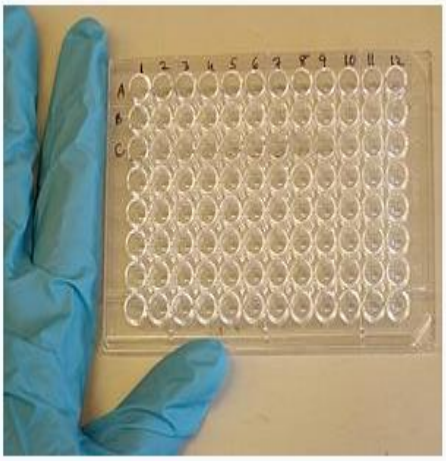
نکات عملی در تستهای الایزا



جمع آوری و نگهداری نمونه

تقریباً تمامی سنجش های ایمنی از سرم به عنوان نمونه استفاده می نمایند با این حال گاهاً ممکن است آزمایشگر به دلایلی نظیر کافی نبودن میزان سرم یا پرهیز از نمونه گیری مجدد از نمونه پلاسما برای سنجش یک آنالیت استفاده نماید. در این موارد باید بروشور کیت به دقت برسی شود به ویژه اگر در کیت استفاده از پلاسما نیز توصیه شده باشد باید مشخص شود که از چه نوع ماده ضد انعقادی می توان برای بدست آوردن پلاسما استفاده کرد. برخی از ضد انعقاد ها بر سنجش تاثیر سوء دارند برای مثال در استفاده از پلاسمایی که از EDTA به عنوان ضد انعقاد استفاده شده است باید با احتیاط برخورد شود EDTA یک شلات کننده قوی یونهای فلزی است و روی ((Zn ،کوفاکتور آنزیم آلکالن فسفاتاز را مهار می نماید)).

- در هنگام گرفتن نمونه باید توجه داشت که طولانی بستن تورنیکه ممکن است منجر به تغییر در پروتئین های حامل خون می شود که این مسئله در سنجش برخی از آنالیتها تاثیر میگذارد.

- گاهاً لیپمی در سنجش برخی آنالیتها تداخل می نماید بویژه زمانی که آنالیت مورد سنجش یک مولکول آب گریز است.

- در زمان جداسازی سرم از لخته باید از ایجاد همولیز اجتناب شود چرا که همولیز می تواند عامله مداخله گر در سنجش های ایمنی آنزیمی باشد. همولیز به ویژه در سنجش هورمونT4 آزاد (FREE T4) اثر دارد و سنجش آنرا بصورت کاذب کاهش می دهد.

- اکثر آنالیتهای قابل اندازه گیری با روش سنجش ایمنی آنزیمی تا حدودی در دمای اتاق و یخچال (۸-۲درجه) پایدار هستند با این حال اغلب آنالیتها نظیر PRL,FSH,LH,T4,T3,TSH در درجه حرارت یخچال تا یک هفته و در فریزر ۲۰- درجه تا چندین ماه پایدار می مانند.

- از دوباره ذوب و فریز نمونه باید پرهیز شود اما برخی آنالیتها نسبت به فریز و ذوب شدن مجدد مقاوم هستند مثلاً پروژسترون کاهش یک درصدی را در هر بار فریز یا ذوب شدن نشان می دهد.

جدول خصوصیت پایداری آنالیت های مختلف

	آنالیت	۲۵-۲۰°C	۸-۲°C	۲۰°C	ملاحظات
۱	ACTH	ناپایدار	ناپایدار		فقط از پلاسما EDTA استفاده شود و ظرف مدت ۱۵ دقیقه در مجاورت یخ پلاسما جدا شود. پلاسما در لوله‌داری در ۷۰- های پلاستیکی نگهداری شود زیرا به سطح شیشه ای جذب می شود. جه توصیه می شود.
۲	AFP	۱ روز	۷ روز	۳ ماه	از دوباره ذوب و فریز شدن اجتناب شود.
۳	CA-15-3	۳ ورز	۵ روز	۳ ماه	از دوباره ذوب و فریز شدن اجتناب شود.
۴	CA-19-9	۷ روز	۳ روز	۳ ماه	از دوباره ذوب و فریز شدن اجتناب شود.
۵	CA-125	۳ روز	۵ روز	۳ ماه	از دوباره ذوب و فریز شدن اجتناب شود.
۶	CEA	۱ روز	۷ روز	۶-۳ ماه	از دوباره ذوب و فریز شدن اجتناب شود.
۷	Cortisol	۲ روز	۷ روز	۳ ماه	بهترین زمان نمونه گیری ساعت ۶ الی ۸ صبح است از سرم پلاسمای هپارینه و EDTA می توان استفاده کرد. اتانول،نیکوتین،آمفیتامین، OCP، متوکلوپرامید باعث افزایش کاذب آن میشود.
۸	Estradiol Esteriol		۳ روز	۲ ماه	OCPو بیماریهای کبدی باعث افزایش کاذب آن می شود. ۴۸ ساعت نمونه گیری قبل از آن از صرف داروهای استروئیدی، ACTH، گنادوتروپین ها پرهیز شود به تداخل اسید چرب بهتر آزاد بهتر است که نمونه در حالت ناشتایی گرفته شود
۹	Ferritin	۳ روز	۷ روز	۱ سال	از دوباره ذوب و فریز شدن اجتناب شود.از مخلوط کردن شدید نمونه پرهیز شود.

