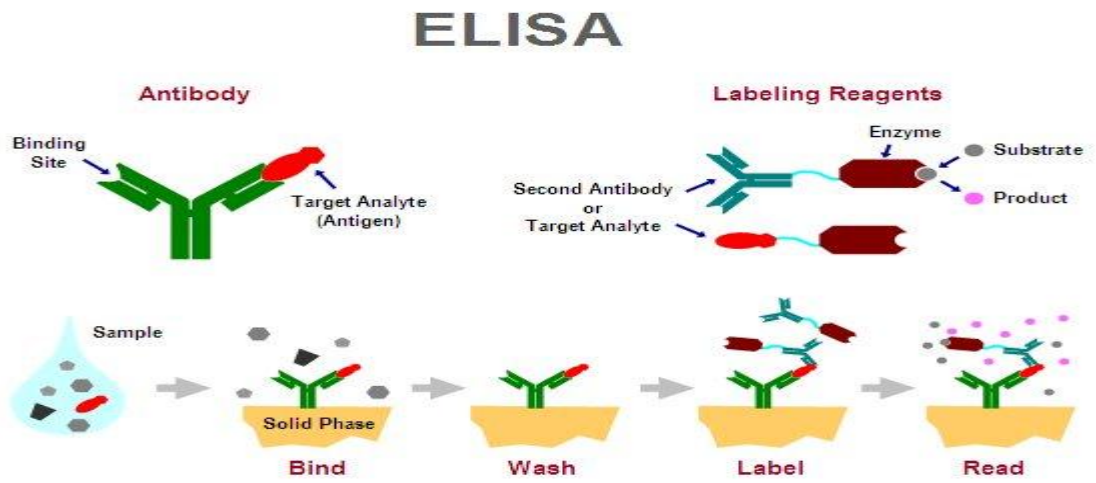
حساسیت آنالیتیکال یا سنجش شامل کمترین مقدار قابل اندازه گیری یک آنالیت با تکرار پذیری قابل قبول و قابل گزارش می باشد

روش تعیین حساسیت آنالیتیکال استفاده از طریق روش آنالیز آخرین تیتر رقت قابل شناسائی می باشد در این روش یک کالیبراتور با غلظت پائین را به شکل سریال دایلوشن رقیق نموده و آخرین تیتر که در آن آنالیت قابل شناسائی باشد تحت عنوان حساسیت آنالیتیکال نامیده می شود

ویژگی آنالیتیکال Analytical Specifity:

ویژگی آنالیتیکال به معنای عدم ایجاد واکنش متقاطع با سایر آنالیت های مرتبط را شامل می شود. روش اندازه گیری ویژگی آنالیتیکال : کاربرد پانل سرم هائی حاوی آنالیت های مشابه یا آنتی بادی های مشابه که احتمال واکنش متقاطع در آن وجود دارد

مراحل الایزا



مراحل بیوشیمیایی تکنیک الایزا

۱- چاهک های موجود در پلیت با آنتی‌بادی‌ها و آنتی ژن ها پوشیده (Coat) می‌شوند.

۲- نمونه ها، کنترل ها و استانداردها به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق یا ۳۷ درجه سانتیگراد برای یک مدت زمانی معین، طبق دستورالعمل تست انکوبه می شوند. در طول انکوباسیون، بسته به حضور یا عدم حضور و مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه، آنتی ژن نمونه به آنتی بادی کوت شده به پلیت، یا آنتی بادی موجود در نمونه به آنتی ژن Coat شده در پلیت باند می شود.

۳- پس از انکوباسیون، آنتی ژن‌ها یا آنتی‌بادی‌های آزاد، شستشو داده شده و با استفاده از میکرو پلیت واشر و یک بافر شستشوی مناسب، برداشته می شوند.

۴- در مرحله بعد، یک آنتی بادی ثانویه، به نام کونژوگه، اضافه شده که حاوی آنزیمی است که به منظور ایجاد یک تغییر رنگی، با یک سوبسترا واکنش خواهد داد.

۵- سپس یک دوره زمانی ثانویه از انکوباسیون شروع می شود که در طی آن، کونژوگه با کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی در چاهک ها پیوند برقرار خواهد کرد.

۶- پس از انکوباسیون، یک دوره شستشوی جدید انجام می شود که سبب برداشت کونژوگه متصل نشده از چاهک ها خواهد شد.

۷- در مرحله بعد، سوبسترا اضافه می شود. آنزیم با سوبسترا واکنش خواهد داد و سبب تغییر رنگ محلول خواهد شد. این واکنش نشان خواهد داد که چه مقدار کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی بادی در پایان تست وجود خواهد داشت.

۸- وقتی که زمان انکوباسیون کامل می شود، یک معرف برای توقف واکنش آنزیم- سوبسترا به آن اضافه شده که از تغییرات بیشتر در شدت رنگ ایجاد شده، جلوگیری می کند. این معرف عموما یک اسید رقیق است.

۹- در پایان، پلیت بوسیله الایزا ریدر خوانده می شود. نتایج حاصله برای تعیین مقادیر اختصاصی یا حضور آنتی ژن ها یا آنتی بادی ها در نمونه به کار برده می شوند.

توجه: برخی از چاهک ها برای استانداردها و کنترل ها استفاده می شوند. استانداردها برای تعریف نقاط cut-off به کار برده می شوند. استانداردها و کنترل ها مقادیر معینی هستند و برای اندازه گیری نتایج تست و ارزیابی اطلاعات در مقابل غلظت‌های مشخصی برای هر کنترل به کار برده می شوند. فرایند توصیف شده در بالا عمومی است؛ اگرچه بسیاری از تست های الایزا وجود دارند که همراه با مراحل یا متغیرهای اختصاصی هستند.

وسایل لازم جهت انجام تکنیک الایزا

جهت انجام آزمایش الایزا تجهیزات زیر مورد نیاز است:

۱- الایزا ریدر

الایزا ریدر یا خوانشگر الایزا که به اسامی میکروپلیت ریدر و یا خوانشگر میکروپلیت فتومتریک نیز معروف است ، یک اسپکتروفتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج تست الایزا طراحی شده است. این وسیله به منظور تعیین حضور آنتی بادی ها یا آنتی‌ژن های اختصاصی در نمونه ها به کار می‌رود. این تکنیک بر اساس تشخیص یک آنتی‌ژن یا آنتی بادی ها روی یک سطح جامد به صورت مستقیم یا ثانویه به کمک آنتی بادی های نشاندار و ایجاد محصولاتی استوار است که می‌توانند توسط اسپکتروفتومتر خوانده شوند .

این دستگاه قادر به خواندن مونو کروماتیک یا بیکروماتیک پلیتها با ۴ فیلتر ۶۳۰،۴۹۲،۴۵۰،۴۰۵ نانومتر می باشد. مزیت خوانش در سیستم های دو موج آن است که از مزیت تصحیح جذب نوری برخوردارند و در آنها نقصهای ناشی از سیستم نوری، تغییرات چاهک به چاهک و حجم نهایی چاهکها بطور اتوماتیک بر طرف می گردد. به این فیلترها فیلتر افتراقی (Differential Filters) می گویند .

در دستگاههای خوانشگر انتخاب طول موج توسط فیلترها و یا گریدها (ساختارهای خاصی هستند که با تابیده شدن نور به آنها، تنها نور با طول موج خاصی از آنها ساطع می شود)صورت می گیرد .

سیستم نوری موجود در این دستگاه ها توسط تعدادی از کارخانه ها با استفاده از فیبرهای نوری به منظور تامین نور جهت چاهک های حاوی نمونه در میکرو پلیت طراحی می شود. ابتدا یک شعاع نوری از نمونه ای که دارای قطری بین ۱ تا ۳ میلی متر است عبور کرده و سپس یک سیستم آشکار کننده، نور عبوری از نمونه را آشکار و تقویت می کند. در مرحله بعد،

سیگنال مربوط به جذب نوری نمونه‌ها ثبت شده و سیستم خوانشگر نیز آن را به اطلاعاتی تبدیل می کند که سبب تفسیر نتایج تست می شوند. برخی از الایزا ریدرها با استفاده از سیستم های شعاعی نوری دوتایی کار می کنند.
نمونه های مورد آزمایش در پلیت هایی که به این منظور طراحی شده اند و دارای تعداد خاصی چاهک هستند، قرار می گیرند. پلیت های ۸ ستونی همراه با ۱۲ ردیف که در مجموع ۹۶ چاهک را تشکیل می دهند، رایج تر از بقیه هستند. برای کاربردهای اختصاصی تر، تعداد چاهک ها افزایش می یابد که در برخی موارد تا پلیت های ۳۸۴ چاهکی را نیز شامل می شود. افزایش تعداد چاهک ها به منظور کاهش مقدار مصرف معرف ها و نمونه ها است. موقعیت سنسور نوری الایزا ریدر بر

اساس نوع کارخانه سازنده متغییر است؛ به طوری که در برخی موارد ممکن است در بالای پلیت حاوی نمونه و گاهی نیز مستقیما در زیر پلیت قرار گیرد. امروزه میکرو پلیت ریدرها دارای کنترل هایی هستند که به وسیله میکروپروسسورها تنظیم شده اند.

دستگاه‌های الایزا ریدر براساس نوع و سیستم خوانشگر به سه دسته تقسیم می‌گردند، که عبارتست از:

۱- Single Reader که تنها یک چاهک را بطریق دستی قرائت نموده و هیچگونه مد محاسباتی ندارند؛ لذا بایستی منحنی استاندارد تست‌های کمی توسط آزمایشگر بطریق دستی رسم گردد. بهمین علت از قیمت و کیفیت پائینی برخوردار بوده و خوشبختانه چنین دستگاه‌هایی دیگر مورد استفاده قرار نگرفته و از صحنه بازار محو شده‌اند.

۲- Strip Reader که تعداد ۳-۱ استریپ ۸ یا ۱۲ تایی را بصورت اتومات قرائت نموده و در عین حال منحنی تست‌های کمی را بر اساس مد محاسباتی، رسم می‌نمایند. علاوه بر این، بعلت دارا بودن فیلترهای افتراقی (Differential Filters) قابلیت خوانش در دو طول موج (Bichromatic Reading) را که بدلایل متعددی مورد نیاز می‌باشد را، بطور همزمان دارند، که این دلایل عبارتست از:

الف: حذف رنگ زمینه آبی که در اثر واکنش آنزیم HRP با TMB بعد از نوآرایی رنگ آبی به زرد قرائت در طول موج رفرانس مورد نیاز می‌باشد.

