ELISA METHOD & QUALITY CONTROL

PRESENTED BY : R.GHAFOURI

MS. MEDICAL BIOCHEMISTRY

رئوس مطالب :

- مقدمه
- معرفی انواع روش های ایمنولوژیک و الایزا
- خطاهای قبل از انجام آزمایش در الایزا
- خطاهای حین آزمایش در الایزا
- کنترل و تضمین کیفیت در بخش الایزا
- عیب یابی در الایزا
- منابع

۱. مقدمه

برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ روش اتصال آنزیم به ملکولهای بیولوژیک یا پروتئین ها (EIA: ENZYME IMMUNE ASSAY) توسط دو دانشمند بنام های: EVA PETER PERLMANN & ENGVALI بدلیل وجود خطرات کار با مواد رادیواکتیو معرفی شد و در سال ۱۹۷۱ در دانشگاه استکهلم سوئد و هلند به طور مستقل مقاله‌هایی در این خصوص منتشر گردید.

الایزا یا ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY از روش های متداول سنجش های ایمنواسی می باشد. وجود قابلیت اتصال آنزیم به یک عامل ایمنولوژیک مثل آنتی ژن و یا آنتی بادی و سپس اندازه گیری فعالیت آنزیم از طریق روش رنگ سنجی دلیل سهولت استفاده از این روش می باشد.

ادامه ...

- **<u>دسته بندی انواع روش های ایمنواسی بر اساس ماده لیبل شده:</u>**

1. رادیو ایزوتوپ (I131 و I 135) : رادیو ایمونواسی (RIA)
2. فلوروفور (فلورسئین) : فلورسنت ایمونواسی(IFA)
3. لومینسانس (لومینول) : کمی لومینسانس و الکتروکمی لومینسانس (CLIA/ECLIA)
4. آنزیم (ß-GALACTOSIDASE- ALKALIN PHOSPHATASE & HRP) : الایزا (ELISA)

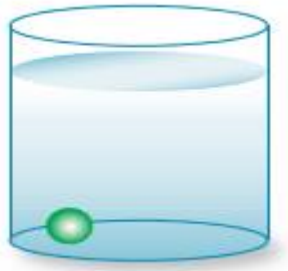
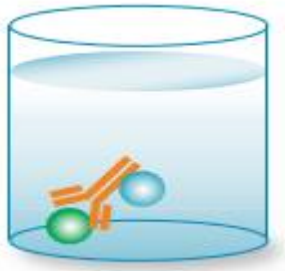
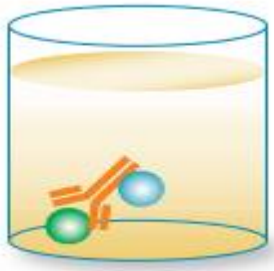
۲. انواع روش های ایمنولوژیک

➢ **هموژن**: کونژوگه آنزیمی باعث تغییر فعالیت آنزیم می گردد. (ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE: **EMIT**)

- آنزیم های مورد استفاده در روش هموژن لیزوزیم – G6PD – بتا گالاکتوزیداز – آمیلاز
- برای اسکرینینگ مثل DRUG ABUSE استفاده می شود.
- با اضافه کردن آنزیم با کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم روبرو هستیم (معکوس و مستقیم)
- دو نوع رقابتی و غیر رقابتی دارد ولی **هموژن رقابتی رابطه سیگنال و غلظت مستقیم** است.

➢ **هتروژن**: کونژوگه آنزیمی باعث تغییر فعالیت آنزیم نمی گردد. (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY: **ELISA**)

الایزای مستقیم

Advantages	Disadvantages
Faster than other ELISA – the technique has fewer steps	Antigen immobilization is not specific - may cause higher background noise than indirect ELISA. Mainly because all proteins in the sample, including the target protein, will bind to the plate Less flexible - each target protein needs a specific conjugated primary antibody No signal amplification - reduces assay sensitivity
Less prone to error – as less reagents and fewer steps are required	
Best for: when analyzing the **immune response to an antigen.**	

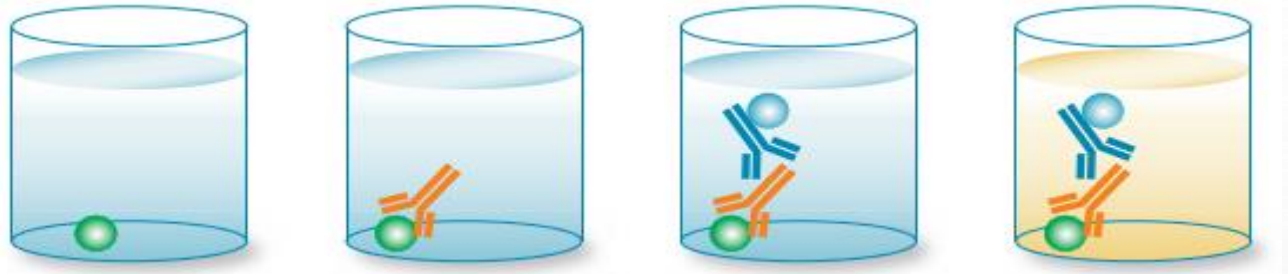
1. آنتی ژن در چاهک کوت می شود.
2. آنتی ژن کوت شده توسط آنتی بادی لیبل شده (کونژوگه) شناسایی می شود.

❖مزیت و ایراد عدم وجود آنتی بادی ثانویه:

✓نبود واکنش های متقاطع

✓سیگنال های قوی برای شناسایی وجود ندارد.

الایزای غیر مستقیم



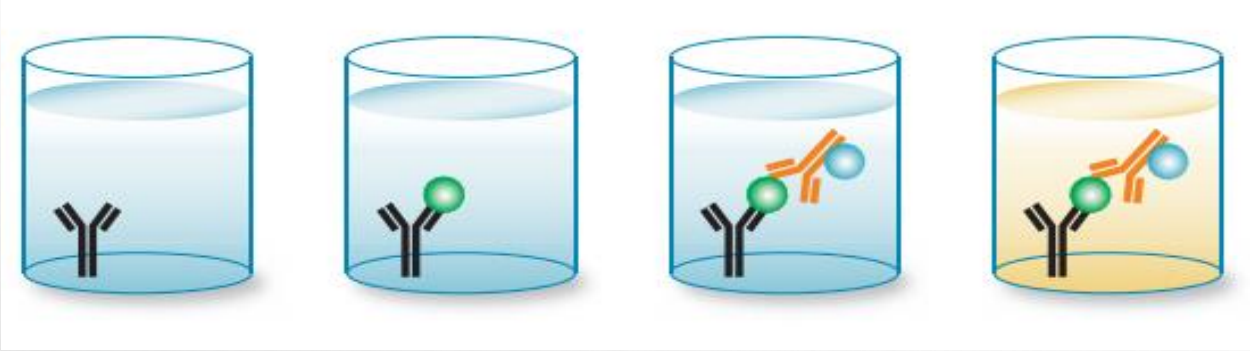
Advantages	Disadvantages
High sensitivity - more than one labeled secondary antibody can bind the primary antibody	Possibility of background noise - secondary antibody may be cross-reactive Longer procedure than direct ELISA technique - additional incubation step for secondary antibody needed
Economical - fewer labeled antibodies are needed	
Greater flexibility - different primary antibodies can be used with a single labeled secondary antibody	
Best for: determining total antibody concentration in samples.	

1. آنتی ژن در چاهک ها کوت می شود.
2. آنتی بادی اولیه (نمونه) به آنتی ژن اختصاصی خود متصل می شود.
3. آنتی بادی ثانویه لیبل شده (کونژگه) کـه مشخصـا علیـه آنتی بادی اولیه است اضافه می شود.