۱۰	Folic acid	۳۰ دقیقه	۶ ساعت	۸ هفته	نمونه باید سریعاً سانتریفوژ و سرم جدا شود.
۱۱	FSH	۷ روز	۲ هفته	۱ سال	هورمون بسیار پایدار است به نحوی که در سرم نگهداری شده روی لخته تا یک هفته پایدار می ماند. سایمیتیدین،کلومیفن،لوودوپا باعث افزایش و فنوتیازین و کورتیکواستروئید و OCP باعث کاهش کاذب آن می شود.
۱۲	Free T4	۲ روز	۷ روز	۳ ماه	داروهای ضد صرع نظیر کاربامازپین،فنی توئین،متادون،ریفامپیسین باعث کاهش و آمی‌دارون،آسپرین،دانازول،فورزمایدو پروپرانولول باعث افزایش کاذب آن می شود. از نمونه های همولیز نباید استفاده کرد. اسید چرب آزاد در سنجش تداخل می کند
۱۳	Free T3	۱ روز	۷ روز	۳ ماه	اسید چرب آزاد در سنجش تداخل می کند.
۱۴	Growth Hormone	۱ روز	۳ روز	۳ ماه	نمونه باید در حالت ناشتایی و ۳۰ دقیقه پس از استراحت و بدون استرس گرفته شود. سرم یا پلاسما سریعاً باید به یخچال یا فریزر منتقل شود. آنتونول، پروپرانولول،کلونیدین، متوکلوپرامید،لوودوپا باعث افزایش و بروموکریپتین،کورتیکواستروئیدها و فنوتیازین باعث کاهش کاذب هورمون می شود.
۱۵	HCG	۱ روز	۳ روز	۱ سال	از ذوب و فریز شدن مجدد جلوگیری شود
۱۶	Insulin	۴ ساعت	۱ روز	۳ ماه	نمونه پلاسمای هپارینه باید سریعاً از لخته جدا شود (حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه) لوودوپا،پردنیزولون،تولبوتامید و دانازول باعث افزایش و فنوباربیتال،فنی توئین،سایمیتیدین،اتانول و کلرپروپامید باعث کاهش کاذب آن میشود.
۱۷	IgE	۳ روز	۷ روز	۶ ماه	از مخلوط کردن شدید نمونه اجتناب نمائید.
۱۸	LH	۷ روز	۲ هفته	۱ سال	عوامل مداخله گر همان عواملی هستند که در مورد FSH توضیح داده شد.
۱۹	Progesterone OHProg -۱۷	۱ روز	۷ روز	۳ ماه	کلومیفن و کورتیکواستروئیدها باعث افزایش و آمپی سیلین و OCP باعث کاهش کاذب هورمون می شود.
۲۰	Prolactine	۱ روز	۲ روز	۱ سال	نمونه در حالت ناشتایی ۴-۳ ساعت پس از بیداری گرفته شود. حداقل ۳۰ دقیقه قبل از نمونه گیری بیمار در حالت استراحت باشد. استرس،خواب،بارداری و شیردهی باعث افزایش آن می شود.
۲۱	PSA	۷ روز	۱ ماه	۳ ماه	از ذوب و فریز شدن مجدد جلوگیری شود
۲۲	PTH	ناپایدار	ناپایدار	۱ هفته	نمونه سرم در حالت ناشتایی گرفته شود و سریعاً در مجاورت یخ جدا شود و در درجه حرارت ۲۰- قرار داده شود. افزایش لیپیدهای سرم در سنجش تداخل می کند.
۲۳	T.Uptake	—	۲ روز	۱ ماه	
۲۴	Testosterone	۱ روز	۳ روز	۲ ماه	داروهای استروئیدی،تیروئیدی، ACTHو گنادوتروپین ها ۸ ساعت قبل از آزمایش باید قطع شوند
۲۵	Thyroglobolin	—	۲ روز	۱ ماه	
۲۶	TSH	۱ روز	۵ روز	۳ ماه	هالوپریدول،متی مازول،متوکلوپرامید،مورفین،فنوتیازین باعث افزایش،بروموکریپتین،دوپامین،کاربامازپین،لوودوپا باعث کاهش کاذب TSH می شوند.
۲۷	TBG	—	۵ روز	۱ ماه	استروژن ها و OCP باعث افزایش و استروئیدهای آنابولیک و آندروژن ها باعث کاهش آن می شوند.
۲۸	T4	۳ روز	۷ روز	۱ ماه	از ذوب و فریز نمودن دوباره پرهیز شود. امیدارون،آسپرین،دانازول و پروپرانولول،متادون باعث افزایش و فنی

