



VESTA

وستا تجهیز پارت

شناسایی و رفع خطاهای رایج در تکنیک ELISA

طراحی شده در دپارتمان علمی شرکت وستا تجهیز پارت:

دکتر علیرضا لطفی کیان
دکترای علوم آزمایشگاهی بالینی

دکتر روح‌اله تقدسی
فلوشیپ علوم آزمایشگاهی



فهرست

۱. دلایل احتمالی و تصحیح مقادیر بالای سیگنال ۰۲
۲. نتایج خارج از محدوده ۰۳
۳. تغییرات گسترده نتایج ۰۴
۴. پس زمینه شدید (جذب زمینه ای بالا یا High Background) ۰۶
۵. عدم وجود سیگنال ۰۷
۶. منحنی استاندارد ضعیف ۰۹
۷. دلایل احتمالی و تصحیح مقادیر بالای کنترل منفی و ایجاد Background در میکروپلیت ۱۰
۸. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد چاهک‌های تماماً رنگی ۱۰
۹. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد چاهک‌های فاقد رنگ ۱۱
۱۰. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد رنگ‌زایی با سرعت زیاد ۱۱
۱۱. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد رنگ‌زایی با تاخیر و سرعت کم ۱۲
۱۲. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد جذب نوری پایین ۱۲

شرکت وستا تجهیز پارت در سال ۱۳۹۰ با هدف فعالیت در زمینه تأمین تجهیزات و کیت‌های آزمایشگاهی در ایران تأسیس گردید. این شرکت با تمرکز بر ارائه برندهای معتبر جهانی، در حوزه‌های فروش، خدمات پس از فروش و مشاوره تخصصی، همواره در تلاش بوده تا خدماتی متمایز و با کیفیت به مشتریان خود ارائه دهد. امروز، وستا تجهیز پارت به عنوان یکی از پیشگامان در تأمین تجهیزات حوزه‌های تشخیصی و تحقیقاتی شناخته می‌شود.

۱. دلایل احتمالی و تصحیح مقادیر بالای سیگنال

علت	راه حل
۰۱ آلوده بودن محلول سوبسترا - TMB	قبل از اضافه کردن محلول سوبسترا - TMB اطمینان حاصل کنید که محلول شفاف و بی‌رنگ باشد. قبل از اضافه کردن محلول سوبسترا، از تمیز بودن پلیت اطمینان حاصل کنید.
۰۲ عدم توقف واکنش سوبسترا	در صورت عدم توقف واکنش سوبسترا تولید رنگ ادامه پیدا می‌کند
۰۳ انتظار بیش از حد برای خواندن پلیت پس از افزودن محلول متوقف کننده	تولید رنگ ادامه پیدا می‌کند بلافاصله پس از افزودن محلول متوقف کننده پلیت را بخوانید.
۰۴ آلوده بودن وسایل شیشه‌ای	از تمیز بودن ظروف شیشه‌ای اطمینان حاصل کنید. برای جلوگیری از آلودگی و انقضای زودرس معرف‌ها، هرگز مستقیماً از بطری پیت نکنید. مقدار لازم را در ظرف تمیز بریزید. فقط باید از محصولات شیشه‌ای و پلاستیکی با کیفیت بالا برای نگهداری انبوه استفاده کرد. معرف‌های اضافی را به ظرف ذخیره سازی اولیه برنگردانید.
۰۵ انکوباسیون سوبسترا در حضور نور انجام شده است	انکوباسیون سوبسترا باید در تاریکی انجام شود. اطمینان حاصل کنید که سوبسترا در یک مکان تاریک نگهداری می‌شود. در حین آزمایش نور محیط را محدود کنید.
۰۶ شستشوی ناکافی چاهک‌ها	شستشوی چاهک‌ها را بر اساس دستورالعمل توصیه شده انجام دهید. همچنین محلول شستشو با رقت توصیه شده در کیت تهیه گردد.
۰۷ غلظت زیاد معرف تشخیص (کونژوگه آنزیمی)	مطمئن شوید که معرف به درستی رقیق شده است و در صورت نیاز، معرف را بر مبنای غلظت توصیه شده رقیق کنید.
۰۸ کثیف بودن پلیت	کف پلیت را تمیز کنید
۰۹ رقت‌های منحنی استاندارد به درستی تهیه نشده است	روش سمپل کردن خود را بررسی کنید، ممکن است نیاز به کالیبراسیون سمپلرها باشد. همچنین محاسبات و مراحل مختلف تهیه رقت (طبق پروتکل کیت مصرفی) را مجدداً بررسی کنید.
۱۰ انکوباسیون طولانی‌تر از زمان توصیه شده	اطمینان حاصل کنید که زمان انکوباسیون شما به درستی رعایت شده است و به دستورالعمل ارائه شده همراه با دفترچه راهنمای فنی پایبند باشید.
۱۱ استفاده مجدد از چسب‌های پلیت یا مخازن معرف‌ها، منجر به آلودگی و افزایش سیگنال می‌گردد. استفاده مجدد از برجسب‌های پلیت که حاوی باقیمانده‌ی HRP است، ممکن است منجر به واکنش و ایجاد رنگ آبی شود.	برای جلوگیری از این امر، برای هر مرحله چسب و مخزن معرف تازه استفاده کنید.
۱۲ آلوده بودن بافر شستشو	همیشه از بافر تازه استفاده کنید.
۱۳ ایجاد آلودگی آنزیمی در نمونه‌های سرمی، توسط پیپت و سرسمپلر آلوده با سوبسترا و یا کونژوگه آنزیمی	برای هر نمونه برداری از پیپت و نوک سمپلر جدید استفاده کنید.
۱۴ آلودگی متقاطع با دیگر نمونه‌ها و یا با کنترل مثبت	برای هر نمونه برداری از پیپت و نوک سمپلر جدید استفاده کنید. از سرریز شدن چاهک‌ها و ورود محتویات چاهک‌ها به هم جلوگیری شود.
۱۵ درجه حرارت بالا در مرحله انکوباسیون و تبخیر چاهک‌ها	اطمینان حاصل کنید که دمای انکوباسیون شما به درستی رعایت شده است و به دستورالعمل ارائه شده همراه با دفترچه راهنمای فنی پایبند باشید.
۱۶ عملکرد اشتباه دستگاه الیزا ریدر و نیز استفاده از فیلتر نادرست برای خوانش جذب نوری	دستگاه الیزا ریدر باید به صورت دوره‌ای و منظم کالیبره شود. همچنین از فیلتر با جذب نوری توصیه شده در کیت استفاده شود (از فیلتر رفرانس نیز استفاده گردد).

