

## الایزا ریدر یا خوانشگر الایزا

### اصول:

دستگاه خوانشگر میکروپلیت که فتومتر خوانشگر میکروپلیت یا خوانشگر الایزا ELISA نیز نامیده می‌شود، یک اسپکتروفتومتر اختصاصی است و برای خواندن نتایج آزمایش الایزا طراحی شده است. این روش در ایمونولوژی و سرولوژی کاربرد مستقیم دارد. از کاربردهای دیگر، تأیید حضور آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن یک عامل عفونی در یک موجود زنده و همچنین آنتی‌بادی‌های حاصل از mmm واکسیناسیون و یا اتوآنتی‌بادی‌ها در بیماری‌هایی مثل روماتیسم است. در نهایت، جذب محصول واکنش ایجاد شده با اسپکتروفتومتر خوانده می‌شود.

اجزاء اصلی یک دستگاه الایزا ریدر شامل یک منبع نور، یک صافی، یک ظرف، یک ردیاب نور و یک وسیله نشان‌دهنده می‌شود. نور یا روشنایی که به وسیله یک منبع تغذیه با ولتاژ ثابت ایجاد می‌شود، تابش نور را در همان حد طول موج دلخواه محدود می‌کند. پس از این که محدوده مورد نظر به وسیله روزنه ثابتی که در ظرف حاوی نمونه قرار دارد مشخص شد، نوری که پخش می‌شود به قسمت ردیاب می‌تابد. اینجا انرژی نورانی به انرژی الکتریکی تبدیل می‌شود و این انرژی به عنوان میزان جذب‌شوندگی خوانده شده و روی یک نشان‌دهنده یا به صورت دیجیتال نشان داده می‌شود.

دستگاه‌های الایزا ریدر بر اساس نوع و سیستم خوانشگر به سه دسته تقسیم می‌گردند که عبارت است از:

۱- **Single Reader** : که تنها یک چاهک را به طریق دستی قرائت نموده و هیچگونه مد محاسباتی ندارند؛ لذا بایستی منحنی استاندارد تست‌های کمی توسط آزمایشگر به طریق دستی رسم گردد به همین علت از قیمت و کیفیت پائینی برخوردار است.

۲- **Strip Reader** : که تعداد ۱-۳ استریپ ۸ یا ۱۲ تایی را به صورت اتومات قرائت نموده و در عین حال منحنی تست‌های کمی را بر اساس مد محاسباتی رسم می‌نمایند. علاوه بر این، به علت دارا بودن فیلترهای افتراقی (Differential Filters) قابلیت خوانش در دو طول‌موج (Bichromatic Reading) را که به دلایل متعددی مورد نیاز است، به‌طور همزمان دارند که این دلایل عبارت است از:

الف- حذف رنگ زمینه آبی که در اثر واکنش آنزیم HRP با TMB بعد از نوآرایی رنگ آبی به زرد قرائت در طول‌موج رفرانس مورد نیاز است.

ب- با توجه به اینکه رنگ زرد دارای طیف بلند گذر است که طول‌موج‌های بالاتر از ۵۰۰ nm را به خوبی عبور داده و جذب آن در طول‌موج‌های حدود ۶۰۰ nm صفر است، لذا نمونه در طول‌موج رفرانس نیز قرائت می‌شود تا نیاز به

بلانک منتفی گردد؛ 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 برخوردارند. از این رو قیمت بالاتری را نیز دارند.



### الزامات نصب و راه‌اندازی:

برای اینکه دستگاه خوانشگر میکروپلیت عملکرد صحیح داشته باشد، رعایت نکته‌های زیر الزامی است:

وجود یک محیط تمیز و عاری از گردوخاک

۲) وجود یک میز کار ثابت، دور از تجهیزاتی که ایجاد ارتعاش می‌کنند، مانند سانتریفوژ و دستگاه همزن. این میز باید اندازه مناسب داشته باشد تا فضای کار کافی در کنار دستگاه خوانشگر باقی بماند. وسایل جانبی لازم عبارت است از: شستشودهنده انکوباتور، توزیع‌گر و کامپیوتر با ضامم جانبی.

۳) وجود یک منبع تغذیه الکتریکی که با استانداردهای کشور هماهنگ باشد (برای امریکا ۷۱۱۰ با فرکانس ۶۰ Hz و برای کشورهای دیگر ۲۲۰۷-۲۴۰ با فرکانس ۶۰ Hz).