				توئین و کاربامازپین،تستوسترون باعث کاهش می شود.
۲۹	T3	۲ روز	۸ هفته	۳ ماه
۳۰	HBS – Ag	—	۳ روز	۶ ماه
۳۱	HBS – Ab	—	۷ روز	۶ ماه
۳۲	HCV – Ab	—	۷ روز	۶ ماه

مقدمات کار با کیت های الایزا

۱- کیت مورد نظر باید از شرکت معتبر دارای تاییدیه از یکی از مراجع بین المللی با بسته بندی مناسب و حاوی کنترل مثبت و منفی باشد.

۲- رعایت زنجیره سرد (۸-۲ درجه) در حمل و نقل کیت از مبدا به مقصد (مصرف کننده) الزامی است.

۳- آماده سازی محلول کونژوگه و یا سوبسترا بایستی توسط ابزار های حجمی و سمپلرهایی که در فواصل زمانی مناسب کالیبره شده و دارای صحت و دقت قابل قبول باشد صورت گیرد. در تهیه محلول ها باید از آب مقطر تازه متناسب با درجه توصیه شده در بروشور کیت استفاده گردد.

۴- آماده سازی بافر یا محلول شستشو هر بار بایستی به حد نیاز مصرفی باشد. تهیه بیش از حد محلول بافر و ماندن بافر در محیط آزمایشگاه منجر به آلودگی قارچی یا باکتریال آن میگردد مگرآنکه طبق دستورالعمل کیت مدت زمان نگهداری آن در دمای ۶-۲ سانتیگراد و یا اتاق تعریف شده باشد.

۵- نوک سمپلر ها و لوله آزمایش جهت تستهای الایزا بایستی تمیز و عاری از مواد شوینده باشد که این امر به جهت ممانعت از دخالت مواد شیمیایی در واکنش های آنزیمی می باشد. بهترین لوله ، جهت سوبسترا لوله شیشه ای است که با اسید سولفوریک رقیق شسته و با آب مقطر آبکشی شده باشد. سوبسترا باید دور از نور تهیه و نگهداری شود.

آماده سازی کیت:

محلول های استاندارد و کنترل موجود در کیت را باید قبل از مصرف به آرامی تکان داد تا کاملا یکنواخت شود. در ضمن لازم است تا به تعادل دمایی با محیط برسد.

اجزاء کیت مخصوصا کونژوگه ، سوبسترا و کروموژن بایستی بلافاصله پس از استفاده به یخچال منتقل گردد. این امر منجر به افزایش پایداری کیت می گردد به عبارتی تنها محلولی که تا پایان کار روی میز باقی می ماند محلول متوقف کننده واکنش (stopping solution) می باشد.

انتقال استریپ های باقیمانده بداخل کیسه مخصوص نگهداری آن جهت جلوگیری از ورورد گرد و غبار و رطوبت به محیط عمل استریپها لازم است. باید در کیسه محکم بسته شده و در صورت در دسترس بودن بسته های رطوبت گیر از آنها استفاده شود.

به تعادل دمایی رسیدن اجزای کیت با دمای محیط آزمایشگاه پس از خروج آن از یخچال ضروری است. زیرا دمای پایین می تواند باعث تغییر در میزان جذب نوری شود.

بررسی ماکروسکوپی کلیه اجزاء کیت قبلا از مصرف به لحاظ وجود کدورت ، آلودگی قارچی و ذرات خارجی الزامی است.

محلول کروموژن که قبل از مصرف تغییر رنگ داده باشد احتمالا آلوده و فاسد شده است.

قبل از هر مرحله مطابق دستورات کیت آماده سازی معرفها بایستی با دقت کافی صورت پذیرد.

جهت کنترل کیفی و اطمینان از سالم بودن سوبسترا و کونژوگه :

حجمهای برابر از کونژوگه و سوبسترا را با هم مخلوط کنید. در این حالت رنگ حاصل باید به سرعت ظاهر گردد.

برخورد نوک سمپلر آلوده با سوبسترا و یا بازماندن طولانی مدت درب ظرف سوبسترا می تواند منجر به آلودگی قارچی یا باکتریال سوبسترا گردد.

