عیب یابی و رفع اشکال در تست الایزا

(با رویکرد تست TSH بروی کاغذ فیلتر حاوی نمونه خون پاشنه پا)

عبارت آشنای پیش گیری بهتر از درمان است، مصداق پاراکلینیکی نیز دارد. به عبارتی پیشگیری از اشکال بهتر از یافتن و رفع اشکال است. لذا اجازه دهید ابتدا به مسائل پیشگیری از ایجاد اشکال در روش الایزا اشاره ایی داشته باشیم:

نکات قبل از استفاده از کیت:

۱) کیت را از شرکت و یا نماینده معتبر تهیه کنید.

۲) دقت کنید کیت مورد استفاده دارای تاییدیه کنترل کیفی از منبع معتبر باشد.

۳) از شرایط حمل و شرایط نگهداری صحیح کیت مورد نظر اطمینان حاصل کنید.

۴) به تاریخ انقضاء کیت دقت کنید.

۵) به ظاهر فیزیکی کیت اعم از بسته بودن درب آن، سالم بودن جعبه، عدم رطوبت جعبه دقت کنید.

۶) با باز کردن کیت، از لحاظ کیفی و کمی به محتویات کیت طبق دستورالعمل کیت توجه کنید. مثلا محلول متعلق به T3 در کیت T4 نباشد و تعداد محلولهای هر کیت مطابق بروشور کیت باشد.

۷) ابتدا کیت را قبل از استفاده به دامی آزمایشگاه برسانید.

۸) بروشور کیت را بدقت مطالعه کنید.

۹) محلولهای کیت را در صورت نیاز طبق بروشور به روش صحیح به میزان لازم تهیه کنید.

۱۰) نمونه ها نیز همزمان با کیت به دمای آزمایشگاه برسند.

۱۱) کلیه مراحل انجام آزمایش را طبق توصیه سازنده و بروشور کیت انجام دهید.

نکات هنگام استفاده از کیت:

۱) از محلولهای هر کیت برای همان کیت استفاده کنید.

۲) از مصرف محلولهای منقضی شده پرهیز کنید.

۳) از مخلوط کردن محلولهای کیتهای مختلف علی الخصوص با سری ساخت متفاوت خودداری کنید.

۴) از مصرف محلولهای مشکوک، مانند محلولهای تغییر رنگ داده خودداری کنید.

۵) در آماده سازی محلولهای غلیظ و یا لیوفیلیزه دقت کافی به خرج دهید.

۶) از تکان دادن شدید و کف کردن محلولها پرهیز کنید.

۷) از برخورد نور مستقیم با محلولهای ذکر شده در بروشور مانند سوبسترا، خودداری کنید.

۸) هنگام جابجایی میکروپلیت، برداشتن برچسب روی پلیت و هنگام شستشوی چاهکها مراقب آلودگی چاهکها به یکدیگر باشید و از این امر پرهیز کنید.

۹) ترتیب افزودن محلولها به چاهکها را طبق بروشور رعایت نمایید. خصوصا ترتیب و جهت ریختن سوبسترا و ترتیب و جهت ریختن محلول بازدارنده.

۱۰) انجام یک تست توسط یک پرسنل انجام شود. واگذاری ادامه تست توسط فرد دیگر اصلا توصیه نمی شود.

۱۱) در ریختن محلولهای مختلف و نمونه های متفاوت از سر سمپلر جدید استفاده نمایید.

۱۲) از استقرار صحیح نوک سمپلر به سمپلر اطمینان حاصل نمایید.

۱۳) 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.

۱۴) جایگاه و چاهک نمونه های غیر عادی را یادداشت کنید (نمونه های ایکتر، لیپمیک، همولیز).

۱۵) ترجیحا استانداردها را دوبل گذاشته، از تعداد استانداردها نکاهید.

۱۶) از پرسنل با تجربه در انجام آزمایش استفاده شود.

از ابزار کالیبره استفاده شود. این امر شامل سمپلرها، انکوباتور و دستگاه خوانشگر می باشد

پس از مرور اطلاعات فوق نظر شما را به معایب شایع در زمان انجام تست های الایزا و عامل مربوط به آن جلب می نماییم.