مثال: ANTI-TOXOPLASMA / ANTI-RUBELLA

ANTI- HELICOBACTER PYLORI/ANTI-DSDNA & ANA

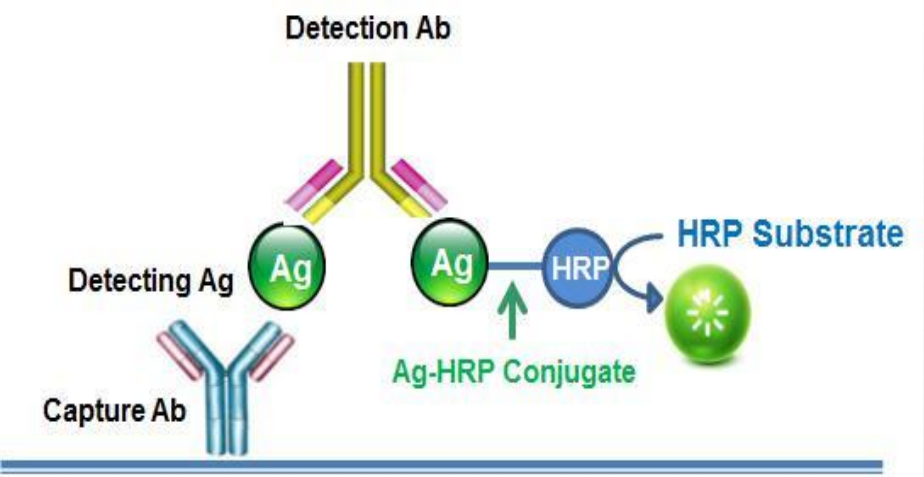
الایزای ساندویچ

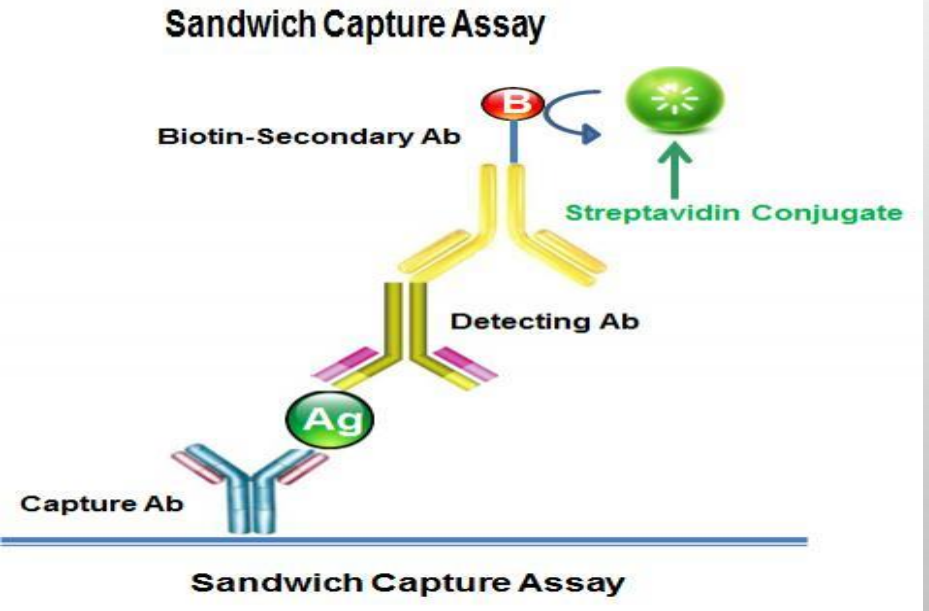


- دو نوع آنتی بادی استفاده می شود: آنتی بادی شکارچی و شناساگر(Detection&Capture)
- هر آنتی بادی باید برای یک اپی توپ ازآنتی ژن اختصاصی باشد و اورلپ با منطقه دیگرآنتی ژن نداشته باشد.
- اطمینان یابیم آنتی بادی هایمان اپی توپ های متفاوت را شناسایی می کنند.
- آنتی بادی شکارچی- مستقیم یا غیر مستقیم- به آنتی ژنی که قرار است شناسایی شود متصل می گردد.

1. تعیین سطح سایتوکاین ها در پاسخ های ایمنی
2. HIV نسل چهار – ساندویچ ترکیبی (آنتی بادی و آنتی ژن کوت می شود.) تشخیص زود هنگام ابتلا به عفونت

Advantages	Disadvantages
High sensitivity - 2-5 times more sensitive than direct or indirect ELISA	Antibody optimization can be difficult - cross-reactivity may occur between the capture and detection antibodies. Needs a standardized ELISA kit or tested antibody pair.
High specificity - two antibodies are involved in capture and detection	
Flexibility - both direct and indirect detection can be used	
Best for: analysis of complex samples, since the antigen does not need to be purified prior to measurement.	





Direct capture

۱- در چاهک ها آنتی بادی شکارچی کوت می شود.

۲- نمونه حاوی آنالیت مورد نظر اضافه می شود

۳- آنتی بادی شناساگر لیبل شده یا کونژوگه اضافه می شود.

Indirect capture

۴- اگر آنتی بادی شناساگر لیبل نشده باشد و آنتی بادی شناساگر ثانویه استفاده شود اختصاصیت و حساسیت روش افزایش می یابد.

الایزای رقابتی/ مهاری

- ✓ پیچیده ترین تکنیک الایزا جهت طراحی می باشد.
- ✓ آنتی ژن / آنتی بادی موجود در نمونه به یک میزان برای اتصال به میزان محدود آنتی بادی/ آنتی ژن-موجود در کیت طراحی شده- رقابت می کند.
- رابطه غلظت آنالیت مورد نظر در نمونه با سیگنال خروجی معکوس می باشد.

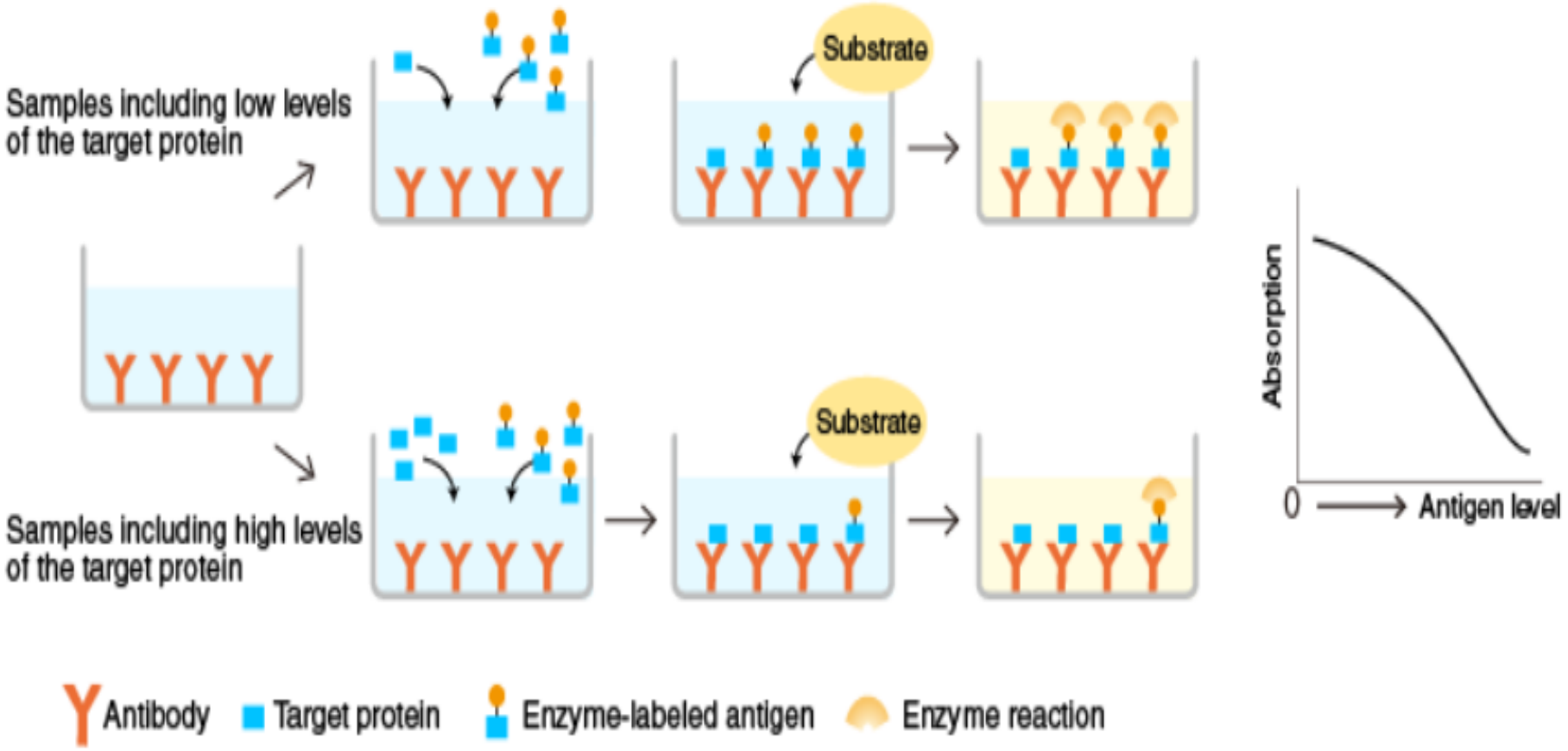
A golden tip in the preparation of the kit: the amount of conjugated labeled antigen and coated antibody should be equal.