محلول سوبسترا باید طبق دستورالعمل کیت تهیه و تا زمانی که دردستورالعمل ذکر شده قابل نگهداری در شرایط مطلوب می باشد و پس از آن لازم است مجدداً بصورت تازه تهیه گردد.

به هنگام ریختن کنترلها در چاهکهای میکروپلیت به جهت جلوگیری از آلودگی چاهک به چاهک همیشه بایستی ابتدا کنترل منفی و سپس کنترل مثبت را اضافه کرد.

اطمینان از صحت کارکرد دستگاهها و تجهیزات مورد مصرف در روش دستی ، نیمه اتوماتیک و تمام اتوماتیک. بطور مثال برای اطمینان از صحت طول موج فیلتر های الایزا ریدر می توان از میکروپلیت های خاص که جهت کالیبراسیون تهیه شده اند و از برنامه های نرم افزاری مربوط به آن استفاده کرد.

مرحله شستشو(WASHING):

«فشار بالای شستشو در روش دستی ناشی از تخلیه سریع بافر می تواند منجر به جداسازی و حذف اتصالات اختصاصی از کف چاهک و کاهش OD کاذب گردد.

«فشار پایین شستشو به علت تخلیه آهسته بافر در روش های دستی می تواند منجر به عدم دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی و افزایش کاذب جذب نوری گردد.

«در نظر گرفتن زمان خیس خوردن چاهک در فواصل شستشو (ریختن بافر و تخلیه) طبق دستورالعمل کیت الزامی است و معمولاً بین ۲۰ تا ۴۰ ثانیه است.

این مرحله به جداسازی و دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی کمک می کند.

«برای شستشو به روش دستی (با سمپلر) جهت جلوگیری از آسیب فیزیکی به چاهکها و جداسازی کمپلکس های پوشیده شده در کف چاهک سعی کنید تخلیه نمونه به طور مایل صورت گیرد.

- قبل از هر چیز به روش تهیه محلول شستشو در بروشور کیت توجه شود ، تهیه محلول شستشو غلیظ تر از حد توصیه شده منجر به تخریب و جدا شدن مولکولهای اتصال یافته می شود و جذب نوری کاهش می یابد. در مقابل کاهش توانایی محلول شستشو به دلیل رقیق سازی زیاد باعث عدم جدا شدن اتصالات غیر اختصاصی و ایجاد جذب زمینه ای بالا می شود.

- مرحله شستشو باید حداقل سه بار برای هر چاهک انجام شود. در آخرین مرحله شستشو و پس از خروج کامل محلول از چاهک با برگرداندن پلیت باید محلول اضافی داخل چاهک را با کوبیدن بر سطح یک کاغذ یا دستمال نمگیر خالی نمائید.

- در هنگام شستشوی چاهک باید اطمینان حاصل کرد که محلول شستشو تمام چاهک ها را پوشانده است. از سر ریز شدن محلول چاهکها باید اجتناب شود.

- در برخی روش های شستشو ، برای شستشوی بهتر یک زمان انتظار بنام soak time ذکر میشود. بدین ترتیب که پس از ریختن محلول درون چاهک ها مدتی صبر کرده و بعد چاهک را خالی می کنیم. این زمان از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه متغیر است. در صورتیکه این زمان توصیه شده باشد باید حتماً رعایت گردد.

- به دلیل اینکه در محلول شستشو از دترژنت استفاده میشود. درهنگام تهیه محلول شستشوی آماده کار ممکن است کف یا حباب ایجاد شود. از وارد شدن حباب یا کف به داخل چاهک باید جلوگیری شود. چون این حباب سطح تماس محلول را با چاهک کم نموده و اثرات شستشو را کاهش می دهند.

- قبل از شروع عملیات شستشو پیشنهاد می شود که pH آب مقطر که برای رقیق کردن محلول استفاده می شود و نیز pH محلول شستشوی آماده کار چک شود. در صورتیکه pH محلول شستشو بسیار اسیدی یا قلیایی باشد بر سنجش تاثیر می گذارد.

- محلول آماده کار برای شستشو باید بطور تازه تهیه و حتماً بر روی ظرف آن تاریخ ساخت قید شود.

نکات مهم در مورد میکروپلیت:

پس از خارج کردن پلیت از یخچال ممکن است بر سطح چاهکها بخار تشکیل شود که پایداری پلیت را کاهش می دهد ، بنابراین توصیه
میشود که تا قبل از رسیدن دمای پلیت به دمای اتاق آنرا از کیسه مخصوص نگهداری پلیت خارج نکنید.

پس از استفاده از پلیت باقیمانده چاهکها را سریعاً به یخچال منتقل نمایید و دقت نمایید که در کیسه مخصوص پلیت نمگیر وجود داشته باشد.

در مرحله انکوباسیون سوبسترای TMB به هیچ وجه از فویل برای پوشاندن سطح پلیت استفاده ننمایید.