ب: باتوجه به اینکه رنگ زرد دارای طیف بلند گذر می‌باشد که طول موج‌های بالاتر از 500nm را به خوبی عبور داده و جذب آن در طول موج‌های حدود 600 nm صفر است، لذا نمونه بایستی در طول موج رفرانس نیز قرائت شود و بدین جهت

استفاده از طول موج رفرانس، نیاز به استفاده از بلانک را نیز منتفی می‌سازد. زیرا در روش (Bichromatic Reading) نمونه در طول موج‌های گوناگون خوانده شده و سپس تفاضل جذب‌های حاصله، مبنای تعیین غلظت قرار می‌گیرد.

۳- Plate Reader که قابلیت خوانش یک پلیت ۹۶ تایی را در حداقل زمان دارا بوده و لذا از سرعت، دقت و صحت بیشتری نسبت به دستگاه‌های Strip Reader برخودارند. از این رو قیمت بالاتری نیز دارند.

۲- میکرو پلیت واشر (شستشو دهنده چاهک ها)

از دیگر مراحل مهم تست ELISA ، شستشو است که در هر مرحله از تست به منظور دفع و تخلیه کامل مولکول‌های غیر اختصاصی از محیط واکنش انجام می گیرد. شستشو به دو صورت دستی و خودکار انجام می شود. ابتدایی ترین روش شستشو، شستشوی دستی است بدین ترتیب که مایع شستشو را با پیپت بر روی چاهک ها ریخته و سپس آن را در سینک خالی می کنند.

فشار بالای شستشو در روش دستی که به علت تخلیه سریع بافر به وجود می آید، منجر به جداشدن و حذف اتصالات اختصاصی از کف چاهک‌ها و کاهش کاذب می‌شود، همچنین فشار پائین‌شست‌شو ناشی از تخلیه آهسته بافر، باعث عدم دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی و افزایش کاذب جذب نوری می‌شود.

بهتر است در روش دستی تا نزدیک لبه فوقانی چاهک ها از محلول شستشو پر شود، در صورت پر شدن لب به لب چاهک‌ها، احتمال آلودگی چاهک به چاهک افزایش پیدا می‌کند. همچنین باید از سرریز شدن محلول شستشو، ایجاد حباب هوا در چاهک‌ها و تماس با کف چاهک جلوگیری کرد.

در هنگام تخلیه چاهک‌ها نیز باید مکش و تخلیه به طور کامل انجام شده و دقت شود که حتی ذره ای از مایع بافر در کف چاهک‌ها باقی نماند. اما این روش شستشو (شستشوی دستی) بسیار وقت گیر بوده و خطر آلودگی محیط و کاربر را در پی دارد. از این رو دستگاه‌های خودکار واشر ELISA برای شستشوی پلیت ها به وجود آمده است که علاوه بر دقت و ایمنی بالاتر، سریع‌تر و راحت‌تر عمل شستشو را انجام می دهند.

این دستگاه‌ها در انواع مختلف ۸ یا ۱۲ کاناله، تک سوزنه و دوسوزنه موجود است. در انواع دو سوزنه، یک سوزن برای ریختن و دیگری برای خالی کردن محلول شستشو استفاده می‌شود بدین ترتیب که یک سوزن به طور دائم در حال مکش است تا اگر مایع شوینده بیشتری در هنگام پر کردن وارد چاهک ها شد ، آن‌را خالی کند و این در حالی‌است که در مدل تک سوزنه تمامی اقدامات توسط همان یک سوزن صورت می گیرد.

۳- سمپلرها و تقسیم کننده ها

سمپلرهای بکار رفته در سنجش ایمنی معمولا به صورت تک ، ۸ و ۱۲ کاناله می باشند و برای استفاده از آنها از نوک های یکبار مصرف استفاده می گردد . در سمپلرهای چند کاناله هر کانال دارای یک پیستون بوده و برای کالیبراسیون نیز باید هریک از کانالها به صورت جدا بررسی و کالیبر شوند. نوکهای یکبار مصرف نیز در کیفیت و اندازه با یکدیگر متفاوت بوده و باید موقع انتخاب به این مسئله توجه شود .

تقسیم کننده های اتوماتیک نیز به صورت تک و ۹۶ کاناله می باشند که استفاده از آنها زیاد شایع نیست .

نحوه کاربرد صحیح نوک سمپلر و سمپلردر ELISA

۱- در صورت الزام به استفاده از نوک سمپلر مصرف شده نوک سمپلر بایستی اتوکلاو شده و بازبودن نوک تک تک نوک سمپلر ها چک شده باشد

۲- محکم نشدن نوک روی بدنه سمپلر منجر به ریزش نمونه یا معرف و بروز خطا می گردد

۳- بد جا انداختن اورینگ سمپلر در هنگام نظافت و سرویس سمپلر منجر به ریزش مایع از نوک سمپلر وبروز خطا می گردد

۴- تماس دست با نوک سمپلر و الودگی باکتریال ان می تواند منجر به الودگی محلول کنژوکه و تضعیف یا خنثی شدن معرف کنژوکه گردد. استاف و استرپتوکوک بواسطه رسپتور FC قادر به جذب غیر اختصاصی ایمونوگلوبین G در محیط بوده و منجر به جذب انتی بادی کنژکه و تضعیف تیتر کنژوکه می گردد

۵- چسبندگی ترکیبات پروتئینی سرم و پلاسما به سطح نوک سمپلر (خصوصا البومین) خصوصا زمانی که نوک را داخل لوله غوطه ور می نماییم منجر به تخلیه سرم اضافی و بروز خطا می گردد (راه حل اساسی برداشت نمونه از سطح خارجی سرم و عدم غوطه ورکردن نوک در سرم یا پاک کردن متناوب نوک ها با گاز یا دستمال بدون پرز می باشد)

۶- کنترل روزانه یا هفتگی مخروط سمپلر به لحاظ الودگی به سرم یا معرف یا اسید باید انجام شود

۷- اشنائی به تکنیک برداشت معکوس نمونه در حجم های پایین سرم لازم است

۸- کنترل کیفی وزنی سمپلرها باید به طور مرتب انجام شود

۹- نوک را حتی الامکان تا حد صحیح در نمونه پائین ببرید (۲ تا ۵ میلی متر پائین تر از تقعر سطح نمونه در لوله)

۱۰- نوک سمپلر نبایستی با ته چاهک تماس یابد و نبایستی از بالا به داخل چاهک چکانده شود

٤- انکوباتور

پلیت در انکوباتور قرار داده می شود که دارای دمای کنترل شده بوده و واکنش ها در آن محل انجام می شوند. (برای همه روش های الایزا لازم نیست)

نکاتی مهم در مورد دما :

- تقریباً نیم ساعت قبل از شروع تست تمامی اجزای کیت را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) برسانید .

- دمای انکوباتور را بطور مرتب چک کنید.

دمای پائین تر از حد لازم می تواند باعث کاهش ابزوربنس شده و دمای بالاتر از آن باعث افزایش ابزوربنس میشود .

- دمای مناسب برای انکوباسیون در دمای اتاق ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد می باشد

٥- شیکر الایزا

تکان دادن میکروپلیت ها (shaking) از مهم‌ترین بخش های تکنیک ELISA است، چرا که تاثیر زیادی در تغییر رنگ محیط آنزیمی پس از افزودن محلول اسیدی دارد. استفاده از روتاتور معمولی با قطر چرخش زیاد و تعداد دور کم و در نتیجه تکان دادن آهسته میکروپلیت‌ها باعث خوب مخلوط نشدن معرف‌ها و در نتیجه ادامه و پیشرفت جزئی واکنش در طی زمان و بروز خطا می‌شود. همچنین تکان شدید این پلیت ها نیز باعث آلوده شدن چاهک های میکرو پلیت با هم می‌شود. شیکر ELISA دستگاهی است که برای مخلوط کردن محتویات میکروپلیت‌ها به کار گرفته می شود. شیکر ELISA با حرکت سریع با قطر چرخش کم باعث اختلاط مناسب معرف‌ها و در نتیجه پیشرفت واکنش در طی زمان می‌شود. شیکرهای امروزی مجهز به سیستم کنترل زمان و کنترل دور به صورت دیجیتال است.

کنترل دستگاه الایزا ریدر :

کنترل عملکرد لامپ و فیلترها

جهت کنترل عملکرد لامپ و فیلترهای دستگاه باید هر دو هفته یکبار طبق دستورالعمل شرکت سازنده دستگاه وضعیت این قسمتها را چک کرد مثلا در دستگاه Stat Fax 2100 با فشار دادن کلید (Self CK) دستگاه بطور اتوماتیک شدت نور

خروجی، چرخش فیلترها ،حرکت X-Y حمل کننده پلیت ،صفحه نمایشگر (Alphanumeric display) و پرینتر را چک کرده و نتیجه را نمایش می دهد. پیغامهای زیر مشاهده خواهد شد:

Lamp out **ok** or Lamp out put **low**
Photometer operation **ok**
Plate transporter **ok**
Mechanism **failure**

پس ازپایان یافتن چک دستگاه پرینتر نتایج را ثبت می کند پیغام System Check **Ok** معرف آن است که دستگاه آماده استفاده می باشد. کنترل دستگاه به طریق مذکور هم بایستی بطور دوره ای هم به هنگام بازگشت دستگاه از سرویس انجام شود. چنانچه اخطاری مشاهده شد به دفترچه راهنما دستگاه مراجعه و یا با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.