۰۲ نتایج خارج از محدوده

علت	راه حل
۰۱ نمونه ها حاوی آنالیت نیستند یا مقدار آنالیت از مقادیر قابل تشخیص توسط کیت کمتر است.	اگر حجم نمونه ها کمتر از حد تشخیصی باشد ممکن است بتوان از نمونه با حجم بالا استفاده کرد. برای تغییر دستورالعمل با پشتیبان فنی تماس بگیرید.
۰۲ نمونه ها حاوی غلظت آنالیت بیشتر از بالاترین غلظت استاندارد هستند.	نمونه ها ممکن است به رقیق سازی بیشتر نیاز داشته باشند.
۰۳ شستشوی ناکافی	از روش شستشوی مناسب (دستی یا دستگاهی) استفاده کنید. شستشوی چاهک ها بر اساس دستورالعمل و با رقت توصیه شده در کیت انجام شود. در پایان هر مرحله شستشو، پلیت را به صورت وارونه روی دستمال جاذب قرار دهید و در صورت لزوم با ضربه زدن مایعات اضافی را خارج کنید.
۰۴ عدم استفاده یا استفاده مجدد از چسب های پوشاننده پلیت	در طول انکوباسیون، چسب های محافظ پلیت را بچسبانید. هر بار که پلیت را باز می کنید از یک چسب تازه استفاده کنید. این کار از انتقال آلودگی از چاهک ها به یکدیگر جلوگیری می کند.
۰۵ رقیق سازی نادرست	روش سمپل کردن خود را بررسی کنید، ممکن است نیاز به کالیبراسیون سمپلرها باشد. همچنین محاسبات و مراحل مختلف تهیه رقت (طبق پروتکل کیت مصرفی) را مجدداً بررسی کنید.
۰۶ انکوباسیون طولانی تر از زمان توصیه شده	کیت های تولید شده دارای دستورالعمل بهینه شده هستند. مطمئن شوید که از زمان های توصیه شده انکوباسیون پیروی می کنید. در هر مرحله از وجود دمای ثابت در طول انکوباسیون اطمینان حاصل کنید تا از تسریع یا کاهش سرعت واکنش جلوگیری شود.
۰۷ غلظت بالای سوبسترا	در صورت استفاده از سوبسترا در غلظت بالا، محلول سوبسترا خیلی زود مخلوط و رنگ آبی ایجاد می شود. بنابراین باید از غلظت مناسب کونژوگه و سوبسترا طبق دستورالعمل کیت استفاده شود.
۰۸ غلظت بالای استرپتاویدین - HRP	رقیق سازی را مجدداً و بر اساس دستورالعمل کیت انجام دهید.
۰۹ استفاده مجدد از چسب های پلیت یا مخازن معرف ها، منجر به آلودگی و افزایش سیگنال می گردد. استفاده مجدد از برجسب های پلیت که حاوی باقیمانده ی HRP است، ممکن است منجر به واکنش و ایجاد رنگ آبی شود.	برای هر مرحله از چسب و مخزن معرف تازه استفاده کنید.
۱۰ آلودگی بافر با فلزات یا HRP	از بافر تازه استفاده کنید