از جمله علل دقت پایین یا نتایج نا مناسب نمونه های دوبل می توان فهرست وار با موارد ذیل اشاره نمود:

۱) آسیب کنژوگه آنزیمی

۲) آسیب سوبسترا یا کروموژن

۳) عدم کیفیت نوک سمپلر

۴) کالیبر نبودن سمپلر

۵) نقص در مرحله شستشو، چنانچه شوستشو اتوماتیک باشد، این امکان وجود دارد که سرعت و فشار محلول بیش از حد آهسته و یا تند باشد

۶) زمان انکوباسیون نامناسب

۷) دمای انکوباسیون نامناسب

۸) آلودگی چاهک به چاهک

۹) خشک شدن میکروپلیت پس از شستشو

۱۰) نگهداری نامناسب میکروپلیت

۱۱) اشکال در مرحله پوشش آنتی ژن یا آنتی بادی (Coating)

۱۲) عدم ثبات مولکول تثبیت شده به روی میکروپلیت

۱۳) عدم تعادل حرارتی کیت قبل از استفاده

۱۴) دقت نامناسب آنزیم

۱۵) آلودگی محلول بازدارنده

۱۶) آسیب کف چاهک ها

۱۷) آلودگی کف چاهک ها

چرا در برخی مواقع جذب نوری چاهک ها بیش از حد انتظار است؟

۱) غلظت بالای کروموژن یا سوبسترا

۲) اشکال در مرحله رقیق سازی محلول ها خصوصاً کنژوگه آنزیمی

۳) عدم رعایت زمان انکوباسیون

۴) عدم رعایت دمای انکوباسیون

۵) کامل نبودن مرحله شستشو (رقیق بودن محلول شستشو)

۶) اشکال در مرحله پوشش دادن چاهک ها

۷) اختلاط محلول های مشابه با سری های ساخت متفاوت

۸) انتخاب نامناسب طول موج خوانش

۹) کالیبره نبودن دستگاه خوانشگر

۱۰) آلودگی کف چاهک ها

۱۱) آسیب فیزیکی کف چاهک ها

۱۲) کالیبره نبودن سمپلر

۱۳) آلوده بودن ظرف آماده سازی سوبسترا- کروموژن

۱۴) وجود ذرات غیر قابل تشخیص با چشم غیر مسلح در سوبسترا

۱۵) وجود ذرات غیر قابل تشخیص با چشم غیر مسلح در کروموژن

۱۶) وجود ذرات غیر قابل تشخیص با چشم غیر مسلح در بازدارنده

۱۷) آلودگی سوبسترا کروموژن با آنزیم

چرا جذب نوری چاهک ها کمتر از انتظار است؟

۱) آماده سازی یا رقیق سازی نامناسب کنژوگه آنزیمی

۲) زمان انکوباسیون نامناسب

۳) دمای انکوباسیون نامناسب

۴) سوبسترا کروموژن ناکافی

۵) آسیب سوبسترا و یا کروموژن

۶) عدم اختلاط کافی محلول ها

۷) اشکال دستگاه خوانشگر

۸) تکان دادن (Shaking) نامناسب در تست های نیازمند به تکان دادن این مرحله

۹) آسیب کنژوگه آنزیمی

۱۰) آسیب میکروپلیت

۱۱) آسیب بخش بیوتین دار (در کیت های دارای سیستم مذکور)

۱۲) آسیب بخش آویدین دار (در کیت های دارای سیستم مذکور)

۱۳) غلظت بالای محلول شستشو

۱۴) افزایش تعداد دفعات شستشو

۱۵) عدم تعادل حرارتی محلول های کیت قبل از استفاده

چرا اصلاً میکروپلیت رنگ نمی گیرد؟

۱) عدم پوشش میکروپلیت

۲) جابجایی استفاده از میکروپلیت

۳) نریختن یا اشتباه ریختن کنژوگه آنزیمی

۴) نریختن یا اشتباه ریختن سوبسترا

۵) نریختن یا اشتباه ریختن کروموژن

۶) استفاده از محلول شستشوی غلیظ

۷) تخلیه میکروپلیت قبل از محلول بازدارنده (خصوصاً در کیت هایی که از TMB استفاده نمی شود.)

۸) جابجایی استفاده از کنژوگه

۹) جابجایی قرار دادن کنژوگه در کیت

۱۰) جابجایی یا نریختن بازدارنده (خصوصاً در کیت های ALP)

در کلیه موارد فوق فعالیت آنزیمی در ویال مربوطه وجود دارد.

دلیل جذب نوری بالای **NSB** یا بلانک چیست؟

۱) افزایش نامناسب کنژوگه آنزیمی

۲) شستشوی ناکامل میکروپلیت

۳) آسیب محلول سوبسترا کروموژن

۴) آلوده شدن چاهک های مذکور

۵) جا افتادن چاهک های مذکور هنگام شستشو

۶) افزایش درجه حرارت انکوباسیون

۷) افزایش زمان انکوباسیون

۸) رقیق بودن محلول شستشو

۹) قرار گرفتن چاهک های مذکور در پدیده لبه (edge effect)

دلیل جابجایی منفی استاندارد نسبت به انتظار چیست؟

۱) زمان انکوباسیون نامناسب

۲) دمای انکوباسیون نامناسب

۳) عدم تعادل حرارتی محلول ها (کیت به دمای محیط نرسیده است.)