کنترل خطی بودن (Linearity)

علاوه بر موارد ذکر شده خطی بودن (Linearity) دستگاه نیز بایستی بطور ماهیانه مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از این آزمون تعیین قابلیت دستگاه در تبعیت از قانون بیر (Beer's Law) می باشد که طبق این قانون غلظت محلول نسبت مستقیم با مقدار نور جذب شده دارد. توجه شود که کنترل خطی بودن در دستگاه الایزا یک پارامتر مهم در کارایی دستگاه است چرا که کنترل صحت فتومتریک تا حدود زیادی با گذاشتن استانداردهای مختلف در هر run کاری قابل کنترل می باشد اما اگر خطی بودن دستگاه دچار اشکال باشد تفاوتهای فاحشی در جوابها حاصل می شود. فقدان Linearity در غلظت های بالا معمولاً نشان دهنده وجود نورهای ناخواسته (stray light) است که می تواند بعلت خرابی فیلترها باشد . جهت چک linearity دستگاه ابتدا باید یک محلول با حداکثر جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا نزدیک به آن انتخاب نموده (محلول اسید پیکریک پیشنهاد می شود) در تمام چاهکهای پلیت بریزید و پلیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت نمایید.
نتیجه جذب نوری تمام چاهکها در صورت سالم بودن فیلتر بایستی 0.3 > باشد سپس یکبار دیگر بدون پلیت جذب نوری را قرائت می کنیم در چنین شرایطی باید جذب نوری برای تمام چاهک ها بین 0.01 ± باشد .در صورتی که نتایج بالا حاصل نشد با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.

TEST 186

همچنین جهت چک فیلترها می توانیم از برنامه Test # 186استفاده کنیم چنانچه عدد بدست آمده بین ۲-۱۰ باشد عملکرد فیلترها مناسب است در غیر اینصورت دستگاه را برای سرویس به شرکت پشتیبان ارسال نمایید. برای انجام تست ابتدا دستگاه را روشن کرده و ۱۵ دقیقه می گذاریم تا گرم شود و سپس بعد از ظاهر شدن کلمه selection mode ، دکمه Test را زده و سپس عدد ۱۸۶ را وارد کرده و Enter می کنیم. بعد از چند ثانیه چهار عدد برای فیلترهای ۰, ۱, ۲, ۳ ظاهر می شود که اگر این اعداد بین ۱۰-۲ باشد نشان دهنده سلامت فیلترها می باشد (در فیلترهای نو این عدد به ۱۰ نزدیکتر است و در فیلترهای کهنه به ۲ نزدیکتر است).

کنترل صحت فتومتری:

آزمون صحت فتومتری برای بررسی این مسئله که آیا حداکثر جذب نوری به مقدار مشخص در طول موج خاصی صورت می گیرد یا نه ، کاربرد دارد . به عبارت دیگر هدف تعیین تفاوت جذب واقعی با جذب مشاهده شده می باشد. صحت فتومتری به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش فتوالکتریک ، نوع و کیفیت منوکروماتور (تک رنگ کننده) بستگی دارد.

برای بررسی صحت فتومتریک از محلول رنگزای قلیائی دی کرومات پتاسیم (۴۰ میلی گرم دی کرومات پتاسیم را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده ، سپس ۳/۳ گرم پتاس به آن اضافه می کنیم و حجم را به یک لیتر می رسانیم) استفاده می کنیم. با یک سمپلر ۲۰۰ λ (که به دقت کنترل کیفی شده و CV آن زیر ۳٪ می باشد) مستقیماً از معرف فوق به داخل ۵ چاهک ریخته و در Absorption Mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰ nm جذب آنرا می خوانیم

و سپس میانگین آنرا محاسبه می نمائیم. عدد به دست آمده باید در محدوده ۰/۰۴ ± ۰/۲۳۵یا ۰/۲۷۵ – ۰/۱۹۵ قرار گیرد.

کنترل تکرارپذیری:

برای پی بردن به وجود هر گونه اختلال در کثیف بودن حس گرها ، لنزهای دستگاه و کالیبراسیون نامناسب یک یا چند کانال دستگاه و یا ناپایداری لامپ دستگاه باید تکرار پذیری دستگاه را کنترل کنیم . که در این حالت حداقل ۸ بار خوانش OD در غلظت های مختلف انجام شود و سپس Coefficient Variation(CV) آنرا محاسبه کرده (کمتر از ۳ درصد قابل قبول است).

برای انجام این کنترل ابتدا یک رقت ۱/۲ از معرف تهیه شده ، برای کنترل خطی بودن تهیه کرده و سپس از معرف اصلی و معرف رقیق شده ۸۲۰۰λ به ۸ چاهک اضافه کرده و در Absorption Mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰ nm جذب آنرا می خوانیم و سپس میانگین ،انحراف معیار(SD) و ضریب تغییرات آنرا محاسبه می نمائیم.

کالیبراسیون دستگاه الایزا ریدر

۱- یک محلول رنگی را به مقدار یکسان در چاهک ها ریخته و جذب نوری آنها را قرائت کنید. سپس پلیت ها را بیرون آورده و مجدداً ۱۸۰ درجه بچرخانید و دوباره جذب نوری آن را قرائت کنید. چنانچه در هر دو حالت جذب نوریها یکسان بود، دستگاه کالیبره می باشد.

۲- جهت بررسی کالیبره بودن موتوری که پلیت را جابجا می کند، می توان از یک پلیت خالی استفاده نمود. در این حالت چنانچه بین جذب نوری خوانده شده برای ستون اول با ستون آخر اختلاف معنی داری وجود نداشت می توان به سالم بودن و کالیبره بودن موتور پی برد.

کنترل و نگهداری :

دستگاه را در محیط خشک و در فضای بدون گرد و غبار زیاد نگه داری کنید شرایط مناسب باید ۳۵-۱۸ درجه و رطوبت کمتر از ۸۵٪ باشد در مواقع لزوم دستگاه را با استفاده از یک پارچه مرطوب تمیز نمایید جهت ضدعفونی ایزوپروپانول ۷۰٪ پیشنهاد می شود استفاده از سایر مواد شیمیایی و تمیز کننده های ساینده توصیه نمی شود.

سنسورهای نوری چنانچه کثیف هستند، سطح پنجره‌های عبور دهنده نور و سنسورها را با یک برس کوچک تمیز کنید.

در ابتدای کار اجازه دهید تا خوانشگر برای مدت ۳۰ دقیقه گرم شود .

سیستم کشنده اتوماتیک اسلایدها (Automatic drawer sliding system) را بررسی کنید که باید نرم و ثابت باشد.

آماده سازی و کنترل کردن کیت

دریافت کیت

هنگامی که کیت الایزا را دریافت کردید تاریخ دریافت را در جدول پیگیری موجودی ها و بر روی جعبه کیت ثبت نمایید .

کیت را ابتدا از لحاظ آسیب فیزیکی بررسی کنید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد ذخیره کنید .

هنگامی که می خواهید از کیت استفاده کنید ابتدا به جدول پیگیری موجودی ها مراجعه کنید و کیت قدیمی تر را انتخاب کنید . اجزاء موجود در کیت الایزا ممکن است دارای تاریخ انقضاء طولانی تر از تاریخ انقضاء موجود در روی کیت داشته باشند. با این حال شما باید به تاریخ روی جعبه توجه داشته باشید .

نکات قبل از استفاده از کیت:

- کیت را از شرکت و یا نماینده معتبر تهیه کنید.
- دقت کنید کیت مورد استفاده دارای تاییدیه کنترل کیفی از منبع معتبر باشد.
- از شرایط حمل و شرایط نگهداری صحیح کیت مورد نظر اطمینان حاصل کنید.
- به تاریخ انقضاء کیت دقت کنید.
- به ظاهر فیزیکی کیت اعم از بسته بودن درب آن، سالم بودن جعبه، عدم رطوبت جعبه دقت کنید.
- با باز کردن کیت، از لحاظ کیفی و کمی به محتویات کیت طبق دستورالعمل کیت توجه کنید. مثلا محلول متعلق به T_3 در کیت T_4 نباشد و تعداد محلولهای هر کیت مطابق بروشور کیت باشد.
- بروشور کیت را بدقت مطالعه کنید.
- محلولهای کیت را در صورت نیاز طبق بروشور به روش صحیح به میزان لازم تهیه کنید.
- نمونه ها نیز همزمان با کیت به دمای آزمایشگاه برسند.
- کلیه مراحل انجام آزمایش را طبق توصیه سازنده و بروشور کیت انجام دهید.

نکات هنگام استفاده از کیت:

- از محلولهای هر کیت برای همان کیت استفاده کنید.
- از مصرف محلولهای تاریخ گذشته شده پرهیز کنید.
- از مخلوط کردن محلولهای کیتهای مختلف علی الخصوص با سری ساخت متفاوت خودداری کنید.
- از مصرف محلولهای مشکوک، مانند محلولهای تغییر رنگ داده خودداری کنید.
- در آماده سازی محلولهای غلیظ و یا لیوفیلیزه دقت کافی به خرج دهید.
- از تکان دادن شدید و کف کردن محلولها پرهیز کنید.
- از برخورد نور مستقیم با محلولهای ذکر شده در بروشور مانند سوبسترا، خودداری کنید.
- هنگام جابجایی میکروپلیت، برداشتن برچسب روی پلیت و هنگام شستشوی چاهکها مراقب آلودگی چاهکها به یکدیگر باشید و از این امر پرهیز کنید.
- ترتیب افزودن محلولها به چاهکها را طبق بروشور رعایت نمایید. خصوصا ترتیب و جهت ریختن سوبسترا و ترتیب و جهت ریختن محلول بازدارنده.
- انجام یک تست توسط یک پرسنل انجام شود. واگذاری ادامه تست توسط فرد دیگر اصلا توصیه نمی شود.
- در ریختن محلولهای مختلف و نمونه های متفاوت از سر سمپلر جدید استفاده نمایید.
- از استقرار صحیح نوک سمپلر به سمپلر اطمینان حاصل نمایید.
- مرحله شستشو را با دقت و حوصله انجام دهید. رقت محلول شستشو به دقت رعایت شود. تعداد دفعات شستشو حفظ شود. حجم محلول شستشو رعایت گردد. از آلودگی چاهکها هنگام شستشو پرهیز شود.
- جایگاه و چاهک نمونه های غیر عادی را یادداشت کنید (نمونه های ایکتر، لیپمیک، همولیز).
- ترجیحا استانداردها را دوبل گذاشته، از تعداد استانداردها نکاهید.
- از پرسنل با تجربه در انجام آزمایش استفاده شود. از ابزار کالیبره استفاده شود. این امر شامل سمپلرها، انکوباتور و دستگاه خوانشگر می باشد

کیفیت نمونه دریافتی

کیفیت نمونه می تواند تاثیر قابل توجهی در نتایج نهایی سنجش داشته باشد رشد قارچ یا آلودگی باکتریایی میتوانند اثرات مداخله کننده روی اجزاء آنتی بادی و یا دیگر پروتئین های نمونه داشته باشد. اگر کیفیت نمونه مشکوک است در صورت امکان تهیه دوباره نمونه تازه توصیه می شود

نمونه سرم / پلاسما :

نمونه سرم با همولیز کم (رنگ قرمز روشن) یا لیپمیا متوسط (ظاهر شیری) نمی توانند اثر قابل توجهی روی نتایج الایزا داشته باشند . از نمونه هایی که دارای همولیز زیاد (رنگ قرمز تیره) یا بشدت لیپمیک هستند اجتناب کنید .