- PROCEDURE

1. آنتی بادی شناخته شده در چاهک ها کوت می شود.
2. نمونه حاوی آنتی ژن ناشناخته به همراه آنتی ژن لیبل شده اضافه می شود.
3. سوبسترای مربوطه برای شناسایی استفاده می شود.
4. هرچه غلظت آنتی ژن در نمونه بالاتر جایگاه کمتری برای اتصال آنتی ژن لیبل شده باقی مانده و سیگنال (OD) ضعیفتر خواهد بود و بالعکس.

ادامه ...

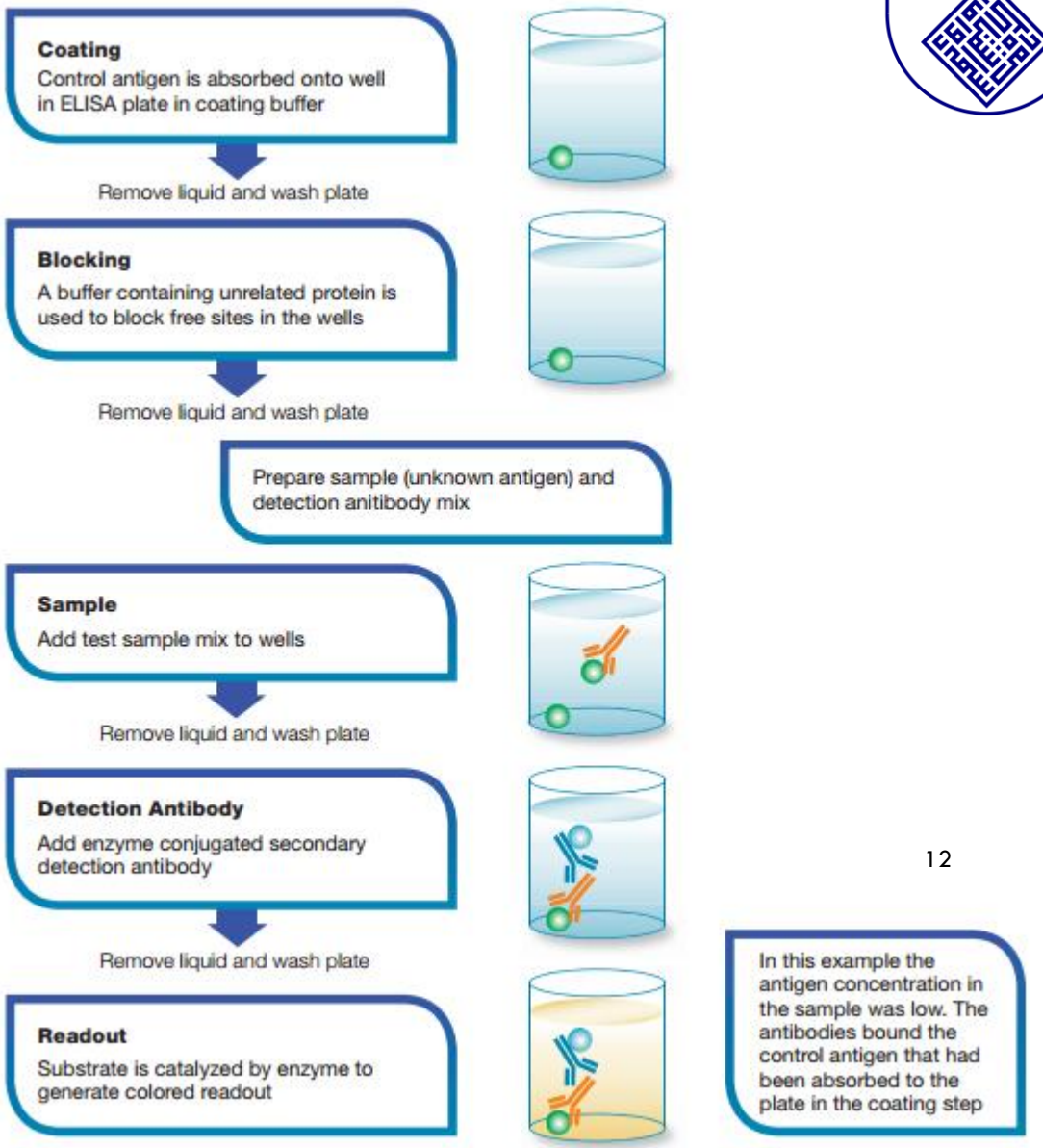
COMETETIVE ELISA



ادامه ...

COMETETIVE ELISA

Advantages	Disadvantages
Main advantage - **no sample processing** is required and crude or impure samples can be used	Same limitations as base ELISA - as each ELISA technique can be adapted to a competitive format
More robust - **less** sensitive to sample dilution and sample **matrix effects** than the sandwich ELISA	
More consistent - less variability between duplicate samples and assays	
Maximum flexibility - it can be based on direct, indirect or sandwich ELISA	
Best for: commonly used when only one antibody is available for the antigen of interest. It is also suitable for detecting small antigens that cannot be bound by two different antibodies such as in the sandwich ELISA technique.	



HOOK EFFECT

- پدیده هوک (پدیده قلاب) عبارت است از کسب نتایج منفی کاذب در غلظت بالای آنالیت. در این پدیده غلظت آنالیت از بالاترین استاندارد نیز بسیار بالاتر است.
- بدلیل ریختن همزمان آنالیت (نمونه) و آنتی بادی نشاندار در روش های ساندویچ یک مرحله ای بیشتر اتفاق می افتد. فزونی اتصال آنالیت به جایگاه های اختصاصی و غیر اختصاصی هر دو آنتی بادی (کوت شده و نشاندار آزاد)
- در تست هایی مانند : AFP ، CA-125 ، FERRITIN ، PSA ، PRL ، TSH

- **از بین بردن اثر هوک :**

۱- افزودن مرحله شستشو قبل از آنتی بادی ثانویه (مرحله اول اضافه کردن سرم بیمار در نتیجه اشغال سایت های آنتی بادی و سپس در مرحله دوم اضافه کردن ماده نشاندار که سایت های خالی را پر می کند.)

۲- تهیه رقت مناسب از نمونه (نمونه های منفی با رقت بالاتر از همان سرم تکرار شود.)

➢ توصیه : شرکت های سازنده موظف به ذکر محدوده شروع پدیده هوک هستند، لذا از کیت هایی استفاده شود که در آنها شروع پدیده در غلظت های بالای آنالیت مشاهده می شود

اجزا کیت های الایزا

۱- پلیت (SORBENT) : ۱- پلی استیرن ۲- پلی وینیل

نقش : جداسازی عوامل درگیر در واکنش AG – AB از عوامل آزاد (غیر درگیر در واکنش)

۲- استاندارد یا CUT OFF CALIBRATOR : استفاده از کل پانل استاندارد و یا کنترل های مثبت و منفی در ابتدای شروع استفاده از کیت، همچنین در هر ران کاری الزامی می باشد.