## کنترل کیفی الیزا ریدر:

بسیاری از شرکت‌های تولیدکننده کیت‌های آزمایشگاهی، جهت ارزیابی عملکرد الیزا ریدر، کیت‌های کنترل کیفی معرفی کرده‌اند که با استفاده از آنها می‌توان عملکرد الیزا ریدر، واشر و سیستم سمپلینگ را مورد ارزیابی قرار داد. در این روش پارامترهای مهمی چون خطی بودن (Linearity)، دقت الیزا ریدر (Precision)، کارایی الیزا واشر (Efficiency) و صحت سیستم توزیع‌کننده دستی (سمپلرها) یا دستگاهی (Accuracy) را مورد ارزیابی قرار می‌دهند.



## کنترل خطی بودن (Linearity):

کنترل Linearity باید ماهانه مورد ارزیابی قرار گیرد و هدف از آن تعیین قابلیت دستگاه در تبعیت از قانون بیر (Beer's Law) است که طبق این قانون غلظت محلول نسبت مستقیم با مقدار نور جذب شده دارد. کنترل خطی بودن در دستگاه الیزا یک پارامتر مهم در کارایی دستگاه است چرا که کنترل صحت فتومتریک تا حدود زیادی با بهره‌مندی از استانداردهای مختلف در هر ران کاری قابل کنترل است؛ اما اگر خطی بودن دستگاه دچار اشکال باشد تفاوت‌های فاحشی در جواب‌ها حاصل می‌شود.

## روش کنترل خطی بودن (Linearity):

ابتدا محلول اسید پیکریک یا محلول مناسب دیگر (باید دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا نزدیک به آن باشد) را در تمام چاهک‌های پلیت بریزید و پلیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت کنید. نتیجه جذب نوری تمام چاهک‌ها در صورت سالم بودن فیلتر بایستی بیشتر از ۳ باشد، سپس یکبار دیگر بدون پلیت جذب نوری را قرائت می‌کنیم، در چنین شرایطی باید جذب نوری برای تمام چاهک‌ها بین  $\pm 0.1$  باشد. در صورتی که نتایج بالا حاصل نشد با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.

در بررسی خطی بودن دستگاه مقدار محتویات داخل wellهاحتماً باید یکسان باشد (چون مسیر نوری path length) چاهک‌های مختلف باید حتماً یکسان باشد. (ابتدا معرف دی کرومات پتاسیم (۱/۳ گرم دی کرومات پتاسیم را در ۸۰۰

میلی لیتر آب مقطر حل کرده، سپس ۳/۳ گرم پتاسیبه آن اضافه می‌کنیم و حجم را به یک لیتر می‌رسانیم). یک رقت سریال تهیه کرده (به نسبت ۲/۱، ۴/۱ و ۸/۱)، سپس با یک سمپلر ۲۰۰ میکالیبر شده، ۲۰۰ از هر رقت (از رقیق نشده هم به عنوان رقت ۱/۱) به ۳ چاهک به‌طور متوالی اضافه می‌کنیم (از هر رقت در سه چاهک ریخته می‌شود) سپس در Absorbance Mode با فیلتر اولیه ۴۵۰ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰ nm جذب آنها خوانده شده و با مقادیر مورد انتظار به دست آمده از میانگین جذب نوری ۳ چاهک اول (که مستقیماً از خوانش OD معرف اصلی به دست می‌آید) مورد مقایسه قرار می‌دهیم.

برای بدست آوردن محدوده مورد انتظار Expected value در هر رقتی ابتدا میانگین جذب نوری بدست آمده برای محلول اصلی را به عنوان عدد پایه در نظر گرفته و برای رقت‌های مختلف ضربدر ضریب رقت می‌کنیم. برای به دست آوردن محدوده مورد نظر در هر رقت از فرمول ذیل استفاده می‌کنیم:

$$\text{Expected value} \pm (1\% \text{ of the expected value} + 0.01A)$$

## TEST ۱۸۶:

همچنین جهت چک فیلترها می‌توانیم از برنامه Test # ۱۸۶ استفاده کنیم. چنانچه عدد بدست آمده بین ۱۰-۲۰ باشد عملکرد فیلترها مناسب است، در غیر این صورت دستگاه را برای سرویس به شرکت پشتیبان ارسال نمایید.