ذخیره سازی نمونه

مطمئن باشید که نمونه به طور مناسب ذخیره شود . بنا به نوع آزمایش نحوه ذخیره سازی نمونه و یا ارسال آن به یک آزمایشگاه دیگر متفاوت است

اطمینان حاصل کنید تمام نمونه های ذخیره شده دارای برچسب باشند و برای جلوگیری از تبخیر و یا آلودگی درب لوله ها بسته شوند .

استفاده از نمونه های فریز شده :

نمونه فریز شده را در دمای اتاق یا درون یخچال آب کنید . همه نمونه های آب شده باید مخلوط شوند که پروتئین های درون نمونه در سراسر نمونه پخش شوند برای اینکار با شیکر و یا با ۵ بار سر و ته کردن نمونه ، آنها را مخلوط کنید . مخلوط کردن بیش از حد باعث دناتوره شدن پروتئین های نمونه می شود .

شاخصهای اجرایی در کیتهای الایزا

نخستین گام در ارزیابی کیتهای الایزا تعیین شاخصهای اجرایی برای آن می باشد .

این شاخصها از نظر تعریف شامل کلیه آزمایشاتی میباشند که دقیق و صحیح بودن ، عملکرد یک کیت رانشان میدهند .بسته به کمی یا کیفی بودن کیتهای الایزا این شاخص ها متفاوت هستند.در کیتهای کمی در مرحله نخست پس از اطمینان از درست بودن منحنی استاندارد کیت و منطبق بودن آن با منحنی معرفی شده از سوی سازنده اقدام به بررسی شاخصهای اجرایی می نمایند.این شاخصها بترتیب عبارتند از :

۱.دقت یا بررسی تکرار پذیری کیت precision

۲.صحت یا بررسی صحیح بودن Accuracy

۳.حساسیت

دقت(prescision)

نخستین معیار مهم در شاخصهای اجرایی مسئله دقت در کیت های آزمایشگاهی است.دقت به معنی تکرارپذیری یک آزمایش میباشد.برای محاسبه آن در اولین مرحله نیازبه تهیه یک نمونه ثابت داریم.این نمونه میتواند پول سرم (مخلوط سرمی) ، سرم کنترل تجاری ، سرم کنترل کیت یاهرنمونه ای باشد که مقدار پایدار وثابتی داشته باشد .دومین نکته ای که بهتر است به آن توجه شود این است که به جای یک نمونه سه نمونه رابصورت جداگانه مورد آزمایش قرار داد.این سه نمونه در اصل حاوی

مقادیر بالا ، متوسط وپایین آنالیت مورد نظر ما خواهند بود و این اطمینان را به ما میدهند که در این سه طیف ، کیت دارای نتایج تکرار پذیری است.پس از تهیه نمونه ، دومین اقدام تعریف سطح تکرار پذیری یا در اصل طبقه بندی دقت میباشد.ازهمین رو دقت را میتوان به انواع مختلفی طبقه بندی کرد

۱.درون سنجی ۲.میان سنجی ۳.مابین سری وغیره

۱.درون سنجی(intra-assay)

در این نمونه دقت، میبایست با یک نمونه وضعیت تکرار پذیری را در طی یک آزمایش کاری ودرون یک پلیت مورد ارزیابی قرار داد.این نوع دقت توانایی یک روش را برای تعیین مقدار یک نمونه در یک آزمایش ارزیابی می نماید.

برای انجام این کار چندین استریپ از یک پلیت رابا یک نمونه مورد آزمایش قرار میدهیم(حداقل۲۰بار) ونتایج حاصله را ثبت میکنیم.جهت محاسبه میبایست دقت نمود تا از غلظت بدست آمده و نه OD ،جهت محاسبات استفاده نمود.ازهمین رو نخست میانگین کلیه غلظتها(X) رامحاسبه نموده وانحراف استاندارد (SD) آنها را بدست می آوریم.باتقسیم انحراف استاندارد برمیانگین و ضرب آن در عدد۱۰۰ ضریب تغییرات (CV%) بدست می آید که نشاندهنده میزان پراکندگی نتایج بدست آمده میباشد.

$$CV\% = SD/ X \times 100$$

با ترسیم ضریب تغییرات در غلظتهای مختلف میتوان منحنی بدست آوردکه آنرا گزارش دقت PRECISION PROFILE مینامند و میتوان از آن برای تعیین طیف کاری که بیشترین میزان تکرار پذیری را دارا باشد استفاده نمود

۲. میان سنجی(Inter-assay)

اهمین این نوع دقت در این نکته میباشد که توانایی یک روش را در تعیین مقدار یک نمونه در طی آزمایشا ت متعدد می سنجد

برای تعیین این نوع دقت دو راه وجود دارد:

۱. روش نخست در طی دو آزمایش مختلف در طی یک روز وبا فاصله۲ ساعت از یکدیگر انجام میگیرد.برای تعیین این نوع دقت که مشهوربه دقت مابین آزمایشی (between-Run Precision) میباشد میبایست در هر بار انجام آزمایش هرنمونه را چها بار مورد آزمایش قرار داد ومحاسبات نیز همانند قبل انجام میگیرد.

۲. درروش دوم مابین روزهای مختلف نتیجه آزمایش را بررسی میکنیم(Between-day precision) در این روش نیز نمونه مورد آزمایش در هر بار انجام آزمایش میبایست چهار بار تست شود و بمدت ۲۰-۵ روز آزمایشات انجام گیرد

انواع دیگری از دقت نیز وجود دارد همچون دقت مابین سری که دقت یک نوع کیت را در بین سریهای مختلف ساخت مورد ارزیابی قرار میدهد.

صحت(Accuracy)

صحت در اصل بیانگر مقدار واقعی یک آزمایش میباشد و میزان نزدیک بودن میانگین آنالیت های اندازه گیری شده را با مقدار واقعی آن مورد بررسی قرار میدهد.به اختلاف حاصل ازاین دو عدم صحت یا سو گرایی یا Bias می گویند.

۱.تست همبستگی Correlation

جهت تعیین صحت بهترین روش مقایسه نتایج بدست آمده از کیت با مقادیر شناخته شده رفرانس یا مرجع میباشد.

آزمایشی که در آن این اقدام صورت میگیرد تحت عنوان تست همبستگی شناخته میشود.جهت انجام این آزمایش میبایست از حداقل ۴۰ نمونه سرم که در بر گیرنده طیف طبیعی آنالیت میباشد استفاده نمود.نمونه ها را به صورت دوتایی ، هم با روش رفرانس هم باکیت موجود تحت بررسی قرار میدهیم.جهت بررسی نیز میتوان از یکسری فاکتورهای آماری استفاده نمود.فاکتورهای آماری همچون شیب منحنی(m) ، ضریب همبستگی(r) وتلاقی عرض از مبدا (Y intercept) پارامترهای آماری میباشندکه جهت بررسی همبستگی قابل استفاده هستند.

۲.تست بازیاف(Recovery)

در صورتی که روش مرجعی برای بررسی صحت وجود نداشته باشد از روشهای غیر مستقیم همچون Recovery میتوان استفاده نمود .در این روش توانایی یک آزمایش در تعیین مقدار مشخص افزوده شده به یک نمونه سنجیده میشود.جهت انجام این آزمایش به دو چیز نیاز میباشد:

۱. مقدارغلیظی از آنالیت تحت بررسی تا بتوان با افزودن مقدار اندکی ازآن به نمونه آزمایش را انجام داد.

۲. دویا سه نمونه مختلف بیمار یا مخلوط سرمی که مقدار آنالیت در آنها مشخص باشد و طیف کامل طبیعی آنالیت را پوشش دهند این نمونه ها در اصل مقدار پایه خواهند بود.

برای انجام این آزمایش میبایست اقدامات زیر را انجام داد:

ابتدا باید هریک از سه نمونه را بدو قسمت تقسیم کنیم و یکی را به عنوان شاهد ودیگری را به عنوان تست منظور مینماییم.به تست مقدار مشخصی از آنالیت و به لوله شاهد نیز به همان میزان لوله تست از محلول عاری از آنالیت همچون محلول اساندارد صفر اضافه نموده وبا انجام آزمایش بر روی نمونه ها از فرمول زیر برای محاسبه استفاده میکنیم

٪ Recovery = (مقدار اندازه گیری شده) / غلظت پایه / مقدار اضافه شده ×۱۰۰

۳. تست خطی بودن linearity

از این روش نیز میتوان برای تعیین صحت استفاده نمود.این روش با رقیق نمودن در حداقل پنج حد مختلف (۰٪ ، ۲۵٪ ، ۵۰٪ ، ۷۵٪ ، ۱۰۰٪) و انجام آزمایش بر روی آنها صورت میگیرد.با محاسبه ضریب رقت در غلظتهای مختلف بدست آمده میتوان صحیح بودن نتایج را بصورت یک خط مستقیم مشاهده نمود.

برای انجام آزمایش یک نمونه سرمی که دارای مقادیر بالای آنالیت باشد را انتخاب نموده واز آن رقتهای مختلف در حد ۷۵٪یا سه چهارم مقدار اولیه ، ۵۰٪یا یک دوم مقدار اولیه و ۲۵٪یا یک چهارم مقدار اولیه تهیه می نماییم.سرم اولیه بعنوان رفرانس ۱۰۰٪ و محلول رقیق کننده که در اکثریت موارد استاندارد صفر یا سرم عاری ازآنالیت میباشد به عنوان رفرانس صفر در آزمایشات خطی بودن مورد آزمایش قرار میگیرند.