نکات مهم در مورد سوبسترای کونژوگه آنزیمی:

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

برای تعیین کارایی کونوژوگه پراکسیداز و سوبسترای TMB به ترتیب زیر عمل کنید:

به دو لوله تمیز مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده اضافه نمایید. در مورد TMB این سوبسترا باید شفاف و بدون رنگ باشد.

به یکی از لوله ها ۱۰ میکرولیتر از کونژوگه آماده اضافه نمایید که پس ازچند دقیقه رنگ آبی حاصل می شود.

به همان لوله ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه کنید رنگ آبی به زرد تبدیل می شود.

به لوله دوم که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترا است ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید. هیچ گونه تغییر رنگی نباید حاصل شود.

در صورتی که مواردی غیر از این موارد ذکر شده مشاهده شد با تولید کننده کیت تماس حاصل نمایید.

مرحله انکوباسیون و توقف واکنش:

واکنش آنزیم و سوبسترا باید در شرایط تاریکی انجام پذیرد. لذا پس از اضافه نمودن سوبسترا ، پلیت در محیط تاریک نگهداری شود.

محدوده دمایی مجاز انکوباتور طبق بروشور همراه کیت تعریف می شود و تغییرات بیش از حد مجاز منجر به کاهش یا افزایش کاذب OD میگردد لذا کنترل کیفی انکوباتور بطور ماهانه الزامی است.

پوشاندن سطح استریپ ها با پوشش پارافیلم یا برچسب های مخصوص در هر مرحله انکوباسیون ضروری است. این امر مانع تبخیر محلولها از محیط واکنش و از طرفی مانع ورود گرد و غبار به محیط عمل آنزیم میگردد.

عدم وجود سیگنال یا کاهش سیگنال:

- کاهش فعالیت ردیاب : اگر شکل منحنی طبیعی است میزان فعالیت در ماده نشاندار باید چک شود. در مورد الایزا با اضافه نمودن کونژوگه آنزیمی به سوبسترا رنگزا می توان از فعالیت آنزیم آگاه شد.

- غیر فعال شدن آنزیم یا سوبسترا یا وجود مهار کننده در سنجش آنزیمی : این امر با طبیعی بودن شکل منحنی اما با وجود سیگنال پایین مشخص می شود.
- خراب شدن زود هنگام معرفها قبل از تاریخ انقضاء یا نگهداری نامناسب کیت : در صورتیکه کیت قبل از تاریخ انقضاء دچار زوال شده باشد دقت و میزان سیگنال کیت مختل می شود. چنانکه کیت در حرارت های بسیار بالا یا پایین نگهداری شود منجر به تخریب برخی از معرفها می شود که این موضوع با کاهش سیگنال همراه است.

- خراب بودن دستگاه خوانش : در این حالت به دلیل نقص فنی یا کالیبر نبودن دستگاه مقادیر سیگنال بطور واقعی ارزیابی نمی شوند.

ظرفیت پایین اتصال در روش های رقابتی و ایمونو متریک:

۱. بهینه سازی یا طراحی ضعیف کیت :در این حالت مقایسه منحنی کالیبراسیون با منحنی تیپیک ارائه شده در کیت کمک کننده است.

۲. زوال زودرس معرفها پیش از زمان انقضاء کیت : معمولاً این حالت به دلیل نگهداری نامناسب صورت می پذیرد.

۳. نقص در کوتینگ چاهکها : این مشکل علاوه بر کاهش سیگنال موجب عدم دقت در سنجش نیز می شود

۴. نقص در پیپت ها و سمپلرها یا دیس پنسر های اتوماتیک : این امر منجر به تغییر حجم اضافه شده معرف میگردد. لذا این وسایل باید همواره کالیبر شده باشند

دقت ضعیف درون سنجی: [۱]

نقص در شستشوی چاهکها : بطور کامل و دوره ای دستگاه شستشو باید تمیز شود با استفاده از یک محلول رنگی میزان تخلیه محلول و سپس آسپیره کردن آنرا از داخل چاهکها چک نمایید.

اشکال در عمل Tapping پلیت (برعکس قررا دادن پلیت الایزا پس از خالی کردن محتویات چاهکها در مرحله شستشو): در صورتیکه فشار آمده به تمام چاهکها یکسان نباشد ممکن است به علت باقی ماندن مقادیر مختلف محلول شستشو در داخل چاهکها عدم دقت در سنجش رخ دهد.

استفاده از پرسنل بی تجربه : برخی از موارد عدم دقت در سنجش ناشی از عملکرد تکنیسین که باید حتماً چک شود.