برای انجام تست ابتدا دستگاه را روشن کرده و ۱۵ دقیقه صبر کرده تا گرم شود و سپس بعد از ظاهر شدن کلمه selection، mode دکمه Test رازده و سپس عدد ۱۸۶ را وارد کرده و Enter می‌کنیم. بعد از چند ثانیه چهار عدد برای فیلترهای ۰، ۱، ۲، ۳ ظاهر می‌شود که اگر این اعداد بین ۱۰-۲۰ باشد نشان‌دهنده سلامت فیلترها است (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 است که آیا حداکثر جذب نوری به مقدار مشخص در طول موج خاصی صورت می‌گیرد؟ به عبارت دیگر هدف، تعیین تفاوت جذب واقعی با جذب مشاهده شده است. صحت فتومتری به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش فتوالکتریک، نوع و کیفیت منوکروماتور (تکرنگ کننده) بستگی دارد. راه‌های زیادی برای بررسی صحت فتومتریک وجود دارد که در اینجا به دو مورد اشاره شده است:

الف) برای بررسی صحت فتومتریک از محلول رنگزای قلیائی دی کرومات پتاسیم (۴۰ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم را در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، سپس ۳/۳ گرم پتاس به آن اضافه می‌کنیم و حجم را به یک لیتر می‌رسانیم)

استفاده می‌کنیم. با یک سمپلر ۲۰۰ λ (که به‌دقت کنترل کیفی شده و CV آن زیر ۳ است) مستقیماً از معرف فوق به داخل ۵ چاهک ریخته و در Absorption Mode با فیلتر اولیه ۴۰۵nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰nm جذب آن را می‌خوانیم و سپس میانگین آن را محاسبه می‌کنیم. عدد به‌دست‌آمده باید در محدوده  $0.04 \pm 0.0235$  قرار گیرد.

ب) در صورت استفاده از محلول رنگی متیل اورنج (متیل اورنج در ۰,۱٪، توئین ۲۰ تازه تهیه شده) باید OD خوانده شده توسط الیزا ریدر با OD خوانده شده در اسپکتروفتومتر مرجع طبق فرمول زیر مقایسه و درصد Bias یا inaccuracy مربوطه محاسبه شود. عدم صحت نباید از ۱,۵٪ بیشتر باشد و یا OD دستگاه موردنظر باید در محدوده  $0.001 \pm 0.001$  اسپکتروفتومتر مرجع باشد. البته این روش به دلیل اختلاف در زاویه تابش نور و نیز اختلاف در کووت اسپکتروفتومتر و میکروپلیت ریدر مورد تأیید کامل کارشناسان نیست.

### کنترل تکرارپذیری:

این آزمون برای پی بردن به وجود هرگونه اختلال در کثیف بودن حس‌گرها، لنزهای دستگاه و کالیبراسیون نامناسب یک یا چند کانال دستگاه و یا ناپایداری لامپ دستگاه است.

الف) ابتدا یک رقت ۲/۱ از معرف تهیه شده برای کنترل خطی بودن، تهیه کرده و سپس از معرف اصلی و معرف رقیق‌شده ۲۰۰λ به ۸ چاهک اضافه کرده و در Absorption Mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰nm جذب آن را می‌خوانیم و سپس میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات آن را محاسبه می‌نماییم. در این حالت حداقل ۸ بار خوانش OD در غلظت‌های مختلف انجام شود و سپس CV آن را محاسبه کنید (کمتر از ۳ درصد قابل قبول است).

ب) یک میکروپلیت مناسب انتخاب کنید، محلول متیل اورنج در ۰,۱٪، توئین ۲۰ را تازه تهیه کرده و رقت‌های مختلفی از این محلول را آماده نمایید و در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر خوانش کنید. هر رقت را حداقل ده بار خوانده و میانگین، انحراف معیار و CV را بدست آورید. CV بدست آمده باید کمتر از ۳٪ باشد.

### کالیبراسیون الیزا ریدر:

کالیبراسیون الیزا ریدر به‌عنوان یک روند تخصصی است که بایستی به‌وسیله یک تکنیسین یا مهندس آموزش‌دیده با استفاده از دستورالعمل‌های تهیه شده به‌وسیله سازنده آن دستگاه انجام گیرد. برای انجام کالیبراسیون، نیاز به در اختیار داشتن یک مجموعه از فیلترهای خاکستری سوار شده بر روی یک پلیت با همان اندازه هندسی مورد استفاده در تحلیل‌ها است. سازندگان دستگاه‌ها این گونه پلیت‌های کالیبراسیون را برای استفاده در هر طول‌موج تدارک دیده و در اختیار

مصرف‌کنندگان قرار می‌دهند. پلیت‌های کالیبراسیون حداقل به ۳ محدوده از دانسیته نوری در دامنه‌های کم، متوسط و زیاد مجهز هستند.

## برای انجام کالیبراسیون رعایت فرایند زیر الزامی است:

۱- پلیت کالیبراسیون را بر روی دستگاه قرار دهید.

۲- یک قرائت کامل به‌وسیله پلیت کالیبراسیون را انجام دهید و بررسی کنید که آیا اختلافی میان مقادیر قرائت‌شده در هر چاهک از حفره‌ها وجود دارد یا نه. در صورت وجود چنین اختلافی، پلیت را ۱۸۰ درجه چرخانده و عمل قرائت را مجدداً تکرار کنید تا دریابید که آیا این اختلاف برطرف شده است یا خیر؟ به‌طور کلی اگر نتایج پلیت در دو طول‌موج مطابق با نتایج مورد انتظار بود، معمولاً نیازی به کالیبراسیون اضافی نیست.