٤.بررسی تداخلات interference

یکی از موارد مهم موثر برروی صحت یک کیت مسئله تداخلات میباشد. تداخلات میتوانند هم باعث سوگرایی مثبت ویا نتایج مثبت کاذب و هم سوگرایی منفی و یا نتایج منفی کاذب در آزمایشات گردند. از عوامل مختلفی که باعث بروز تداخل میگردند میتوان به تاثیر هتروفیل آنتی بادی ، فاکتور روماتوئیدی و اثر هوک اشاره کرد

آنتی بادی های هتروفیل گروهی ازآنتی بادی ها هستند که در پی تماس مستقیم و یا غیر مستقیم با حیوانات در انسان ایجاد میشوند.این آنتی بادی ها با چسبیدن به قسمتهای FC ملکول های آنتی بادی میتوانند باعث سوگرایی مثبت و منفی در آزمایشات شوند.

فاکتور روماتوئیدی از عوامل دیگر تداخل کننده محسوب میشود.جنس این فاکتور از جنس Ig M بوده و بر علیه قسمت FC ملکولهای IgG میباشد.این فاکتور را میتوان در بسیاری از بیماران مبتلا به بیماریهای خود ایمنی مشاهده نمود.

گاها در آزمایشات یک مرحله ای با فرمت ساندویچی که در نمونه مقدار بسیار زیادی آنالیت وجود داشته باشد میتوان جوابهای منفی مشاهده نمود که به این پدیده اثر هوک اطلاق میگردد.مکانیسم این اثر به این شکل است که در آزمایشات ساندویچی یک مرحله ای با افزودن نمونه و انتی بادی نشاندار شده بصورت همزمان بدلیل وجود مقدار بسیار زیاد آنالیت هردو آنتی بادی (آنتی بادی نشاندار در محلول و آنتی بادی موجود در کف چاهک ها) توسط مولکولهای آنالیت اشغال میگردند.

وامکان ایجاد پل رابط مابین آنتی بادی موجود درکف چاهک و آنتی بادی نشاندار در محلول از بین میرود.حاصل این مسئله مشاهده نتایج منفی کاذب در آزمایشات میباشد و بهترین مثال عملی آن را نیز میتوان در خانمهای باردار دارای مقدار زیاد هورمون HCG دید.

دراین گروه از افراد چنانچه آزمایشات به صورت یک مرحله ای یعنی افزودن همزمان نمونه بیمار با کونژوگه صورت گیرد ، احتمال مشاهده نتایج منفی کاذب وجود دارد.برای رفع این مشکل نیز میتوان با رقیق کردن نمونه مورد آزمایش ویا با دو مرحله ای کردن آزمایشات تاثیر اثر هوک را ازبین برد .

حساسیت(SENSITIVY)

حساسیت بنا به تعریف به کمترین مقدارآنالیت که از صفر قابل تفکیک باشد اطلاق میگردد.حساسیت به دو گروه آنالیتی وعملکردی تقسیم بندی میشود.

حساسیت آنالیتی Analytical sensitivity

در این نوع حساسیت که اکثر سازندگان کیتها ازآن استفاده میکنند ۲۰ بار استاندارد صفر را مورد آزمایش قرار می دهند و ۲ انحراف استاندارد بالاتر (در تستهای ایمونومتریک) ویا پایین تر(در تستهای رقابتی) را محاسبه می نمایند جهت مشاهده این نتیجه میبایست حتما به بروشور کیت مراجعه نمایید و چنانچه حساسیت یک کیت بطور مثال 0.2 IU/ml ذکر گردیده بود گزارشات نتیجه کمتر از این حد خطا میباشد

حساسیت عملکردی Functional sensitivity

این نوع حساسیت منطبق بر میزان دقت در نمونه هایی با مقادیر بسیار پایین میباشد.در این روش با رقیق نمودن نمونه یا سرم دارای مقدار پایین آنالیت و رسم منحنی precision profile برای آن غلظتی که در آن میزان دقت حداکثر به ضریب Cv % (۲۰درصد) رسیده باشد بعنوان حساسیت تلقی میگردد.جهت تعیین این نوع حساسیت میبایست نمونه سرم با غلظت پایین آنالیت را انتخاب نمود از آن رقتهای مختلف تهیه کرد و بر روی هر رقت چندین بار آزمایش انجام داد و ضریب تغییرات cv% را محاسبه نمود .کمترین مقداری از آنالیت که در آن ضریب تغییرات به کمتر از ۲۰ درصد رسیده باشد به عنوان حساسیت عملکردی تلقی می گردد.

روش های پیپتینگ

بدون تردید استفاده کردن از سمپلر شایع ترین عملی است که در آزمایشگاه انجام میگیرد . و در واقع صحت و دقت بیشتر نتایج آزمایشات به همین استفاده صحیح از سمپلر وابسته است . رعایت چند نکته که در ادامه خواهد آمد باعث خواهد شد که تکرار پذیری و صحت آزمایشات به مقدار قابل توجهی افزایش یابد.

۱. سمپلینگ استاندارد و سمپلینگ معکوس

سمپلینگ استاندارد زمانی است که برای برداشتن نمونه دکمه سمپلینگ را تا مرحله اول پایین میبریم و نمونه را برمیداریم و هنگام تخلیه نمونه ، دکمه را تا انتها (مرحله دوم) فشار می دهیم تا تمامی نمونه تخلیه شود .

اما سمپلینگ معکوس زمانی است که ما برای برداشتن نمونه تا انتها (مرحله دوم) دکمه را فشار می دهیم و نمونه را برمی داریم و زمان تخلیه تنها ، تا مرحله اول دکمه را فشار می دهیم (برعکس روش استاندارد)

برای تمام نمونه ها باید از روش استاندارد استفاده کنیم و تنها برای نمونه های که دارای چسبندگی زیاد هستند مانند مایع سمینال و سمپلرهای چندگانه از روش معکوس استفاده می کنیم . بدیهی است که اگر روش معکوس را برای نمونه های مانند سرم استفاده کنیم مقدار بیشتری حجم مورد نظر را برداشت خواهیم کرد. و همچنین اگر از روش استاندارد برای برداشتن نمونه مایع منی استفاده کنیم مقدار کمتری از حجم مورد نظر را بر خواهیم داشت.

۲. سر سمپلر مناسب

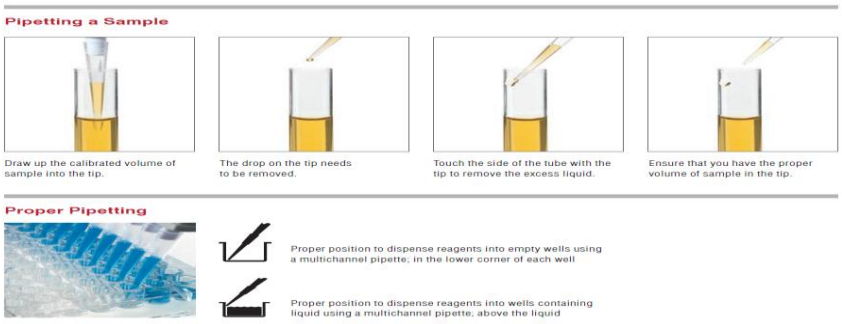
استفاده از سرسمپلر استاندارد و مناسب ، صحت و تکرار پذیری را افزایش می دهد. در بازار سر سمپلرهای غیر استاندارد متفاوتی وجود دارد که شاید ارزان هم باشند اما ممکن است دقیقا مناسب سمپلر های ما نباشد و یا بدلیل داشتن دیواره نامرغوب نمونه کاملا تخلیه نشده و همواره مقداری از نمونه در سر سمپلر باقی بماند . از این رو بهتر است قبل از خرید سر سمپلر به مقدار زیاد در ابتدا آن را با سمپلرهای موجود در آزمایشگاه از نظر مناسب بودن و شل نشدن در هنگام کار و تخلیه کامل بررسی کنیم.

۳. فرو بردن سمپلر در نمونه

برای برداشتن حجم ها ی کمتر از ۲ سی سی ، برای گرفتن بهترین نتیجه باید سر سمپلر را تا ۲ تا ۵ میلی متری از سطح نمونه فرو ببریم . پایین بردن بیش از حد سر سمپلر در نمونه باعث می شود مقداری از نمونه به دیواره خارجی سر سمپلر آغشته شود که همین امرموجب بروز خطا می گردد . همچنین فرو نبردن کامل نیز ممکن است باعث شود حباب های بسیار ریز هوا به جای نمونه وارد سر سمپلر شوند و در نتیجه حجم مورد نظر برداشته نشود. در صورتی هم که بخواهیم حجم های بیشتر ا ز ۲ سی سی را برداشت کنیم باید سر سمپلر ر ا تا عمق ۱۰ میلی متری از سطح نمونه فرو ببریم .

٤. عمود نگه داشتن سمپلر

یکی از منابع خطا شایع در سمپلینگ کردن عمود نگه نداشتن سمپلر در هنگام برداشت نمونه است . باید دانست که انحراف بیش از ۲۰ درجه از حالت عمود باعث بروز خطا و تکرار پذیری ضعیف خواهد شد. همچنین به هیچ وجه نباید سر سمپلر را به دیواره لوله تماس داد.



۵. داشتن سرعت یکنواخت

سریع سمپلر کردن در هنگام برداشتن و تخلیه نمونه باعث پاشیده شدن نمونه به اطراف ، آلوده شدن خود سمپلر به نمونه و ایجاد آئروسل میگردد . همچنین بهتر است زمانی که نمونه را برداشت کردیم ، بعد از یک ثانیه سمپلر را از نمونه بیرون بیاوریم این کار باعث میشود که حرکت مایع در سر سمپلر کامل شود و اگر سریع سمپلر را خارج کنیم ، ممکن است مقدار نمونه برداشتی بسیار کم تر از حجم مورد نظر باشد .