رانش:

عبارت است از اختلاف در غلظت بدست آمده از یک نمونه واحد در موقعیت های مختلف یک پلیت در یک نوبت کاری که شایعترین علت آن زیاد بودن تعداد آزمایش در یک نوبت کاریست به نحوی که در افزودن محلول ها فاصله طولانی وجود داشته باشد.

سنجش تعداد زیاد چاهک در یکسری آزمایش : باید زمان اضافه کردن نمونه و معرفها به اولین و آخرین چاهک و اختلاف آن محاسبه شود و با بروشور تطبیق داده شود و در صورتیکه نتیجه ای حاصل نشد با سازنده تماس گرفته شود.

واکنش کند یا سریع محلول متوقف کننده : زمان اضافه کردن محلول متوقف کننده باید با زمان اضافه کردن سوبسترا رنگزا هماهنگ باشد ، بنابراین بهترین کار این است که بلافاصله بعد از افزودن سوبسترا به چاهک اول زمان گرفته شود. در این حالت پس از اتمام زمان انکوباسیون سوبسترا ، افزودن محلول متوقف کننده نیز از اولین چاهک شروع می شود. در این حالت زمان لازم برای اضافه کردن محلول به تمام چاهکها معادل زمان لازم برای افزودن سوبسترا به تمام چاهکها خواهد بود.

عدم آمادگی معرفهای کیت از نظر درجه حرارت سنجش قبل از استفاده : در این حالت باید مطمئن شد که تمام معرفها به درجه حرارت اتاق رسیده باشند.

پایین بودن درجه حرارت انکوباسیون : درجه حرارت را چک کنید.

استفاده از انکوباتور خشک بجای انکوباتور مرطوب : انکوباتور های خشک برای اغلب سنجش های ایمنی نامناسبند مگر اینکه در کیت توصیه شده باشد.

نقص در محلول یا دستگاه شستشو : باید نحوه تهیه محلول شستشو با بروشور چک شود و دستگاه شستشو نیز بطور منظم بازدید شود.

عدم خطی بودن:

منظور از خطی بودن حصول نتایج یکسان از رقت های سریال یک نمونه می باشد.

وجود تداخلات ناشی از عوامل داخلی سرم نظیر همولیز و لیپمی و نحوه جمع آوری نمونه : ظاهر سرم در این حالت باید چک شود

استفاده از نمونه های قدیمی و کهنه : نگهداری طولانی مدت نمونه می تواند منجر به تخریب آنالیت مورد نظر گردد لذا بهتر است آزمایش با نمونه تازه تکرار شود.

پدیده هوک با غلظت بالا در سنجش ایمونومتریک : این مشکل باید با آزمایش محدوده ای از غلظت های آنالیت که به نمونه با غلظت صفر یا کالیبراتور صفر اضافه شده است بررسی شود. سپس منحنی غلظت های اضافه شده از آنالیت در مقابل غلظت آنالیت رسم میشود. این منحنی باید از شرایط خطی بودن (Linearity) تبعیت نماتید.

خطا در غلظت کالیبراتورها : اگر این مشکل وجود داشته باشد عدم صحت در کنترل و خطا در فیت کردن منحنی ممکن است دیده شود.

خطا در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا منحنی کالیبراسیون سازنده : در این حالت باید منحنی کالیبراسیون مجدداً رسم شود و یا از کیت با سری ساخت دیگری استفاده گردد.

نقص در وسایل : با جایگزین کردن وسایل و یا سرویس آنها آزمایش مجدداً انجام پذیرد.

مشکلات احتمالی در تستهای الایزا:

۱. مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد زمینه در میکروپلیت
۲. مقادیر پایین کنترل مثبت یا جذب نوری پایین
۳. تمام پلیت مثبت تفسیر شود (در تمام چاهکها محلول دارای رنگ است)
۴. واکنش های مثبت کاذب

۵. قدرت تکرار پذیری ضعیف یا عدم هماهنگی در جذب نوری دو چاهک داری نمونه یکسان
۶. حساسیت ضعیف
۷. جذب نوری بالا کالیبراتورها (استاندارد ها) و یا کنترل های منفی
۸. نمونه با جذب نوری خارج از محدوده کالیبراتورها یا استاندارد ها (در صورتیکه آزمایش کمی باشد)
۹. جذب نوری پایین نمونه ها، کنترلها و استانداردها
۱۰. کنترل مثبت یا منفی خارج از محدوده تعیین شده توسط بروشور کیت
۱۱. خروج استریپها از قاب نگهدارنده آنها
۱۲. تغییر رنگ کروموژن
۱۳. تغییر رنگ مخلوط کروموژن و سوبسترا قبل از افزودن به محیط واکنش
۱۴. تغییر رنگ محلول متوقف کننده واکنش
۱۵. عدم بروز واکنش رنگی در میکروپلیت پس از افزودن سوبسترا و انکوباسیون آن
۱۶. رنگزایی با سرعت زیادی حادث شود
۱۷. رنگزایی با تاخیر و سرعت کم حادث شود