۳- کونژوگه – آنزیم: (آنتی بادی ثانویه) چرا آنتی بادی استفاده می کنیم؟ چرا کونژوگه می نامیم؟

ویژگی آنزیم: ۱- پایداری ۲- سهولت اتصال به بیومولکول ها ۳- سوبسترا آن توانایی ایجاد رنگ داشته باشد

هیچگاه از آب مقطر به جای بافر شستشو استفاده نگردد

۴- سوبسترا : یک ماده کروموژنیک است که پس از تجزیه آنزیمی رنگ تولید می کند. **(TMB)**

۵- متوقف کننده : معمولا اسید سولفوریک برای توقف روند واکنش

۶- بافر شستشو : سالین بافر فسفات - محیط بافری پایداری را برای حفظ ساختار آنتی بادی فراهم می کند

۱-شستشوی مواد مزاحم ۲- بلوکه کردن نقاط اتصال آنتی بادی های اضافی نشسته کف چاهک توسط موادی مانند ۳TWEEN- تنظیم PH

۷- سرم کنترل

درصورت وجود آزاید در سرم کنترل، در روش هایی که لیبل پراکسیداز دارند، آزاید باعث اختلال عملکرد و ساپرس شدن آنزیم می گردد.

۳.خطاهای قبل از انجام آزمایش

1. درخواست اشتباه پزشک
2. ثبت اطلاعات هویتی اشتباه از بیمار (جنسیت – سن و ...)
3. اطلاعات ناکافی از شرایط بالینی بیمار(سابقه بیماری و یا مصرف دارو و ...) سایمیتیدین، کلومیفن، لوودوپا باعث افزایش FSH
4. نداشتن آمادگی قبل از انجام آزمایش (ناشتایی – فعالیت فیزیکی – وضعیت هنگام نمونه گیری)
5. جمع آوری نمونه در زمان نامناسب (عدم توجه به تغییرات شبانه روزی هورمون ها)
6. ظروف مناسب برای جمع آوری نمونه (ظروف پلاستیکی - ظروف شیشه ای – ژل تیوب) PTH، ACTH، پروژسترون، داروهای ضد تشنج
7. نوع نمونه جمع آوری شده (خون کامل – سرم – پلاسما) هپارین اختلال در ACTH - EDTAمنجر به مهار آنتی بادی می شود.
8. کیفیت نمونه جمع آوری شده (بستن تورنیکه - همولیز- ایکتریک - لیپمیک) همولیز موجب کاهش کاذب FREE T4
9. شرایط جداسازی: هموسیستئن، گاسترین، گلوکاگون و ACTH
10. دمای نگهداری نمونه

✓ SHEAR EFFECT : سرمهای که برای تست الایزا کنار گذاشته می شوند باید دردمای 20°C- نگهداری شوند، نگهداری در 4°C- به دلیل یخ زدن آرام و ایجاد فرصت برای تولید کریستالهای آبی در سرم باعث آسیب به ساختمان سوم پروتئینی در زمان ذوب می شود که به اثر برشی یا قیچی معروف است. (FT3 وFT4 , FERRITIN)

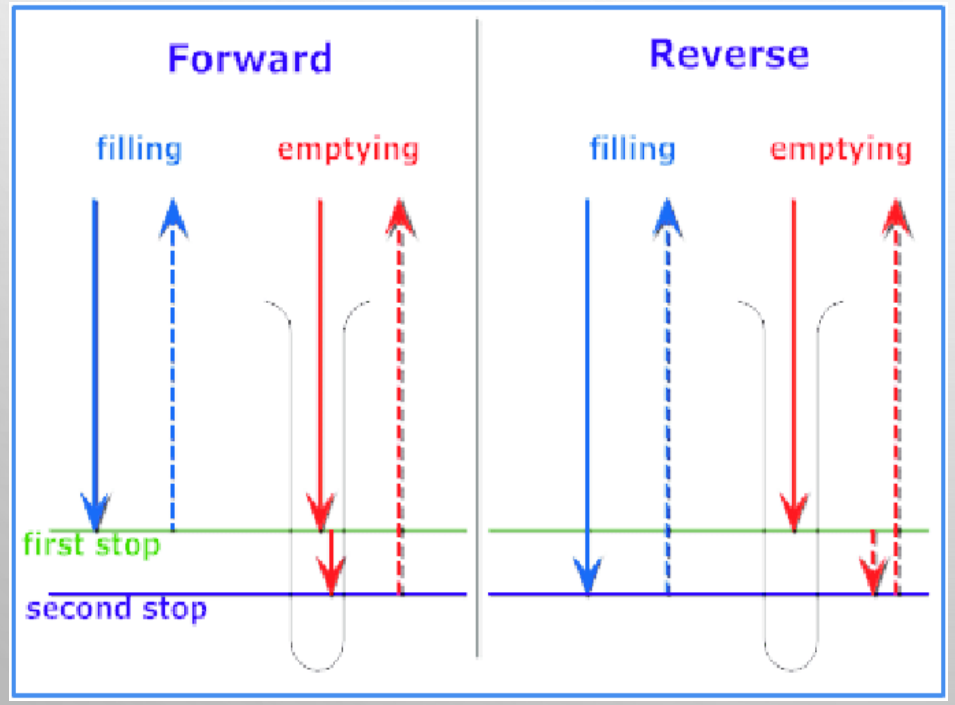
۴.خطاهای انجام آزمایش

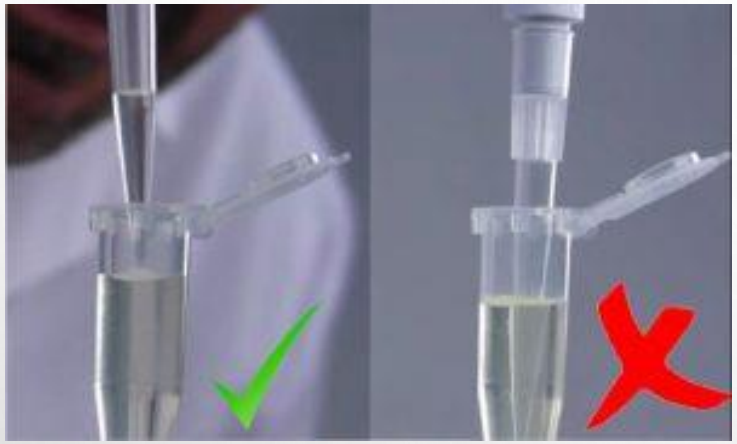
1. pipetting

1) اطمینان از اینکه tip به طور محکم بر روی پیپت متصل شده باشد.

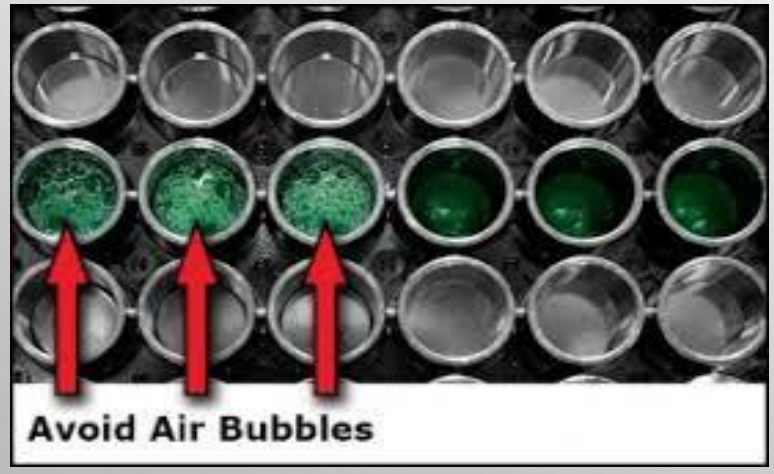
2) روش پیپت کردن معکوس انجام گردد.