۳. تغییرات گسترده نتایج

علت	راه حل
۰۱ خطای سمپلر چند کاناله خطا در پیپت کردن محلول و نمونه‌ها	کالیبراسیون سمپلر چند کاناله الف) پیپت‌ها و سمپلرها را مطابق دستورالعمل کالیبر کرده و مطمئن شوید میزان درستی از مواد را برمی‌دارند. ب) دستگاه دیسپنسور را چک نمائید.
۰۲ شستشوی پلیت کافی یا یکنواخت انجام نشده	کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید و در صورت عدم کالیبره بودن آنها باید کالیبره شوند. مطمئن شوید که نوک سمپلرها محکم بسته شده اند. نوک سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند. اطمینان حاصل کنید که تمام معرف ها در تمام مراحل شستشو به طور کامل حذف شده اند. الف) عمل شستشو را بر اساس دستورالعمل کیت مصرفی انجام دهید. ب) هر چاهک را کامل با محلول شستشو پر کنید؛ مراقب باشید محلول شستشو سرریز نشود؛ پس از خالی کردن محلول شستشو، پلیت را به خوبی خشک کنید.
۰۳ نمونه های غیرهمگن (غیر یکنواخت) نمونه‌ها به خوبی مخلوط نشده‌اند.	نمونه ها را قبل از سمپل کردن به خوبی مخلوط کنید. در ضمن لازم است تا نمونه ها به تعادل دمایی با محیط برسند. نمونه‌ها را به آرامی و به طور مساوی مخلوط کنید.
۰۴ نمونه ها ممکن است مواد ذره ای زیادی داشته باشند	ذرات را با استفاده از سانتریفیوژ حذف کنید.
۰۵ هم زدن ناکافی پلیت منجر به عدم پراکندگی یکنواخت معرفها در هر چاهک می شود.	پلیت باید در تمام مراحل انکوباسیون با استفاده از تکان دهنده پلیت الیزا و یا به روش دستی با سرعتی که محلول های موجود در چاهک ها در حرکت ثابت و بدون پاشیدن قرار می گیرند، هم زده شود.
۰۶ آلودگی متقاطع چاهک ها	هنگام استفاده مجدد از چسب های پلیت، مطمئن شوید چسب ها به هیچ گونه معرفی آلوده نشده باشند. هنگام استفاده از یک نوک سمپلر که برای افزودن معرف استفاده می شود، باید احتیاط کرد. اطمینان حاصل کنید که نوک سمپلر با معرف های روی پلیت تماس پیدا نکرده باشد. برای هر نمونه برداری از پیپت و نوک سمپلر جدید استفاده کنید. از سرریز شدن چاهک ها و ورود محتویات چاهک ها به هم جلوگیری شود.
۰۷ چیده شدن پلیت ها روی هم طی زمان انکوباسیون	چیدن پلیت ها بر روی یکدیگر اجازه توزیع یکنواخت دما در چاهک های پلیت را نمی دهد. از چیدن پلیت ها بر روی یکدیگر خودداری کنید.
۰۸ عملکرد نامناسب سمپلر	کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید و در صورت عدم کالیبره بودن آنها باید کالیبره شوند. مطمئن شوید که نوک سمپلرها محکم بسته شده اند. نوک سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند. اطمینان حاصل کنید که نوک سمپلر تمامی حجم مورد نظر را آسپیره و آزاد کند.
۰۹ رقت های آنتی بادی یا معرف ها به خوبی مخلوط نشده اند.	برای اطمینان از وجود غلظت ثابت در همه چاهک ها، اطمینان حاصل کنید که همه معرفها و نمونه ها قبل از سمپل کردن روی پلیت ها مخلوط شده اند.