جداول راهنمای حل مشکلات تستهای الایزا

مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد زمینه در میکروپلیت

ردیف	دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۱	آلوده شدن چاهک های کنترل منفی با کنترل مثبت	«در هنگام افزودن کنترل مثبت یا نمونه مراقبت نمایید که چاکهای کنترل منفی آلوده نشوند. «در هنگام عملیات شستشو از سرریز شدن محلول شستشو از چاهکها به یکدیگراجتناب ورزید. «پیپت و یا لوله های سمپلر و نوک سمپلر را چک کنید و در صورت وجود قطرات باقی مانده از قبل و یا مواد خشک شده در آنها باید تعویض شوند.
۲	آلوده شدن ویال کنترل منفی	«همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهکها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید. «برای هر نمونه از نوک سمپلر جدید استفاده نمایید. «تست را با کیت جدید تکرار کنید.
۳	شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کونژوگه با	«هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده های کونژوگه از

چاهک ها خارج شده اند.	کنترل منفی	
«این مورد مربوط به تولید کننده کیت می باشد.	اتصالات غیر اختصاصی آنتی بادیها	۴
«این مورد مربوط به تولید کننده کیت می باشد و باید با شرکت تولید کننده تماس حاصل شود.	واکنش مستقیم کونژوگه با مواد کف چاهک	۵

مقادیر پایین کنترل مثبت یا جذب نوری پایین

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی	ردیف
«مطمئن شوید که دمای تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده است(۲۵ تا ۲۰ درجه سانتیگراد)	در زمان انجام آزمایش دمای مواد داخل کیت به دمای اتاق نرسیده است	۱
«مطمئن شوید که نوک سمپلر ها خوب و محکم فیکس شده اند «لوله سمپلر را چک کنید تا گرفته نباشد «کالیبراسیون دوره ای سمپلر ها (۴تا۳ مرتبه در سال)	مقدار نمونه برداری کمتر از مقدار لازم است	۲
محلول کروموژن سوبسترا را درست قبل از استفاده آماده کنید. (طرز تهیه را در بروشور کیت بدقت مطالعه کرده و به آن عمل کنید)	محلول کروموژن – سوبسترا بدرستی تهیه نشده است	۳
«مجدداً تست را با اجزاء یک کیت جدید تکرار نمایید. «در صورت هر گونه تغییر رنگ و یا کدورت محلول های کیت آنها را مصرف نکنید.	آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی کنترل مثبت به باکتری	۴
«ساعت آزمایشگاهی را توسط یک ساعت کالیبره چک کنید. «زمان انکوباسیون را ثبت نمایید.	زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است	۵
«عملکرد صحیح نمگیر داخل کیسه را بررسی کنید «استریپهای غیر مصرفی را بهمراه نمگیر در کیسه پلیت قرا ر داده و درب آنرا محکم ببندید. «زمان باز کردن درب کیسه پلیت را در نوبت اول مصرف بر روی کیسه پلیت ثبت کنید.	ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت	۶
«دمای انکوباتور و یا اتاق را بررسی کنید.	دمای انکوباسیون مناسب نیست	۷
«دمای محیط کار را بررسی کنید.	دمای اتاق برای انکوباسیون سوبسترا خیلی پایین است	۸
«فشار شستشو را کاهش دهید.	شدت شستشو زیاد است	۹
«مواد را قبل از استفاده خوب مخلوط کنید.	مواد کیت قبل از استفاده خوب مخلوط نشده اند	۱۰
«تمام مراحل انجام تست را بدون وقفه انجام دهید.	در خلال انجام تست چاهکها خشک شده اند	۱۱
«افزودن محلول متوقف کننده سالم شدت رنگ را افزایش داده و باعث تثبیت رنگ میشود.	ضعیف یا خراب بودن محلول متوقف کننده واکنش	۱۲
«کونژوگه را دوباره با صحت کامل تهیه نمایید.	عدم رعایت نسبت کونژوگه و محلول رقیق کننده آن	۱۳

