

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

نگاهی به انواع خطاها در الایزا

همانطور که می‌دانید تستهای الایزا بر پایه اندازه‌گیری کمپلکس رنگی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی استوار است، گاهی اوقات برای همکاران محترم در اخذ نتایج صحیح، مشکلاتی پیش می‌آید، که باعث بدست آمدن جوابهای غیر واقعی می‌شود، لذا بر آن شدیم تا مروری بر منابع خطا در روشهای الایزا داشته باشیم، امید است با رعایت موارد یاد شده دقیق‌ترین نتایج در تستهای الایزا حاصل شوند.

نکات مهم به هنگام نمونه‌گیری از بیماران و جداسازی سرم

- اطلاعات بالینی بیمار بطور کامل در یک برگ ثبت شود.
- نمونه‌گیری از بیمار باید به دقت انجام گیرد زیرا برخی عوامل مثلا بستن گارو به مدت طولانی ممکن است موجب ایجاد خطا در اندازه‌گیری تست گردد.
- دقت در نحوه جداسازی سرم از لخته به نحوی که سرم جدا شده حاوی فیبرینوژن و یا ذرات دیگر نباشد.
- نمونه مورد استفاده حتی‌الامکان لیز (Lyses)، ایکتریک و لیپمیک نباشد.
- تا حد امکان از فریز و دفریز نمودن نمونه‌های موجود جلوگیری شود زیرا باعث کاهش سطح هورمونهای سرم بویژه FT₄ و T₄ می‌گردد.

نکات قابل توجه قبل از انجام آزمایش

- حمل و نقل کیتها و همچنین نگهداری آنها باید در دمای °C 2-8 صورت گیرد.

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

- کیت مورد مصرف از لحاظ اعتبار کمپانی سازنده آن، بسته‌بندی مناسب و نیز موجود بودن تمامی استانداردها و کنترل‌های مثبت و منفی کنترل گردد.

- ابزارهای حجمی و سمپلرهای مورد استفاده کنترل شوند

- اطمینان از کارکرد صحیح دستگاهها و تجهیزات مورد استفاده بطور مثال اطمینان از صحت طول موج فیلترهای الیزاریدر به کمک استفاده از ماده رنگی با ثبات، نظیر بی کرومات پتاسیم و یا عملکرد صحیح دستگاه واشر (Washer)

- آماده‌سازی بافر یا محلول شستشوی مربوط به هر کیت به اندازه مورد نیاز در هر بار مصرف با دقت کامل و رعایت شرایط استریلیزاسیون و همچنین عدم استفاده از محلولهای شستشوی نامناسب یا آب مقطر ناخالص.
- استفاده از نوک سمپلرهای یکبار مصرف و لوله آزمایش عاری از هرگونه مواد شوینده و پاک کننده و برای سوبسترا از لوله شیشه‌ای که با اسید سولفوریک رقیق، شسته شده و با آب مقطر دو بار تقطیر آبکشی شده باشد استفاده شود.

نکات قابل توجه در شروع انجام تستهای الیزا

- تمامی محلولهای موجود در کیت قبل از مصرف باید به دمای آزمایشگاه برسد، و خوب مخلوط گردند.
- قبل از مصرف، اجزای کیت باید از لحاظ کدورت و آلودگی قارچی و ذرات خارجی بررسی شوند، سعی شود پاکت حاوی میکروپلیت‌ها به دمای اتاق رسیده، بعدا درب آن گشوده شود و سریعا پس از جداسازی تعداد استریپ مورد نیاز به داخل کیسه منتقل گردند تا از ورود گرد و غبار و رطوبت به داخل آنها جلوگیری شود.
- از کلیه استانداردها و کنترل‌های موجود کیت در هر نوبت کاری استفاده شود.
- اجزاء کیت پس از استفاده بلافاصله به یخچال منتقل گردد زیرا منجر به افزایش پایداری کیت می‌شود.