٦. دمای محیط

بهترین دما برای سمپلر ها دمای بین ۲۰/۵ تا ۲۲/۵ درجه میباشد . مطمئن باشید اگر دمای خارج از این محدوده باشد حجم برداشتی دقیقا همان میزان موردنظر نخواهد بود .

کالیبراسیون سمپلر

سمپلرها یا میکروپیپت ها در آزمایشات الایزا کاربرد فراوان دارند بنابراین عدم داشتن دقت و صحت کافی می تواند در نتایج خوانده شده تأثیر قابل توجهی داشته باشند. سمپلرها می توانند به صورت تک یا هشت کاناله به کار گرفته شوند. صرف نظر از نوع، سمپلرها می‌بایست بر طبق میزان مصرف و نوع مواد شیمیایی به کار رفته، در یک دوره زمانی ۳ تا ۴ ماه یک بار مورد بازبینی کامل و کالیبراسیون قرار گیرند.

نقایصی که مربوط به سمپلرها بوده و منجر به تغییر نتایج آزمایشات الایزا می شوند، متعدد هستند، دسته ای منشأ درونی داشته و مربوط به خود ابزار است مثل عدم عملکرد صحیح پیستون یا بخش های مربوط به آن. از طرف دیگر عدم کالیبره بودن سمپلر نیز تأثیراتی در حجم تخلیه و در نهایت تغییر نتایج خواهند داشت.

برخی از نقایص منشأ بیرونی داشته مانند مناسب نبودن نوک سمپلر و عدم تناسب آن ها که منجر به کاهش حجم مکش یا تخلیه می شود.

عدم وجود صحت(accuracy) قابل قبول می‌تواند منجر به دریافت نتایج غیرقابل انتظار در برخی چاهک ها شده بنابراین عملکرد صحیح آن‌ها در نتایج کلی سنجش ایمنی از اهمیت فوق‌العاده ای برخوردار است.

بنا بر دستور کار ارائه شده توسط استاندارد ۸۶۵۵ ISO به عنوان یکی از زیر مجموعه های استاندارد ISO۱۷۰۲۵ ، می توان سمپلرها را به دو روش وزنی و رنگ سنجی کالیبره کرد.

در روش وزنی که به روش های گراوی‌متری (Gravimetric Method) هم معروف است می بایست با استفاده از یک ترازوی آنالیتیکال وزن مایع توزیع شده از سمپلر را اندازه گیری کرده با استفاده از دانسیته مایع، حجم دقیق و نهایتا پارامترهایی مانند میانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات (cv) و صحت وسیله (accuracy) را محاسبه کرد.

جهت راحتی کار پیشنهاد می شود از آب مقطر با دانسیته نزدیک به ۱ استفاده شود .

برای هر سمپلر یک حد مجاز تغییرات یا محدوده خطا (Error limit) تعریف شده که در صورت خارج بودن نتایج سمپلر از محدوده تعریف شده، حتما می بایست سمپلر کالیبر شود.

در روش رنگ سنجی معمولا از یک رنگ تجاری آماده، غلظتی تهیه و توسط اسپکتروفتومتر در یک طول موج مشخص در مقابل بلانک مربوطه ، میزان جذب آن قرائت می‌شود. نهایتا در اینجا هم مثل روش قبل میانگین انحراف معیار، ضریب تغییرات (cv) محاسبه می شود که cv به دست آمده نماینده دقت سمپلر است.

در این روش هم نهایتا می بایست خطای کل را محاسبه و با محدوده خطای سمپلر مقایسه کرد. از آنجا که سمپلرهای به کار رفته در روش الایزا معمولا متغیر هستند مطابق دستورالعمل های موجود، لازم است در ۳ نقطه از محدوده فعالیت سمپلر، ۳ حجم برداشتی محاسبه و کالیبراسیون سمپلر بررسی شود .

عوامل ایجاد کننده خطا و مشکلات احتمالی

عوامل قبل از انجام آزمایش

– محکم بستن ویا طولانی بسته بودن گارو در زمان نمونه گیری

– تاثیر ضد انعقاد ها هنگام استفاده از پلاسما (EDTA روی آنزیم آلکالین فسفاتاز)

– نمونه همولیز(افزایش Hb و باقی ماندن آن در محیط بعداز شستشودر سنجش هایی که از آنزیم پراکسیداز استفاده میشود تداخل ایجاد میکند)

– نمونه لیپمیک باعث کدر شدن و شیری شدن سرم میشود

– نمونه ایکتریک (سرم زرد تیره – بیلی روبین بعنوان دترژنت عمل کرده – واکنش با قسمتهای هیدروفوب آنتی ژن و آنتی بادی)

– تاثیر مواد نگهدارنده (اثر سدیم آزاید روی آنزیمهای پراکسیداز)

عوامل حین انجام آزمایش

– مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد زمینه در میکروپلیت

– مقادیر پایین کنترل مثبت یا جذب نوری پایین

– تمام پلیت مثبت تفسیر شود (در تمام چاهکها محلول دارای رنگ است)

– واکنش مثبت کاذب

– قدرت تکرار پذیری ضعیف یا عدم هماهنگی در جذب نوری دو چاهک دارای نمونه یکسان

– حساسیت ضعیف

– جذب نوری بالا استانداردها و یا کنترل منفی

– نمونه با جذب نوری خارج از محدوده استانداردها

– جذب نوری پایین نمونه ها ، کنترل ها و استانداردها

– کنترل مثبت یا منفی خارج از محدوده تعیین شده توسط بروشور کیت

– خروج استریپ ها از قاب نگهدارنده آنها

– تغییر رنگ کروموژن

– تغییر رنگ مخلوط کروموژن و سوبسترا قبل از افزودن به محیط واکنش

- تغییر رنگ محلول متوقف کننده واکنش
- عدم بروز واکنش رنگی در میکروپلیت پس از افزودن سوبسترا و انکوباسیون آن

مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد بک گراند در زمینه

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
آلوده شدن چاهک های کنترل منفی با کنترل مثبت	در هنگام شستشو از سر ریز شدن محلول شستشو از چاهکهای پلیت به یکدیگر اجتناب کنید.
آلوده شدن ویال کنترل منفی	همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهکها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید برای هر نمونه برداری از نوک سمپلر جدید استفاده کنید توجه داشته باشید که نوک سمپلر به اندازه کافی بلند باشد تا نمونه ها با انتهای لوله سمپلرتماس پیدا نکند تست را با مواد کیت تازه تکرار کنید
شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کنترل منفی با آنزیم کنژوگه	در هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده های آنزیم کنژوگه از چاهک ها خارج شده اند تمامی نمونه ها و مواد را در مرکز کف چاهک ها بریزید و از تماس نوک سمپلر با دیواره و لبه چاهک ها بپرهیزید

مقادیر پائین کنترل مثبت یا جذب نوری پائین

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
در زمان تست مواد داخل کیت به دمای اتاق رسانده نشده اند	مطمئن شوید که تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده اند(۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد
مقدار نمونه کمتر از مقدار لازم است	مطمئن شوید که نوک سمپلرها خوب و محکم فیت شده اند لوله سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشندکالیبراسیون سمپلرها را چک کنید و در صورت عدم کالیبره بودن آنها باید کالیبره شوند
محلول کروموژن – سوبسترا بدرستی تهیه نشده است	محلول کروموژن - سوبسترا را درست قبل ازاستفاده آماده کنید طرز تهیه محلول کروموژن - سوبسترا را دربروشور مطالعه کرده و به آن عمل کنید
آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی کنترل مثبت به باکتری	مجدداً تست را با یک کیت جدید تکرار کنید
زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است	دقت در زمان انکوباسیون
ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت	عملکرد صحیح نم گیر داخل کیسه پلیت را بررسی کنید استریپهائی که مصرف نمی شوند را درکیسه قرارداده و در آن را محکم ببندید
دمای نامناسب در مدت انکوباسیون دمای اتاق برای انکوباسیون سوبسترا خیلی پائین است	بررسی دمای انکوباتور یا اتاق بررسی دمای اتاق
خشک شدن چاهکها در خلال انجام تست	انجام تمام مراحل تست بدون وقفه
افزودن ناکافی آنزیم کنژوگه غلیظ به محلول رقیق کننده برای ایجاد محلول آماده کار	کنژوگه را دوباره با صحت کامل تهیه کنید

ظهور رنگ در تمام چاهکهای پلیت

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
استفاده از حجم کم محلول شستشو و واکنش سوبسترا با ذرات باقی مانده آنزیم کونژوگه	پر کردن چاهکها هنگام شستشو
محلول سوبسترا با کونژوگه آلوده است	بررسی لوله سمپلر ازنظر وجود ذرات مایع یا خشک شده نوک سمپلر به حد کافی بلند باشد که مایع با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند
ظرف محتوی سوبسترا آلوده و کثیف است	ظروف را قبل از استفاده چک کنید
در خلال انکوباسیون سوبسترا پلیت در مقابل نور قرار گرفته	پس از ریختن محلول سوبسترا پلیت را در تاریکی قرار دهید

واکنشهای مثبت کاذب

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
شستشوی نا کافی یا مسدود شدن کانالهای واشر الایزا	اطمینان از صحت عملکرد واشرالایزا انجام کالیبراسیون و تعمیرات روتین
وجود گلبولهای قرمز در نمونه	نمونه را قبل از استفاده سانتریفوژ نمائید
تبخیر نمونه آنزیم کونژوگه در خلال انکوباسیون ۳۷ درجه	پلیت را با برچسب مخصوص بپوشانید
دمای انکوباسیون بالا	دمای اتاق یا انکوباتور را چک کرده و در میزان مورد نظر کالیبره کنید
آلوده شدن چاهکها با آنزیم کنژوگه	آنزیم کنژوگه را با دقت در مرکز کف چاهکها اضافه نموده و از تماس نوک سمپلر با دیواره ها و لبه های چاهکها بپرهیزید
آلوده شدن سوبسترا به آنزیم کنژوگه	بازرسی لوله سمپلر ازنظر عدم وجود ذرات مایع یا خشک شده خارجی و استفاده از نوک سمپلر بلند
غلظت بالای آنزیم کنژوگه در محلول رقیق کننده	از روی دستور کار کیت یک محلول کنژوگه آماده کار تازه بسازید