- ✓ مواد چگالتر و کف زا
- ✓ رقت سازی

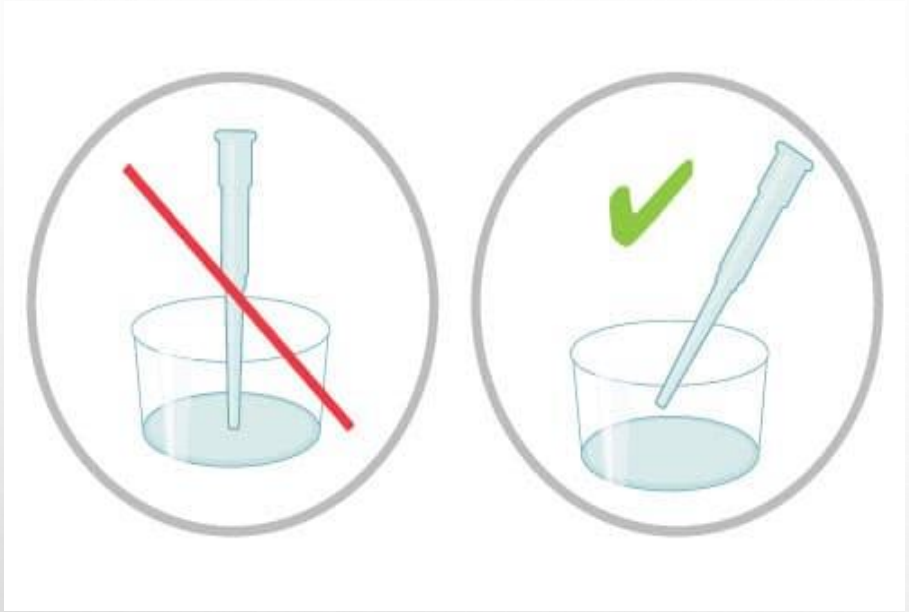




3) از فرو بردن tip به انتهای محلول جهت برداشت پرهیز گردد.

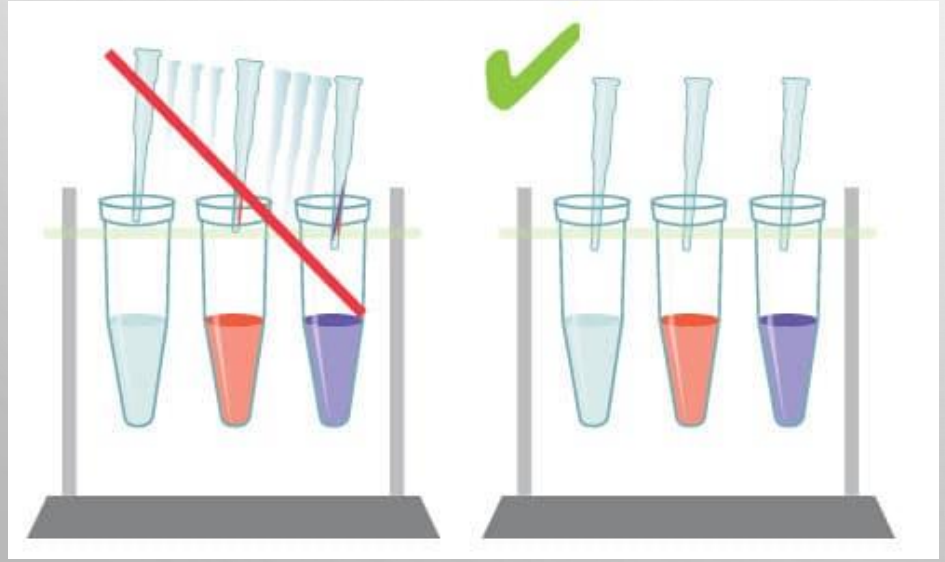


4) از عدم وجود حباب هوا در چاهک یا tip اطمینان حاصل شود.



3) هنگام پیپت کردن، نوک پیپت زاویه دار نگه داشته شود و کف چاه را لمس نکند.

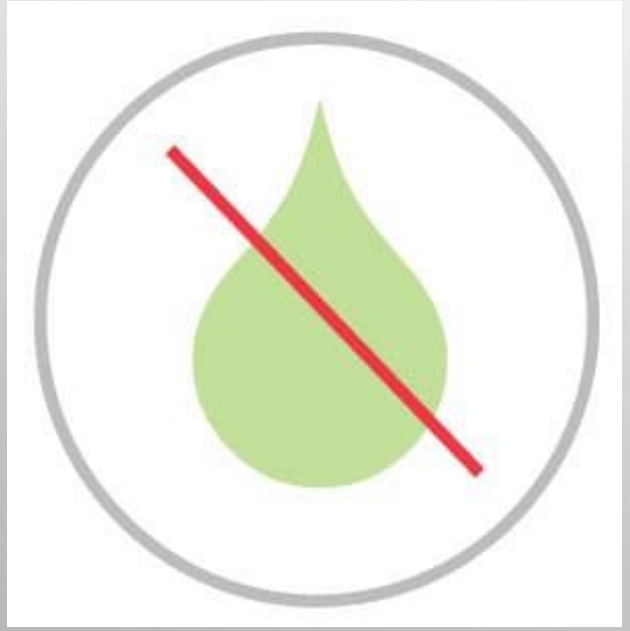
- ONLY USE FIRST STOP !
- DO NOT DRIP
- DO NOT PRESS HARD INTO WELL
- DO NOT USE TOO ACUTE AN ANGLE
- MAKE SURE TIP TOUCHES SIDE OF WELL AND LIQUID



4) از tip های مجزا برای هر استاندارد به منظور جلوگیری از آلودگی استفاده شود.

2.Tempreture

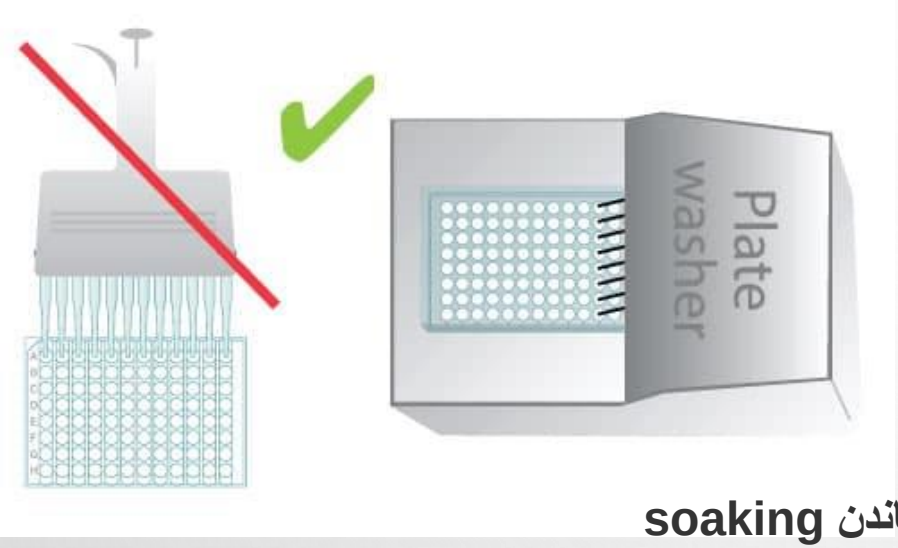
1) کلیه ریجنت ها به دمای اتاق رسانیده شود مگربر خلاف بروشور کیت باشد.
2) دمای انکوباسیون رعایت گردد. معمولاً در دمای ۲۵ یا ۳۷ درجه صورت می‌گیرد.



3.Leaching

1) برای جلوگیری از آسیب به آنتی بادی های کوت شده کف چاهک و کاهش OD، چاهک های باقیمانده در پاکت حاوی ماده خشک کن توسط رطوبت نگهداری شود.
2) از فویل برای پوشاندن سطح پلیت در مرحله انکوباسیون استفاده نگردد.
3) پلیت ها تا قبل از رسیدن دمای پلیت به دمای اتاق از کیسه خارج نگردد.(تشکیل بخار بدلیل تغییرات سریع درجه حرارت و کاهش پایداری پلیت)

4. WASHING



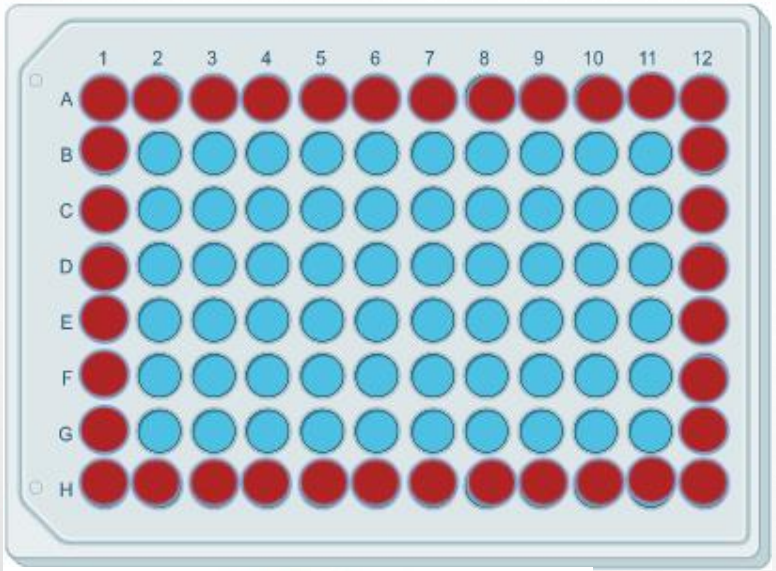
1) به منظور جلوگیری از زمینه های بالاتر به شدت توصیه می شود از پلیت واشر استفاده شود.