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

- پس از محلول کردن سرم کنترل، 15 دقیقه (برحسب راهنمای کیت) آنرا در حرارت آزمایشگاه قرار داده سپس مورد استفاده قرار گیرد.
- در پایان هر یک از مراحل، (مطابق دستورالعمل کیت) عمل بهم زدن و مخلوط نمودن محتویات چاهکها باید به آرامی صورت گیرد، تا از ایجاد حباب یا انتقال محلول از یک چاهک به چاهکهای مجاور جلوگیری شود.
- جهت کنترل کیفی و اطمینان از سالم بودن سوبسترا و کونژوگه می توان حجمهای مساوی از این دو را با هم مخلوط نمود در اینصورت رنگ حاصله بایستی به سرعت ایجاد شود.
- از یک تکنیک ثابت در عمل پیپت نمودن برای جلوگیری از پرتاب قطرات به سایر چاهکها و همچنین یکسان بودن شرایط برای تمامی چاهکها استفاده شود، برای این منظور در هر سری کاری، آزمایش کننده خود باید عمل پیپت نمودن را انجام دهد که این کار بایستی بطور مایل و چسبیده به جدار فوقانی چاهکها صورت پذیرد.
- اتصال محکم نوک سمپلر به بدنه سمپلر در حین کار الزامی است.
- دقت در استفاده مکرر از محلولها بخصوص سوبسترا و جلوگیری از برخورد نوک سمپلر آلوده با سوبسترا جهت ممانعت از ایجاد آلودگی قارچی یا باکتریال ضروری است.
- محلول سوبسترای آماده کار باید در هر نوبت کاری تهیه شده و از مخلوط نمودن محلول تازه با محلول قبلی جلوگیری شود.
- از ایجاد خراش، برجا ماندن اثر انگشت و همچنین لبریز شدن محلول در سطوح زیرین چاهکها جلوگیری گردد.
- کلیه مراحل مطابق روش کیت مورد استفاده و بطور پیوسته و بدون انقطاع، باید صورت گیرد تا از خشک شدن میکروپلیت پس از شستشو و همچنین آلودگی آنها جلوگیری شود.

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

- از نوسانات غیر تدریجی دما در هنگام انکوباسیون، مانند باز بودن پنجره یا درب آزمایشگاه در محل آزمایش جلوگیری نمائیم.

- دقت در مراحل مختلف شستشو و عدم باقیماندن ذرات کونژوگه آنزیمی در کف چاهکها

- توجه داشته باشید، در صورت کریستاله شدن محلول شستشو، باید قبل از مصرف آنرا در دمای 37 حل نمود.

- جلوگیری از تبخیر چاهک در مدت زمان انکوباسیون با استفاده از پارافیلیم یا چسبهای مناسب و یا استفاده از محفظه مسدود حاوی پنبه آغشته به آب مقطر ضروری است.

- هیچگاه از محلولهایی که با سری ساخت متفاوت و یا دارای اجزای تاریخ گذشته هستند، استفاده نشود.

- باید توجه داشته باشیم که ایجاد پدیده هوک (Hook Effect) باعث ایجاد نتایج پائین کاذب می شود لذا

توصیه می شود برای جلوگیری از این پدیده سرم رقیق نشده و سرم یک دهم رقیق شده، مخلوط و آزمایش را انجام دهیم، تا اثر احتمالی هوک اصلاح شود.

- دقت در رعایت دقیق Temperature & Time، زیرا کوتاه نمودن زمان در برخی کیتها موجب کاهش یا افزایش نتایج خواهد شد.

- Edge-Effect یا اثر حاشیه ای انکوباتور 37 درجه سانتی گراد به واسطه شوک حرارتی و اختلاف حرارت محیط

کار و محیط داخلی انکوباتور حاصل می گردد و عمدتاً در سطح استریپهایی که مجاور درب خارجی انکوباتور قرار

دارند ایجاد می گردد، و جذب نوری (OD) غیر یکنواخت خصوصاً در استریپهای ابتدایی حاصل می شود. این امر

بواسطه ورود ناگهانی سرمای محیط به داخل انکوباتور می باشد، لذا از انکوباسیون پلیتهای الیزا در مکانهایی که

شرایط محیطی متغیر دارند پرهیز نمائید.

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

نکات مهم مرحله شستشو تستهای الایزا

هدف اصلی از شستشو، دفع و تخلیه کامل اتصالاتها و مولکولهای غیراختصاصی از محیط واکنش می باشد، لذا رعایت دقیق تعداد دفعات و نحوه شستشو مهم است.

- فشار بالای شستشو در روش دستی ناشی از تخلیه سریع بافر می باشد که منجر به جداسازی و حذف اتصالات اختصاصی از کف چاهکها و کاهش کاذب (OD) می گردد.

- فشار پائین شستشو باعث تخلیه آهسته بافر در روشهای دستی منجر به عدم دفع کامل اتصالات غیراختصاصی و افزایش کاذب جذب نوری (OD) می گردد.

- در نظر گرفتن زمان خیس خوردن (Soaking Time) چاهک، در فواصل شستشو (مکش و تخلیه) الزامی است، و معمولا بین 20-40 ثانیه می باشد، این مرحله به جداسازی و دفع کامل اتصالات غیراختصاصی کمک می نماید.

- برای شستشو به روش دستی (با سمپلر) جهت جلوگیری از آسیب فیزیکی به چاهک الایزا و جداسازی کمپلکسهای پوشیده شده در کف چاهک، سعی کنید تخلیه نمونه بطور مایل صورت گیرد.