قدرت تکرار پذیری ضعیف یا دو پلیکیت ناهمخوان

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
اشتباه در تقسیم مواد و نمونه ها	دستگاه دیسپنسور را چک نمائید
وجود حباب در چاهکها	برای از بین بردن حبابها از سوزن استفاده کنید (برای هر چاهک از یک سوزن)
اثر انگشت بر روی پلیت	با محلول شستشو اثر انگشت را پاک کرده و سپس پلیت را خشک کنید
تکنیک شستشوی ضعیف یا غلط	هرچاهک را کاملا با محلول شستشو پر کنید ؛ محلول شستشو سر ریز نشود ، پس از خالی کردن محلول شستشو، پلیت را خوب خشک کنید

حساسیت ضعیف

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
در تهیه آنزیم کنژوگه آماده کار از مقدار مناسب و کافی آنزیم کنژوگه غلیظ در محلول رقیق کننده آن استفاده نشده	تهیه محلول آماده کار تازه با استفاده از بروشور
اشتباه در سمپلینگ آنزیم کنژوگه آماده کار	کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید
زمان انکوباسیون ناکافی دما مناسب نیست یا پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد	تکرار تست با زمان انکوباسیون مناسب انجام تست طبق بروشور و بدون وقفه های اضافی

بالا بودن جذب نوری کالیبراتورها (استانداردها)

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی در دمای بالاتر از آنچه سازنده کیت سفارش کرده باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد	تست را طبق دستور بروشور و بدون وقفه های اضافی انجام دهید
مقادیر کافی از نمونه ها در چاهک ها ریخته نشده	کالیبراسون سمپلرها را بررسی کنید

جذب نوری نمونه خارج از رنج استانداردها باشد

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
غلظت در نمونه بسیار بالاست	نمونه را با کالیبراتور صفر رقیق کرده و تست را تکرار کنید

کلیه جذبهای نوری پائین است

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
دمای اتاق زیر ۲۰ درجه سانتی گراد است	حفظ دمای آزمایشگاه بین ۲۰ تا ۲۵ درجه

کنترل از رنج خارج است

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
آلودگی کنترل	تکرار تست با کنترل جدید
آلودگی کالیبراتورها	تکرار تست با کالیبراتورهای جدید

کروموژن آبی رنگ شده است

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
آلودگی کروموژن	استفاده از کروموژن تازه

بعد از ترکیب کروموژن و سوبسترا محلول آبی رنگ می شود

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
آلودگی کروموژن وسوبسترا	استفاده از کروموژن وسوبسترای تازه

زرد رنگ شدن محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
آلودگی محلول متوقف کننده	استفاده از محلول متوقف کننده تازه

رسوب و ذرات سیاه در چاهکها قبل از خواندن جذب نوری

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
طولانی شدن زمان واکنش آنزیم کنژوگه و سوبسترا	رعایت زمان توصیه شده واکنش آنزیم کنژوگه و سوبسترا

No Signal or Weak Signal

۱- حذف یکی از معرف های کلیدی نظیر کنژوگه

در روش اجرائی کار این حذف منجر به سیگنال منفی (عدم واکنش) می گردد افت تیتر کنژوگه (غیر فعال شدن کنژوگه) یا کاهش اثر ترکیب سوبسترا و کروموژن که معمولا به دلیل آلودگی معرف ها یا در انتهای مصر ف هر کیت درمراکزی که تعداد نمونه کم بوده و کیت مکررا و در چندین نوبت مورد استفاده قرار می گیرد باعث سیگنال منفی می شود

۲- خروج از کالیبر ابزار های حجمی برداشت نمونه و استاندارد

این مسئله منجر به کاهش سیگنال نهائی می گردد به عنوان مثال اگر از منحنی استاندارد ذخیره شده در حافظه دستگاه استفاده نمائیم و ابزار حجمی در حین کار از کالیبر خارج گردد به دلیل اینکه تست و استاندارد در هر ردیف کاری همزمان گذاشته نمی شوند در صورت کاهش برداشت حجم نمونه درسیگنال مربوط به تست ها کاهش و ضعف ایجاد می گردد و نتایج منفی کاذب یا مثبت کاذب بسته به نوع منحنی حاصل می نماید

۳- خراش در کف پلیت ها می تواند منجر به کاهش سیگنال شود

۴- کاهش زمان انکوباسیون یا دمای انکوباسیون

بر خلاف دستور العمل کیت منجر به کاهش سیگنال می گردد که به دلیل کاهش تعداد ترکیب های اتصالی نهائی می باشد

۵- شستشو بیش از تعداد دفعات تعریف شده

شستشوی زیاد و یا استفاده از بافر با PH نامناسب یا دچار آلودگی باکتریال و قارچی منجر به دفع واکنش های اختصاصی ایمن کمپلکس ونهایتا افت و کاهش سیگنال یا رنگ نهائی می گردد

۶- کاربرد فیلتر نامناسب در الایزا منجر به کاهش سیگنال می گردد

۷- شروع انجام تست الایزا بدون انتظار جهت به دمای اتاق رساندن معرف ها و پلیت های کیت الایزا از جمله عوامل شایع افت سیگنال و کاهش رنگ می باشد

۸- حرارت پائین محیط کار بخش الایزا

خراب بودن سیستم گرمایش آزمایشگاه منجر به افت سیگنال و رنگ دهی واکنش و بسته به واکنش غیر رقابتی یا رقابتی منجر به افت یا افزایش کاذب مقادیر تست ها می گردد (خصوصا در شرایط که تست ها بدون استاندارد همزمان خوانده شوند)

High Background

۱- آلودگی چاهک به چاهک نمونه بیماران به دلیل مجاورت با کنترل مثبت یا استاندارد یا نمونه مثبت مجاور

۲- افزایش زمان انکوباسیون یا دمای انکوباسیون

انکوبه کردن بیش از حد یا در دمای بالا بر خلاف دستور العمل کیت منجر به افزایش سیگنال می گردد که به دلیل افزایش تعداد ترکیب های اتصالی نهائی می باشد

۳- شستشو کمتر از تعداد دفعات تعریف شده

این مسئله و یا استفاده از بافر با PH نامناسب یا دچار آلودگی باکتریال و قارچی منجر به عدم دفع واکنش های غیر اختصاصی و نهایتا افزایش سیگنال یا رنگ نهائی می گردد

۴- کاربرد فیلتر نامناسب در الایزا منجر به افزایش سیگنال می گردد

۵- حرارت بالا محیط کار بخش الایزا

خراب بودن سیستم سرمایش آزمایشگاه خصوصا در مناطق گرم و مرطوب شمال یا جنوب کشور منجر به تغییر سیگنال و رنگ دهی واکنش و بسته به واکنش غیر رقابتی یا رقابتی منجر به افت یا افزایش کاذب مقادیر تست ها می گردد (خصوصا در شرایط که تست ها بدون استاندارد همزمان خوانده شوند)

۶- افزایش غلظت و تیتر کنژوگه

افزایش غلظت کنژوگه کیت الایزا به دلیل تبخیر یا تغلیظ (باز ماندن درب ظرف کنژوکه به مدت طولانی در حرارت اطاق در چند نوبت مکرر) یا اشتباه کارخانه سازنده در تعیین تیتر مناسب

۷- تبخیر و تغلیظ نمونه های استاندارد کیت به دلیل باز ماندن طولانی درب ویال استاندارد ها در چند نوبت مکرر

۸- آلودگی پیپت و دیسپنسر مورد استفاده برای سوبسترا با معرف کنژوگه / عمدتا به دلیل اشتباه پرسنلی و استفاده مشترک از یک پیپت است

۹- آلودگی سوبسترا به یون های فلزی و اکسیدان ها یا مجاورت با نور که منجر به تشکیل رنگ زمینه ای آبی پر رنگ (پس از اختلاط سوبسترا و کروموژن) قبل از مجاورت با پلیت می گردد (جهت سوبسترا و کروموژن تیمیدین متیلن بلو)

منابع خطا شایع در روش ELISA

۱- حداکثر زمان مجاز جهت نگه داری خون کامل جدا نشده در ۳۷ درجه ۵ دقیقه می باشد (زمان طولانی تر علاوه بر تخریب ساختار پروتئینی برخی هورمون ها وآنالیت های حساس منجر به آزاد سازی برخی فاکتور های سرمی در محیط شده که منجر به افزایش کاذب جذب می گردد

۲- نمونه حتی الامکان نبایست همولیز / لیپمیک یا ایکتریک باشد دلیل آن تداخل رنگ اضافی در واکنش رنگ سنجی الایزا ریدر است

۳- نمونه های هورمون یا سایرآنالیت ها حداکثر تا ۴۸ ساعت بدون شرایط انجماد در یخچال ۲ الی ۸ درجه قابل نگهداری است و در زمان های بالای ۴۸ ساعت بهتر است در ۲۰ – فریز و نگهداری گردد

۴- ذوب و فریز مکرر نمونه منجر به کاهش سطح هورمون های سرم خصوصا هورمون های تیروئیدی می گردد لذا بهتر است اگر نمونه سرم در چند ردیف کاری نیاز به ذوب دارد در چند ویال فریز و در هر نوبت یک ویال دفریز گردد در ضمن نمونه سرم که از فریزر خارج می گردد به دلیل شیب غلظتی که در ته لوله حاصل شده است بایستی به خوبی قبل از استفاده میکس گردد و به حرارت اطاق رسانده شود .

۵- اجزا کیت پس از خروج از یخچال الزاما بایستی به حرارت اطاق و تعادل دمائی با محیط برسد. دمای پایین با کاهش سرعت واکنش انزیمی منجر به ایجاد جذب های غیر یکنواخت خصوصا در استریپ های ابتدائی پلیت می گردد

۶- رطوبت محیط کار ایمونواسی بایستی کمتر از ۷۰٪ درصد باشد

۷- اسیدی یا قلیائی شدن بافر (به دلیل الودگی قارچی یا باکتریال) منجر به افزایش یا کاهش کاذب جذب می گردد و PH اپتیمال پروسه فعالیت آنزیمی را از بین می برد لذا تهیه تازه به تازه بافر مورد نیاز در هر ردیف کاری قابل توصیه می باشد

۸- دمای محیط آزمایشگاه بایستی ۲۰ تا ۲۵ درجه باشد و با دماسنج دقیق روزانه کنترل و ثبت گردد . دمای بالا محیط افزایش کاذب جذب و بالعکس حاصل می نماید

۹-تغییرات دمائی مجاز انکوباتور ۳۷ درجه ۲± درجه می باشد .