2) غلظت محلول بافربه دقت تهیه گردد.(بافر منجر به غلیظ منجر به کاهش جذب و بافر رقیق ایجاد جذب زمینه ای بالا)

3) PH محلول کنترل گردد. (محلول شستشوی آماده به کار و آب مقطر)

4) هنگام شستشوی پلیت ها، چه به صورت دستی و چه با واشر 30 ثانیه زمان خیساندن soaking time رعایت گردد.

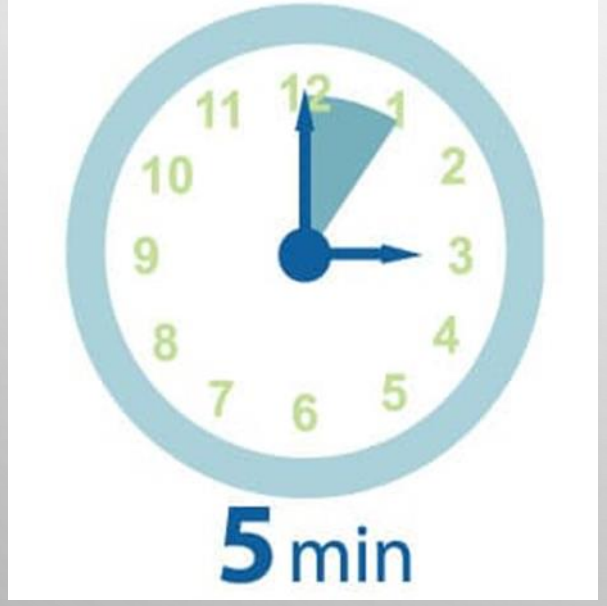
5) انتقال ناخواسته نمونه یا ریجنت از یک چاهک به چاهک دیگرcarry over، این اتفاق زمانی که تستهایی با تیتر بسیار بالا و منفی به طور همزمان داریم حائز اهمیت است. عدم استفاده از پی ست و یا سرنگ (پلیت واشر یا سمپلر 8 کاناله)



5.Edge Effect

۱) چاهک های حاشیه ای OD بیشتر یا کمتری به نسبت کل پلیت دارند.

✓ حساس بودن سوبسترا به اختلاف دما و نور – انکوباتور غیرکالیبره



6.TIME

1) به زمان های انکوباسیون بسیار توجه کنید.

به عنوان یک راهنمای کلی، زمان انکوباسیون نباید بیش از +/-۵ دقیقه در هر ساعت تغییر کند.

7.Tapping

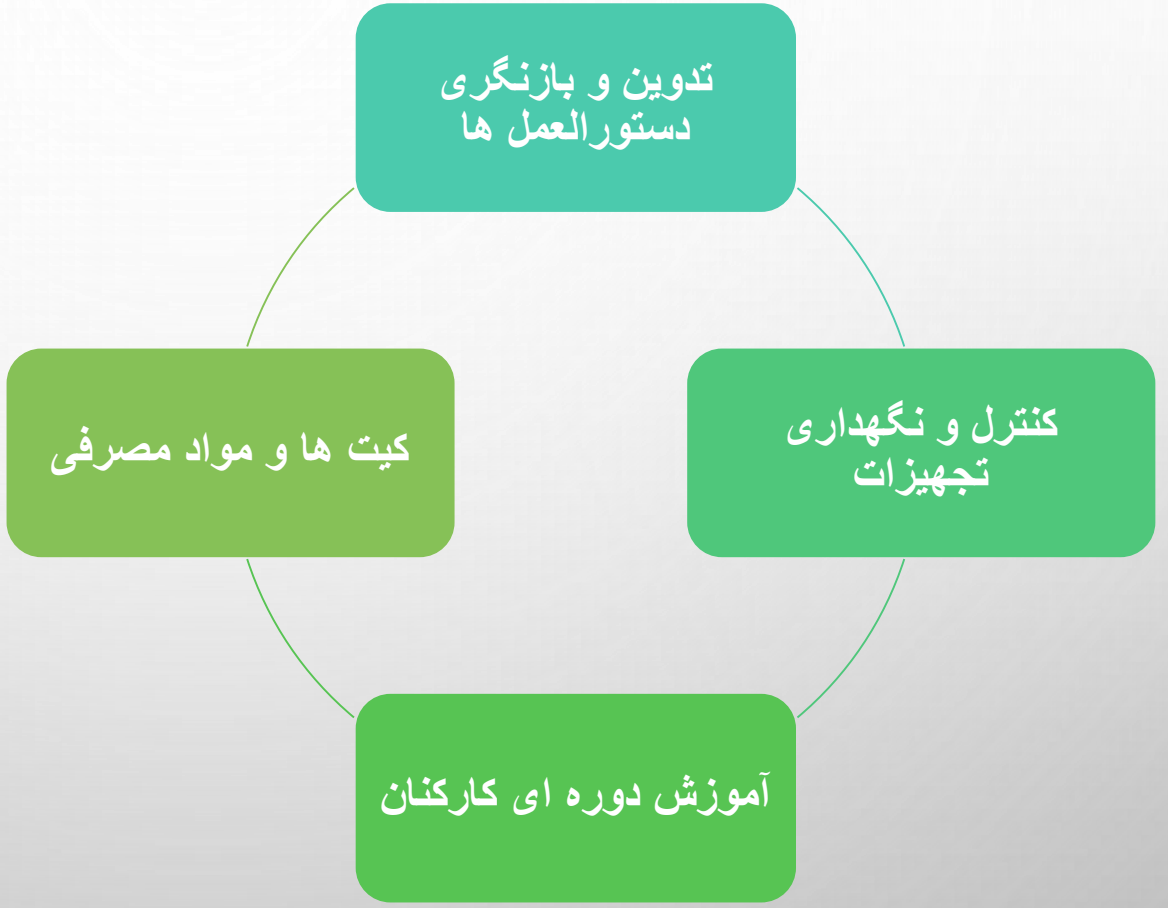
1) در صورت ضربه شدید ممکن است باعث جدا شدن فیزیکی کمپلکس های تشکیل شده و درنهایت کاهش OD شوید.
2) عمل ضربه زدن برای خارج شدن مایعات اضافی از پلیت (Tapping) تغییر در خوانش OD

8.CONTAMINATION

1) بررسی کارائی کونژوگه و سوبسترا به ترتیب زیر :
- ✓ لوله اول 10میکرولیتر کونژگه+200 سوبسترا = رنگ آبی سپس + 100 میکرولیتر stop=رنگ زرد
- ✓ لوله دوم 100 میکرولیترسوبسترا+ 100 stop = عدم تغییر رنگ

از مخلوط کردن دو سوبسترا یا دو کونژوگه آنزیمی از دو سری ساخت با شماره های مختلف اجتناب کنید

۵.کنترل و تضمین کیفیت در الایزا



ادامه...