۳- بررسی کنید که آیا پلیت خوان‌ها نیاز به کالیبراسیون دارند یا خیر؟

در صورت نیاز به انجام کالیبراسیون این عمل را مطابق دستورالعمل شرکت سازنده دستگاه ادامه داده و سپس بررسی کنید که خطی بودن پلیت‌خوان‌ها در همه مراحل بدست آمده است یا خیر؟

۴- در صورتی که این دستگاه از یک پلیت کالیبراسیون برخوردار نیست می‌توان عمل کالیبراسیون را با پر کردن حفره‌های پلیت از یک محلول رنگی، نسبت به قرائت کامل و سریع آن به عمل آورد و سپس با چرخاندن پلیت به میزان ۱۸۰ درجه برای بار دوم عمل قرائت را مجدداً تکرار کرد. در صورت یکسان بودن نتایج هر دو قرائت، میانگین نتایج در هر ردیف را به دست آورید. بدین ترتیب پلیت‌خوان کالیبره شده است.

۵- بررسی کنید که آیا پلیت‌خوان ستون به ستون کالیبره است.

بدین منظور یک پلیت خالی و تمیز را بر روی دستگاه قرار داده و عمل قرائت را انجام دهید. در صورت عدم وجود هرگونه اختلاف میان مقدار میانگین ستون‌های اول تا آخر پلیت، می‌توان گفت که پلیت‌خوان کالیبره است.

ذکر این نکته ضروری است که نحوه کالیبره کردن بعضی از دستگاه‌ها از طریق سازندگان دستگاه و در قالب بروشور و جزواتی که به همراه دستگاه به خریدار ارائه می‌شود، مشخص گردیده است.

## نگهداری الایزا ریدر:

### نگهداری روزانه

برای کنترل روزانه دستگاه باید در هر روز حسگرها و منبع نورانی هر کانال آن مورد بازبینی قرار گرفته و در صورت نیاز تمیز گردند. تأیید کنید که کالیبراسیون خوانشگر کافی است. هنگام کار روزانه اجازه دهید خوانشگر به مدت ۳۰ دقیقه گرم شود. در محله بعد قرائت بلانک را انجام دهید و سپس یک پلیت کامل از سوبسترا را قرائت کنید. خوانشها میبایست یکسان باشند. اگر اینطور نبود، پلیت را چرخانده و قرائت را بهمنظور تعیین اینکه آیا اختلاف در پلیت یا خوانشگر است، تکرار کنید. سیستم کشنده اتوماتیک اسلایدها را بررسی کنید که نرم و ثابت باشد.

### نگهداری پیشگیرانه (هر چهار ماه یکبار)

- پایداری نور لامپ را بررسی کنید. در این رابطه با استفاده از یک پلیت کالیبره شده، قرائت‌های پیوسته‌ای را با دوره زمانی ۳۰ دقیقه با استفاده از یک پلیت یکسان انجام دهید. این نتایج قرائت شده را مقایسه کنید. در بین آنها نباید هیچ‌گونه اختلافی مشاهده شود.
- سیستم‌های حسگر نوری و نور دهنده را تمیز کنید.
- کشوی پلیت را تمیز کنید.
- انطباق محور هر حفره با سیستم‌های انتشاردهنده و آشکارساز را بررسی کنید.

## بروز خطا در قرائت اطلاعات

قرائت‌های غلط به‌وسیله دستگاه الایزا ریدر می‌تواند ناشی از عوامل زیر باشد:

- ۱- چاهک میکروپلیت در سمت پائین خش برداشته باشد.
- ۲- از طول موج غلط استفاده شده باشد.
- ۳- دستگاه به‌طور غلط برنامه‌ریزی شده باشد.
- ۴- میکروپروسور فعال‌کننده دستگاه در استفاده از طول موج درست دچار خطا باشد.
- ۵- دستگاه الایزا ریدر در معرض گردوخاک، لغزش، الکترومغناطیس زیاد، نور مستقیم خورشید، نوسان، رطوبت و حرارت زیاد قرار گرفته باشد.

۶- بررسی منظم دستگاه بر اساس دستورالعمل‌های تولیدکننده یا توصیه‌های ارائه‌شده انجام نگرفته باشد.

۷- تعویض لامپ یا منبع نور به‌درستی انجام نگرفته باشد.

۸- دستگاه بدون توجه به احتیاط‌های لازم جابه‌جا شده باشد.