خطای ناشی از شوک حرارتی به پلیت در آنزیم ایمونو اسی Edge effect (اثر لبه ای) می باشد که در قسمت مجاور درب انکوباتور۳۷ و در مجاورت پنجره ها بر روی میز کار هورمون شناسی ممکن است بر روی پلیت رخ داده و منجر به ایجاد جذب های غیر یکنواخت در استریپ های شوک خورده و سایر استریپ می گردد(شوک سرمائی یا گرمائی) لذا قابل توصیه می باشد پلیت ها در عمق انکوباتور قرار داده شود و میز کار هورمون در مجاور پنجره یا سیستم های سرمایش و گرمایش نباشد .

۱۰- ایجاد حباب هوا در چاهک های پلیت مانع تماس کامل کنژوکه و سرم یا بروز جذب های غیر یکنواخت می گردد

۱۱- استفاده از پارافیلم یا کاور چسبنده مناسب در سطح پلیت در هر مرحله از انکوباسیون الزامی بوده و مانع تبخیر و حضور گرد و غبار در محیط حساس واکنش انزیمی می گردد . تبخیر معرف ها منجر به بروز افزایش کاذب جذب نوری می گردد .

۱۲- قرار دادن پلیت در تاریکی پس از اضافه نمودن سوبسترا و کروموژن الزامی است و مانع بروز واکنش جذب اضافی و کاذب می گردد

۱۳- کنترل معرف های کیت الایزا قبل از مصرف الزامی است که شامل :

الف) کنترل سلامت معرف سوبسترا و کروموژن با اختلاط حجم مساوی از کنژوکه و مخلوط سوبسترا و کروموژن در یک لوله نو جداگانه است که بایستی با تغییر رنگ سریع به رنگ آبی همراه باشد

ب) کنترل ماکروسکوپی معرف های کیت به لحاظ کودرت ناشی از الودگی قارچی یا باکتریال و یا حضور جسم خارجی در معرف ها الزامی است

ج) ظهور رنگ ابی در محلول کروموژن بی رنگ قبل از واکنش نهائی نشانه الودگی کروموژن به مواد اکسیدان و غیر قابل مصرف بودن آن می باشد

۱۴- تهیه محلول سوبسترا بیش از حد مورد نیاز و ماندن ان در محیط ازمایشگاه منجر به الودگی قارچی باکتریال معرف و بی اثر شدن معرف می گردد لذا محلول آماده به کار سوبسترا کروموژن بایستی حداکثر یک ساعت قبل از مصرف تهیه گردد و در تاریکی نگه داری گردد .

۱۵- ممانعت از تماس مستقیم دست با محلول کروموژن که حاوی حلال متانول و دی متیل سولفوکساید می باشد که سمیت داشته و دارای جذب پوستی می باشد

۱۶- میکس کردن آرام و زماندار کالیبراتور ها و نمونه ها قبل از شروع کار الزامی است

۱۷- با توجه به تغییر شرایط محیطی و پرسنلی در هر ردیف کاری استفاده از کالیبراتور ها در هر ردیف کاری الزامی است و استفاده از منحنی ذخیره شده در دستگاه صرفا جهت موارد ضروری و در صورت عدم دسترسی به کالیبراتورهای کیت قابل توجیه می باشد . استفاده از منحنی ذخیره کالیبراسیون از مهمترین منابع خطا های سیستماتیک در روش های ایمونو اسی می باشد .

۱۸- جابجائی لیبل ها در کالیبراتور در هنگام مونتاژ کیت ها امکان پذیر بوده و از علل مشاهده منحنی های غیر معتبر می باشد .

۱۹- در بوروشور کیت ها توصیه می گردد در اولین ردیف کاری استاندارد ها (کالیبراتور ها) دوپلیکیت (مضاعف) گذاشته شود تا ضریب دقت و صحت منحنی حاصل بالا برود

۲۰- در صورت عدم همخوانی کانال های سمپلر مولتی کانال (۸ کاناله) یا رسوب نمک در یکی از شاخه های سمپلرمولتی کانال یا واشر احتمال بروز جذب های غیر یکنواخت در نمونه ها و استاندارد های مضاعف وجود دارد

۲۱- زمان خیس خوردن soaking Time

زمان خیس خوردن در فواصل شستشو بایست حداقل ۲۰ و حداکثر ۴۰ ثانیه باشد تا منجر به دفع اتصالات غیر اختصاصی از مجاور اتصالات اختصاصی گردد

۲۲- عدم تکان دادن پلیت(حداقل ۲۰ ثانیه) پس از اضافه نمودن محلول اسیدی توقف دهنده واکنش منجر به عدم اختلاط کامل اسید با معرف ها و عدم توقف کامل واکنش آنزیمی و در نهایت پیشرفت واکنش انزیمی در پایان کار و تغییرجذب نمونه ها و استاندارد ها و شیب منحنی کالیبراسیون در زمان های مختلف می گردد

۲۳- با توجه به اینکه مسیر خوانش و عبور نور در میکرو پلیت الایزا از بالا به پایین است پاک نکردن کف پلیت قبل از خوانش نهائی با الایزا ریدر منجر به ظهور جذب های غیر یکنواخت می گردد خصوصاآلودگی کف پلیت به چربی سطحی پوست دست یا بافر سرریز شده و خشک شده یا الودگی سطح میز کار

۲۴- فاکتور روماتوئیدی مثبت در بیمار منجر به بروز نتیجه مثبت کاذب در تست های الایزا می گردد لذا گرفتن شرح حال و انجام یک تست روماتوئید فاکتور در افراد مشکوک کمک کننده می باشد .

۲۵- آلودگی چاهک به چاهک Well to well contamination

ناشی از سرعت بالای تخلیه یا تخلیه عمودی محلول به داخل میکرو پلیت می باشد یا به دلیل پرکردن بیش از حد بافر داخل چاهک ها می باشد . تکنیک صحیح تخلیه به طور مایل و چسبیده به جدار جانبی و فوقانی چاهک می باشد . جهت جلوگیری الودگی چاهک به چاهک در تست های کیفی یا کمی توصیه می گردد کنترل منفی ابتدا ریخته شود و سپش کنترل مثبت ریخته شود در ضمن تست مجاور کنترل مثبت به طور مضاعف و در انتهای پلیت مجددا ریخته شود .

۲۶- اثر قلابی یا تله ای Hook effect

همان پدیده پروزون در واکنش های ایمونواسی می باشد که به دلیل غلظت بسیار بالا انتی ژن بروز کرده و منجر به بروز جواب های منفی کاذب (بینابینی) می گرد د خصوصا در تست های کمی فریتین / AFP/TSH PSA/CA 125

اثر قلابی یا تله ای به دلیل پرشدن کلیه انتی ژن بایندینگ سایت ها ی کنژوگه توسط انتی ژن های فراوان موجود در محیط می باشد که به عبارتی با نوترالیزه کردن انتی ژن مانع تماس انتی ژن با آنتی بادی کف پلیت می گردد.

راه پیشگیری از اثر قلابی در کیت های الایزا :

۱- اضافه نمودن یک مرحله شستشو قبل از افزودن آنتی بادی نهائی (ثانویه)

۲- استفاده اولیه از رقت مناسب برای نمونه های سرم با استفاده از رقیق کننده خود کیت و در صورت عدم دسترسی استفاده از سرم افراد نرمال

۲۶- جذب زمینه ای بالا پلیت High back ground noise

زمانی که جذب بافر فسفات در چاهک (به تنهائی) بیش از ۰/۱ باشد (بایستی کمتر از ۰/۰۵ باشد) / در جذب زمینه ای بالا می توان با اضافه کردن یک تا دو نوبت شستشو اضافی این اثر زمینه ای را ازبین برد در صورتی که جذب کنترل منفی

کیت بالا ۰/۲ باشد با مجاورت ان با سرم نرمال انسان (۱٪) میتوان سایت های غیر اختصاصی را حذف و جذب نموده تا جواب های مناسب بدست آوریم

۲۷ – تنظیم فیلتر دستگاه توسط فیلتر خاکستری (گری فیلتر) در سه طول موج پایین و متوسط و بالا توسط شرکت پشتیبان (شش ماهه یا سالانه) منجر به افزایش اعتماد به صحت طول موج های اندازه گیری در الایزا ریدر می گردد

۲۸- جهت کنترل تکرار پذیری فتومتر می توان از یک محلول رنگی یکنواخت و پایدار مثل دی کرومات پتاس در میکروپلیت استفاده نمود و دریافت جذب های یکنواخت نشانه سلامت سیستم نوری فتومتر است (در غیر این صورت جذب های غیر یکنواخت بدست می آید

۲۹- DRIFT رانش در سنجش

رانش عبارت است از اختلاف غلظت حاصل از یک نمونه واحد در موقعیت های مختلف ، یک پلیت در یک نوبت کاری ، بهترین راه شناسائی رانش استفاده دوپلیکیت کنترل یا نمونه از قبل تعیین شده در ابتدا و انتهای پلیت در یک ردیف کاری می باشد

دلایل اصلی رانش در سنجش :

۱-شایعترین علت دریفت یا رانش سنجش تعداد آزمایش بالا در یک ران یا ردیف کاری می باشد به نحوی که بین افزودن محلول ها فاصله زمانی طولانی وجود داشته باشد .

۲- ناهمگونی بین چاهک ها

۳- عدم رعایت ترتیب در ریختن ریژنت ها از ابتدا تا انتها پلیت

۴- سرد بودن معرف ها در هنگام شروع به کار منجر به اختلاف دما اولین چاهک با آخرین چاهک و رانش در سنجش می گردد

۵- مخلوط نشدن معرف ها در زمان ریختن به چاهک ها

۶- واکنش کند و سریع محلول متوقف کننده نهائی جهت توقف نهائی واکنش