۱- دستورالعمل انجام آزمایش مطابق با الزامات استاندارد درآزمایشگاه

۲- دستورالعمل انجام کنترل کیفیت و نحوه تفسیر نتایج با تایید مسئول فنی آزمایشگاه مشتمل بر نحوه:

I. استفاده از مواد کنترلی معتبر کنترل کیفیت تجهیزات (الایزا ریدر و سمپلر و دستگاه واشر)

II. ارزیابی و تایید صحت کیت

III. ارزیابی صحت تست ها

۳- نگهداری سوابق انجام آزمایشات و کنترل کیفیت شامل :

I. نتایج الایزا بصورت الکترونیکی یا پرینت دستگاه (**CURVE-** مشخص بودن **OD** ها و غلظت های خوانش شده- مشخص بـودن کنترل در پرینت نتایج- قابلیت ردیابی بیماران

II. نام انجام دهنده- نام و شماره سری ساخت کیت و مواد کنترلی مورد استفاده- تاریخ انقضاء کیت- تاریخ انجام آزمایش

III. تعریف خطای مجاز برای تست های کمی و مقایسه با منابع معتبر

IV. رسم نمودار های کنترل کیفیت و تفسیر نتایج

V. ثبت موارد عدم انطباق و اقدامات اصلاحی و تکرار آزمایشات (مانند نمونه های با غلظت بالا و حد مرزی)

مواد کنترلی

- سرم کنترل مستقل از کیت یا سرم کنترل داخل کیت
- در هر سری کاری از دو سطح نرمال و پاتولوژیک – کنترل مثبت و منفی
- تفسیر نتایج با استفاده از قوانین وستگارد، لوی جنینگ وWHO به صلاحدید مسئول فنی
- تغییر مداوم نوع و یا سری ساخت کیت مقایسه با بروشور کیت

➢ توجه گردد دامنه عدم دقت کیت نباید بزرگتر از عدم دقت مجاز تعیین شده تست در آزمایشگاه باشد.

➢ در موراد نبود سرم کنترل در برخی تست های خاص با استفاده از نمونه های شناخته شده قبلی تفسیر گردد.

➢ در نوبت های کاری پر فرکانس انجام دوپلیکیت تست توصیه می شود.

الایزا ریدر

نگهداری تجهیز

- اطمینان از تمیز بودن سیستم و کانال های نوری
- گرم شدن ۳۰ دقیقه ای دستگاه در ابتدای شروع کار
- محل قرارگیری یک میز ثابت و دور از وسایل ارتعاش زا باشد
- بررسی مسیر حرکتی و ورود و خروج پلیت

کنترل کیفیت تجهیز

- صحت فتومتریک
- تکرار پذیری
- خوانش خطی **(LINEARITY)**
- سیستم **ALINGNMENT** به منظور اطمینان عدم وجود زاویه حین حرکت در مسیر دستگاه (خوانش از وسط چاهک ها)

سمپلر

1. با استفاده از پارانیتروفنل و طول موج۴۰۱- ۴۰۵ نانومتر در برابر سود۰/۰۱ نرمال
2. با استفاده از رنگ سبز خوراکی در طول موج ۶۲۰ -۶۳۰ نانومتر

➢**عدم دقت ≥ ۲ ٪ CV درصد**

➢**عدم صحت≥ ۳ ٪ BIAS درصد:** از ابزار شیشه ای کالیبره استفاده شود مانند بالن ژوژه کلاس A

❖**با توجه به محدودیت های موجود در روش توزین، انجام آن پیشنهاد نمی گردد.**

پلیت واشر

❑نگهداری تجهیز

- بررسی موقعیت سوزن ها از نظر تنظیم موقعیت افقی و عمودی (چاهک تخت : نزدیک به کف – چاهک گرد: مرکز کف چاهک)
- بررسی یکسانی در پر شدن چاهک ها
- موثر بودن مکش
- تمیز بودن سر سوزن ها
- توجه به تاریخ اعتبار محلول بافر
- استفاده از وایتکس بجای محلول RINSE در صورت وجود بیمار مثبت

❑کنترل کیفی تجهیز

- 100میکرولیتراز کونژوگه در یک استریپ ← 5 دقیقه انکوبه ← 4 بار شستشو ← 100 میکرولیتر کروموژن ← 5 دقیقه انکوبه (RT & DARK)
- 100 میکرولیتر متوقف کننده ← خوانش با فیلتر 450 نانومتر و رفرانس 630 OD باید زیر 0/1 باشد .

تصدیق و ارزیابی صحت کیت

- نمونه های بیماران
- غلظت آنالیت در دامنه قابل گزارش کیت باشند
- انجام ارزیابی نمونه در کوتاهترین زمان ممکن (در طی ۲ساعت)
- هر گونه اعمال تغییر در روش انجام آزمایش مانند تغییر دما- حجم برداشتی- زمان انکوباسیون و ... نیازمند صحه گذاری مجدد کیت می گردد.

تست های کمی :

1. انجام پانل کامل استاندارد در ابتدای شروع کیت و مقایسه OD های استاندارد با بروشور کیت
2. آزمون رگرسیون
3. با استفاده از حداقل ۵ نمونه در غلظت های مختلف محاسبه اختلاف خوانده های مربوط به هر نمونه در نظر گرفتن کمتر از CV مجاز تست یا TAE ½ تست

تست های کیفی :

✓ با استفاده از نمونه های BORDLINE

نکته : نحوه برخورد با موارد مشکوک : تکرار با روش مرجع و یا گزارش نتایج بصورت مشکوک

ارزیابی صحت تست

۱- استفاده از CRM/RM یا مواد مرجع یا مواد مرجع تایید شده (CERTIFIED REFERENCE MATERIALS)

۲- شرکت در برنامه ارزیابی کیفیت خارجی و تعیین بایاس با استفاده از PEER GROUP MEAN

BIAS = EXPECTED – MEASURED/ EXPECTED X 100

۳-آزمون مقایسه روش ها، که به منظور تایید صحت تست هایی که در برنامه ارزیابی کیفیت خارجی وجود ندارند با استفاده از SPLIT SAMPLE و مقایسه هم خوانی انجام می گردد.

ارزیابی عدم دقت پرسنل

- **انجام تکرار پذیری سمپلینگ پرسنل**
- **یک نمونه رنگی زرد مانند محلول کراتینین در بیوشیمی (اسید پیکریک) در سه غلظت مختلف درست کنید (OD=0.4-1.1-2.1مناسب است) و ۱۰۰ لاندا از آن را در۲۰ چاهک تمیز الایزا ریخته و از ODهای بدست آمده خود CV بگیرید، عدد شما باید کمتر از ۳٪ باشد.**

۶.(TROUBLESHOOTING)عیب یابی در الایزا

- **عدم تولید سیگنال و یا تولید سیگنال ضعیف**

۱- حذف یا فراموش شدن انجام یک مرحله از الایزا مثلا اضافه نکردن کونژوگه آنزیمی یا سوبسترا عدم تهیه مناسب سوبسترا بویژه در مواردی که سوبستراها بصورت دو محلولی هستند.

۲- محلول شستشو غلیظ تهیه شده است.

۳- کونژوگه آنزیمی یا سوبسترا غیر فعال شده است.

۴- درجه حرارت انکوباسیون مناسب نمی باشد و حرارت انکوباسیون کمتر از حد لازم است. حجم سوبسترای اضافه شده به چاهک ها کافی نمی باشد.

۵-استفاده از فیلتر نامناسب برای قرائت نتایج استفاده از فیلتر ۴۰۵ به جای ۲۵۰ نانومتر باعث کاهش جذب نوری قرائت شده میشود

۶- معرفها به درجه حرارت اتاق نرسیده اند و هنوز برای انجام آزمایش سرد هستند.

۷- خراشیده شدن ته چاهک با نوک سمپلر

۸- معرف های کیت منقضی شده اند.

۹- معرف ها به دلیل نگهداری غیر صحیح با کاهش فعالیت مواجه شده اند.

ادامه...

- **جذب زمینهای بالا افزایش جذب نوری استانداردها یا نمونه ها**

1- غلظت کونژوگه آنزیمی زیاد است و رقت کونژوگه طبق بروشور تهیه نشده است.

۲- درجه حرارت انکوباسیون نامناسب است و درجه حرارت بالاتر از حد تعیین شده برای سنجش میباشد.

۳- فرآیند شستشو کافی نبوده است و یا محلول شستشو بصورت رقیق تهیه شده است.

۴- آلودگی آنزیمی در نمونه های سرمی وجود دارد.

۵- آلودگی متقاطع با دیگر نمونه ها و یا با کنترل مثبت اتفاق افتاده است.

۶- برای قرائت جذب نوری از فیلتر صحیح استفاده نشده است در صورتی که توصیه شده باشد از فیلتر رفرانس استفاده شود و این امر انجام نشود یک جذب زمینه ای بالا مشاهده می شود.