جداول راهنمای حل مشکلات تستهای الایزا

ظهور رنگ در تمام چاهکهای پلیت

ردیف	دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۱	حجم غیر کافی محلول شستشو برای هر چاهک	«در هنگام شستشو چاهکها را تا نزدیک به انتها پر کنید. (حجم محلول برای هر چاهک باید طبق دستورالعمل کیت باشد)
۲	محلول متوقف کننده واکنش آلوده است	«محلول متوقف کننده را تعویض و تست را تکرا نمایید.
۳	استفاده از آنزیم کونژوگه بدون رقیق نمودن یا عدم تهیه رقت مناسب طبق دستورالعمل کیت	«محلول رقیق کننده کونژوگه و طرز تهیه کونژوگه را بررسی کنید.
۴	تغییرات در برخی فاکتورهای سرمی در سرم پس از حرارت	«سرم را حرارت ندهید.
۵	محلول سوبسترا یا کونژوگه آلوده است	«لوله سمپلر را برای وجود ذرات مایع یا خشک کننده بررسی کنید. «نوک سمپلر به حد کافی بلند باشد که مایع به انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند.
۶	محلول سوبسترا تازه نیست	«محلول سوبسترا را پس از انقضاء تاریخ ، مصرف نکنید.
۷	پلیت قبل از خواندن جذب نوری مدت زیادی مانده است	«بعد از افزودن محلول متوقف کننده واکنش طبق دستورالعمل کیت در مدت تعیین شده جذب های نوری را بخوانید.
۸	در خلال انکوباسیون سوبسترا پلیت د رمقابل نور قرار گرفته	«پس از ریختن محلول سوبسترا پلیت را در یک محل تاریک قرار دهید.

واکنش های مثبت کاذب

ردیف	دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۱	شستشوی غیر کافی یا مسدود شدن کانالهای واشر الایزا	«قبل از استفاده از دستگاه واشر آنرا خوب چک کنید تا مطمئن شوید درست کار میکند «کالیبراسیون و سرویس روتین را مبذول فرمایید.
۲	آلوده شدن چاهکها با کونژوگه پاشیده شدن کونژوگه به لبه چاهکهای دیگر در هنگام ریختن کونژوگه آلوده شدن سوبسترا به کونژوگه	«کونژوگه را با دقت در مرکز چاهکها اضافه نمایید. «در موارد استفاده از سیستمهای اتوماتیک باید در فواصل زمانی منظم کالیبره شوند. «لوله سمپلر را برای وجود ذرات مایع یا خشک کننده بررسی کنید.
۳	محلول متوقف کننده آلوده است	«محلول متوقف کننده را تعویض کرده و تست را تکرار کنید.
۴	وجود گلبولهای قرمز در نمونه	«نمونه را قبل از استفاده سانتریفیوژ نمایید.
۵	«پلیت را با چسب کاور مخصوص پلیت پوشانیده و در انکوباتور ۳۷ درجه و یا حرارت مطلوب طبق دستورالعمل کیت قرار دهید. تبخیر نمونه یا آنزیم کونژوگه در خلال انکوباسیون ۳۷ درجه یا بالاتر	

از کیت تمام محلول ها و اجزای کیت را به صورت ماکروسکوپی از نظر وجود کدورت غیر معمول و یا مواد زاید دیگر بررسی کنید.	وجود قارچ یا آلودگی با مواد دیگر در محلولهایی نظیر محلول شستشو و یا سایر اجزای کیت	۶
«از روی دستورالعمل کیت یک محلول کونژوگه آماده کار تازه تهیه نمایید.	عدم نسبت درست محلول کونژوگه به محلول رقیق کننده	۷
«دمای اتاق یا انکوباتور را چک کرده و در محدوده مجاز کالیبره کنید.	دمای انکوباسیون بالا	۸

بالا بودن جذب نوری استانداردها یا کالیبراتورها

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی	ردیف
«تست را طبق دستور بروشور و بدون وقفه های اضافی انجام دهید. «دمای محیط اتاق و انکوباتور را تنظیم نمایید.	پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی در دمای بالاتر از سفارش کیت باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد	۱
«کالیبراسیون سمپلر را مورد ارزیابی قرار دهید.	مقادیر مناسب از نمونه ها در چاهک ریخته نشده است	۲

جداول راهنمای حل مشکلات تستهای الایزا

رنگزایی با سرعت زیاد حادث میشود

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی	ردیف
«مجدداً طبق دستورالعمل آن را تهیه کنید.	کونژوگه به درستی تهیه نشده است	۱
«مطمئن شوید که ظروف و وسایل مورد استفاده آلوده نبوده اند.	آنزیم کونژوگه آلوده است	۲

رنگزایی با تاخیر و یا سرعت کم حادث میشود

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی	ردیف
«قبل از انجام تست نمونه ها را به دمای اتاق برسانید.	نمونه ها به دمای اتاق نرسیده اند	۱
«طرز تهیه آنرا دوباره چک کنید و تست را با محلول کونژوگه دوباره آماده شده تکرار کنید.	کونژوگه ضعیف است	۲
«دمای آزمایشگاه و سوبسترا را چک کنید.(دما باید بین ۲۵ تا ۲۰ درجه سانتی گراد باشد)	دمای پایین آزمایشگاه و یا دمای پایین سوبسترا	۳