- در پروسه شستشو بهتر است تا نزدیک لبه فوقانی چاهک از محلول شستشو پر شود، پر کردن لبالب محلول شستشو در چاهکها احتمال آلودگی چاهک به چاهک را افزایش می دهد. (حجم 300 میکرولیتر حجم مناسبی است)

- نکته مهم در شستشوی دستی و با سمپلر، جلوگیری از ایجاد حباب هوا در چاهکها و جلوگیری از سرریز شدن محلول شستشو و نیز تماس با کف چاهک می باشد که نهایتا منجر به کاهش کاذب OD می گردد.

- محلول شستشو PBS (بافر فسفات سالین) یکی از مناسبترین محلولهای ایزوتونیک شستشو دهنده می باشد که کمترین اثرات تخریبی روی کمپلکس Ab-Ag در سیستمهای الایزا را دارد.

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

- در شستشو به روش دستی در مرحله مکش، چاهکها بایستی بطور کامل تخلیه شوند، و هیچ قطره اضافی از مایع بافر در کف چاهکها باقی نماند که این کار با برگرداندن یکباره میکروپلیت روی کاغذ جاذب و بدون پرز انجام می‌گردد، خشک نمودن بیش از حد و طولانی مجاز نمی‌باشد.

- توصیه می‌شود جهت شستشوی سریعتر و راحت‌تر و دسترسی به نتایج دقیق‌تر از واشر الیزا استفاده شود.

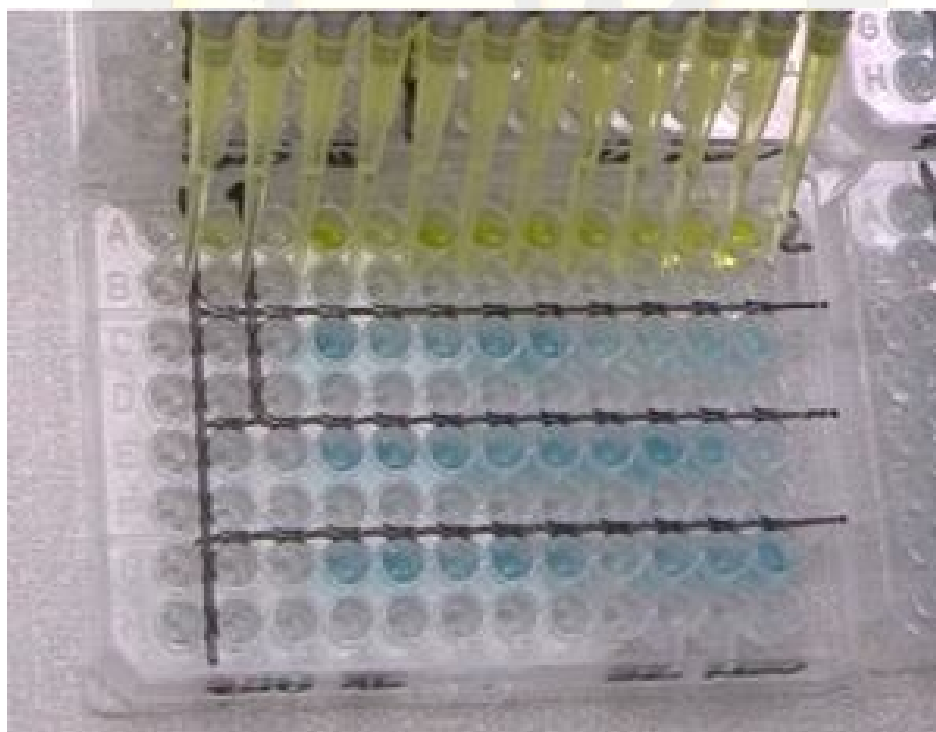
توقف واکنش و قرائت جذب نوری با میکرو پلیت ریدر

توقف کامل واکنش آنزیمی و جلوگیری از افزایش رنگ محیط آنزیمی پس از افزودن محلول اسیدی (Stopping) بستگی به تکان دادن کافی و کامل (Shaking) میکروپلیتها دارد. تکان شدید باعث آلودگی چاهک به چاهک شده و تکان آهسته یا بکارگیری روتاتور معمولی با قطر چرخش زیاد و تعداد دور کم باعث عدم اختلاط خوب معرفها و منجر به ادامه و پیشرفت جزئی واکنش در طی زمان در نتیجه تغییر OD و بروز خطا می‌گردد.

جهت رفع مشکلات فوق توصیه می‌شود از شیکرانکوباتور الیزا استفاده گردد.

خوانش میزان جذب محتوی چاهکها توسط الیزا ریدر الزاما بایستی در زمان تعیین شده انجام شود.

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی



دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی

منبع:

دنیای گسترده علوم آزمایشگاهی www.labworld.ir