۷- سوبسترا قبل از مصرف با نور در تماس بوده است.

۸- محتویات چاهک ها در طی انکوباسیون تبخیر شده اند.

۹- پی پت نوک سمپلر با سوبسترا یاکونژوگه آنزیمی آلوده شده است

۱۰- سوبسترا با یونهای فلزی یا عواملی اکسید کننده آلوده شده است.

ادامه...

➢شکل منحنی استاندارد نامناسب است

۱-شستشو بخوبی انجام نشده است.

۲-رقیق سازی محلولها به خوبی انجام نشده است و یا خطا در پی پت کردن معرفها وجود دارد.

۳-معرفها به خوبی مخلوط نشده اند.

۴-ته چاهک ها از طرف خارج آلوده شده است و کثیف می باشد.

۵-از معرفهایی با سری ساخت متفاوت استفاده شده است.

➢دقت ضعیف یا دو پلیکیتهای ضعیف

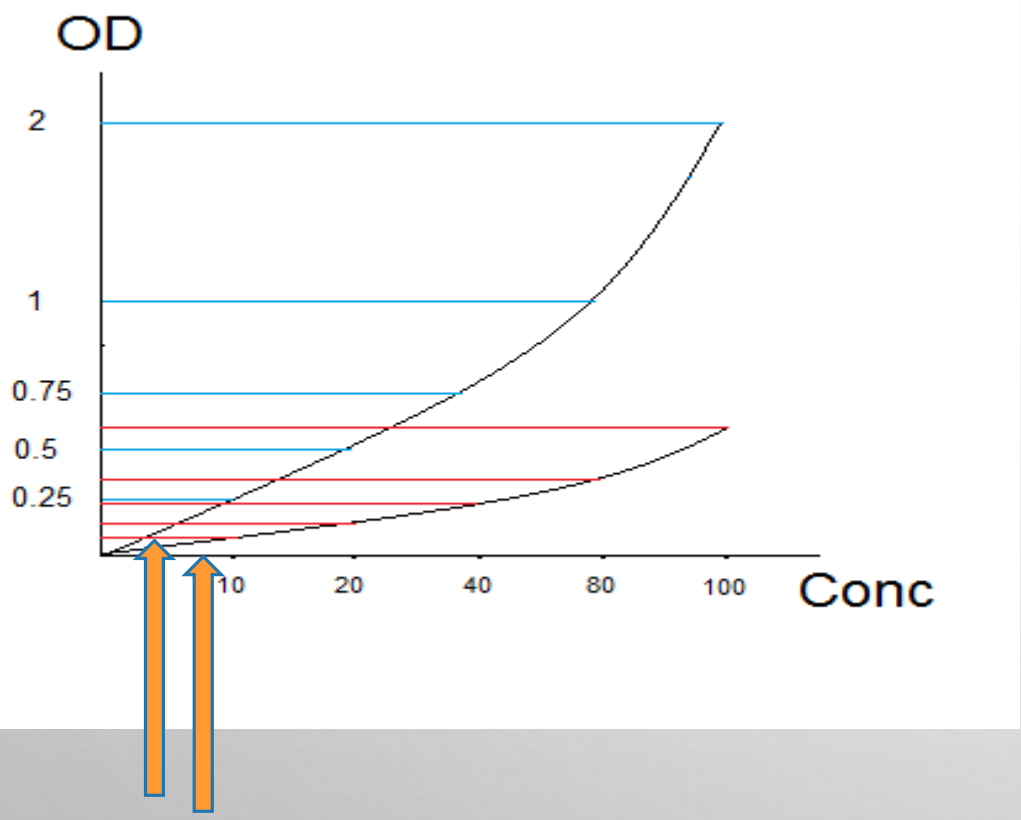
۱-خطا در پی پت کردن معرفها

۲- خراش دادن سطح چاهک ها با نوک سمپلر انتقال محلول ها از چاهک های کناری

۳- استفاده از حجم نامناسب محلولها وجود رسوب یا پارتیکل در نمونه و کنترلها

۴- کثیف بودن سطح خارجی چاهک ها

۵- وجود اثر حاشیه ای ((EDGE EFFECT)



مثال : به شکل مقابل دقت کنید، نمودار بالا کیت سالم و نمودار پایینی همان کیت ولی با نصف عملکرد آنزیمی محلولهاست، همانطور که می بینید با اینکه **OD** استانداردها با تناسب یکسان کم شدند ولی با کاهش **OD**ها، فاصله بین خطوط نیز کم شده و همین امر حساسیت تست را پایین می آورد و در عمل ما را در تعیین مقادیر کم آنالیت ناتوان می سازد.

ادامه...

- **تمام چاهک ها دارای رنگ هستند. سوبسترا آلوده شده است.**

۱- محلول شستشو آلوده شده است.

۲- رقیق سازی به خوبی انجام نشده است.

۳-شستشو به خوبی انجام نشده است.

- **تمام چاهک ها بدون تولید سیگنال هستند و فاقد رنگ می باشند.**

۱- یکی از مراحل الایزا فراموش شده است.

۲- کونژوگه آنزیمی غیر فعال شده است. با مخلوط کردن کونژوگه و سوبسترا از فعالیت این دو معرف اطمینان حاصل می شود)

۳- شرایط نگهداری کیت مناسب نبوده است.

۴- شستشوی زیاد چاهکها و یا غلیظ بودن زیاد محلول شستشو

درکیتهای نامرغوب الایزا در صورتی که از آنتی بادی های ناخالص در تولید کف چاهک ها استفاده شود، اتصال آنتی ژن به آنتی بادی ها کمتر بوده و باعث کاهش OD می شود

Problem	Possible Source	Correction
Poor background	Contaminated negative control well	Change and use new pipette tips, containers and sealers
Poor R-squared	Improper standard curve preparation	Ensure accurate dilution procedure
	Improper standard curve	Ensure accurate dilution of the standard
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
	Reused pipette tips, containers and sealers	Change and use new pipette tips, containers and sealers
Low OD Values	Improper standard curve preparation	Ensure accurate operation of the dilution
	Improper standard curve dilution	Ensure accurate dilution of the dilution
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
	Incorrect incubation times	Ensure sufficient incubation times
	Incorrect incubation temperature	Reagents balanced to room temperature
	Conjugate or substrate reagent failure	Mix conjugate and substrate; color should develop immediately
	No stop solution added	Follow the assay protocol in the kit manual

Replicates Within a Plate Show Poor Reproducibility

Possible causes	Recommended troubleshooting
Excessive time was taken to add samples controls or reagents to the assay plate.	Be sure to have all materials set up and ready to use quickly. Use a multichannel pipette to add reagents to multiple wells simultaneously. Rack controls with samples and dispense them onto the plate at the same time as the samples.
Multichannel pipette was not functioning properly.	Verify pipette calibration and check that tips are on tight. Be sure all channels of the pipette draw and dispense equal volumes.
There was inconsistent washing or washer system malfunctioning.	Verify the performance of the washer system. Have the system repaired if any ports drip or dispense/aspirate poorly.
There was poor distribution of antibody in the sample.	If the sample was thawed or refrigerated, make sure it was mixed prior to dilution. Diluted samples also need to be mixed prior to adding them to the plate.

منابع

- راهنمای فنی روش های کسب اطمینان از اعتبارنتایج آزمایشگاهی ← ابلاغی از آزمایشگاه جامع سلامت
- اصول طراحی و استقرار سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاه پزشکی ← تالیف : دکتر حسین دارآفرین
- مدیریت و کنترل کیفی تجهیزات در آزمایشگاه پزشکی ← تالیف : دکترحسین دارآفرین
- نکات عملی و رفع مشکل در تست های الایزا ← تالیف : دکتر مهدی ابوترابی
- روش های عملی در ایمنولوژی ← تالیف : دکترعبدالرضا وارسته
- جزوات و کارگاه های آزمایشگاه جامع سلامت
- بیوشیمی هنری – دیویدسون 2017
- WWW.BIO-RAD.COM
- HTTPS://PISHTAZTEB.COM/

توفیق رفیق طریقتان باد

شهریور1402