۴) اشکال دستگاه خوانشگر

۵) کالیبر نبودن سمپلر

۶) حجم نامناسب استاندارد (مثلا در اثر تنظیم نامناسب حجم سمپلر)

چرا گاهی نتایج منحنی استاندارد مناسب است ولی پاسخ بیماران کلا بالا و پایین می باشد؟

۱) دقت نامناسب نمونه (خصوصا در مورد کیت های اتو ایمیون و یا TORCH)

۲) تهیه نامناسب غلظت استاندارد ها در شرکت سازنده

۳) آماده سازی نادرست استاندارد های لیوفیلیزه

۴) آسیب محلول بافری جابجا کننده در سنجش های تام (مانند T4,T3)

۵) افت مقادیر استاندارد در اثر آلودگی

۶) ذوب و انجماد نمونه های استاندارد

۷) تازه نبودن نمونه های سرمی

۸) جمع آوری- نگهداری و ارسال نامناسب نمونه ها

چرا به طور اتفاقی برخی از چاهک ها رنگ بالای کاذب دارند؟

۱) آلودگی چاهک

۲) اشکال در مرحله پوشش دادن میکروپلیت

۳) جا افتادن برخی از چاهک ها هنگام شستشو با دست

۴) مسدود بودن برخی از مجاری شستشوگر دستگاه شستشوی خودکار

۵) استفاده از نوک سمپلر های آلوده

چرا تشکیل رنگ با تاخیر و سرعت پایین انجام می شود؟

۱) آسیب کنژوگه آنزیمی

۲) افت نامناسب غلظت کنژوگه آنزیمی

۳) آسیب مولکول تثبیت شده به روی میکروپلیت (Ag یا Ab)

۴) دمای پایین زمانهای انکوباسیون

۵) کاهش زمانهای انکوباسیون

۶) آسیب و ضعف سوبسترا کروموژن (دمای نگهداری نامناسب، آلودگی سوبسترا باعث افت میزان H_2O_2 این محلول می گردد.)

۷) اختلاط نامناسب محلول های سوبسترا کروموژن

چرا گاهی جذب نوری نوارهای حاشیه ای از مرکزی بیشتر و یا کمتر است؟

پدیده فوق به اثر لبه (Edge effect) مشهور است مهمترین عوامل بروز این پدیده عبارتند از عدم یکنواختی حرارتی ویا تابش نور نوارهای لبه ای و مرکزی. اغلب سوبسترا ها به نور حساس هستند تفاوت تابش نور به نوارها باعث تفاوت شدت نور در آنها خواهد شد. اختلاف دمای نوارها نیز عینا همین ایراد را بوجود می آورد. انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به دور از نور این مشکل را برطرف می کند اما چنانچه انکوباتور قبل از انکوباسیون متعادل نشده باشد و یا در زمان انکوباسیون درب انکوباتور باز و بسته شود علاوه بر تغییر شیب حرارتی از قسمت نزدیک به درب انکوباتور نسبت به بخش های عقب تر، تابش نور نیز یکنواخت نبوده و اثر لبه بخوبی حذف نخواهد شد. عدم تعادل حرارتی معرف ها نیز می تواند اثر مشابهی داشته باشد. لذا کلیه اجزای کیت را قبل از استفاده به دمای آزمایشگاه برسانید. انکوباتور را به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رسانیده، سپس با پوشش کاغذ پشت چسب دار و قرار دادن در انکوباتور از اختلاف تابش نوری و درجه حرارت جلوگیری نمایید تا اثر لبه حذف گردد.

رفع اشکالات

پس از عیب یابی، رفع اشکالات بسیار ساده می باشد. در پاره ای از موارد اشکال به مرحله تولید کیت برمی گردد که با انعکاس مطلب به شرکت سازنده و جایگزینی برطرف می گردد. در بسیاری از موارد اشکال در فساد برخی از اجزاء کیت می باشد که باید از کمپانی سازنده جزء مورد نظر باهمان سری ساخت را تهیه نمود. در مواردی اشکال مربوط به دستگاه ها شامل سمپلر ها، دستگاه های الایزا ریدر، انکوباتور، شیکر و یا دستگاه شستشوی خودکار است که با ارجاع به بخش سرویس شرکت سازنده ایراد برطرف می شود. مواردی که به اشکالات اجرایی تست، اعم از رقیق سازی نامناسب، جابجایی استفاده از محلول ها، فراموش کردن استفاده از یک محلول، نوک سمپلرهای غیر مطمئن و ... مربوط است با تعویض و تکرار آزمون، قابل حل خواهد بود.