علت	راه حل
۱۰ چاهک ها خشک شده اند.	تمامی مراحل تست را پشت سرهم و بی وقفه انجام دهید. اطمینان حاصل کنید که حجم صحیح معرف ها و بافرها همانطور که در دستورالعمل مشخص شده است به هر چاهک اضافه شده است. هنگام انکوباسیون اطمینان حاصل کنید که چسب و یا درپوش روی پلیت ها قرار دارند. یک سینی آب (آب تمیز/استریل شده) را جهت حفظ رطوبت در انتهای انکوباتور قرار دهید. دما و مدت زمان انکوباسیون را بر اساس دستورالعمل موجود در کیت رعایت کنید.
۱۱ ته پلیت کثیف است (کثیف بودن کف پلیت).	قبل از خوانش پلیت ها، ته پلیت ها را با دقت تمیز کنید. قبل از قرائت جذب نوری زیر پلیت را با دستمال مخصوص بدون ذرات پخش شونده پاک کنید.
۱۲ وجود حباب در چاهک ها	قبل از خواندن پلیت از عدم وجود حباب اطمینان حاصل کنید. تمام نقاط چاهک ها باید در تماس با محلول ها و بافرها قرار گیرند و نباید هیچ گونه حباب هوایی ایجاد شود.
۱۳ اثر لبه ای (Edge effect)	اطمینان حاصل کنید که پلیت و تمام معرف ها در دمای ثابت هستند. پلیت را در محیطی با دمای کنترل شده، مانند انکوباتور با توزیع دمای مناسب، انکوبه کنید. از قرار دادن پلیت در نزدیکی لبه های انکوباتور یا هر منبع گرمایی دیگر خودداری کنید. مطمئن شوید پلیت و معرف ها قبل از شروع آزمایش به دمای محیط رسیده اند. همچنین اطمینان حاصل کنید که در طول سنجش، پلیت در دمای ثابت قرار دارد. در انکوباسیون ۳۷ درجه، پلیت را در محیطی با دمای کنترل شده، مانند انکوباتور با توزیع دمای مناسب، انکوبه کنید. از قرار دادن پلیت در نزدیکی لبه های انکوباتور یا هر منبع گرمایی دیگر خودداری کنید.
۱۴ ذخیره نامناسب	اطمینان حاصل کنید که معرف ها و نمونه ها در دمای صحیح ذخیره شده اند. به شرایط نگهداری روی برجسب کیت دقت شود.
۱۵ تغییر در دستورالعمل	به دستورالعملی که همراه با کیت ارائه می شود، پایبند باشید.
۱۶ محاسبه نادرست منحنی استاندارد	محاسبات را بررسی کنید، منحنی استاندارد جدیدی ایجاد کنید و از کنترل داخلی استفاده کنید.
۱۷ آلودگی بافر	از بافر تازه استفاده کنید.
۱۸ خراشیده شدن کف چاهک	فاصله مناسب سر سمپلر با ته چاهک ها رعایت شود. از تماس با کف چاهک در حین سمپل کردن خودداری کنید. نوک سمپلر را روی دیواره چاهک قرار دهید و سعی کنید تخلیه مایع به صورت مایل انجام گیرد تا از ایجاد اختلال در کف چاهک جلوگیری شود.
۱۹ محلول های معرف منقضی	تاریخ انقضای محلول معرف را بررسی کرده و تا حد امکان از محلول های تازه آماده شده استفاده کنید
۲۰ تغییر در دمای انکوباسیون	از دستورالعمل کیت پیروی کنید. حفظ دمای ثابت در طول انکوباسیون برای تکرارپذیری و دقت اهمیت دارد.
۲۱ خراش دادن سطح پلیت با سر سمپلر	فاصله مناسب سر سمپلر با ته چاهک ها رعایت شود.

۴- پس زمینه شدید (جذب زمینه ای بالا یا High Background)

راه حل

علت

از پلیت و چاهکهای آلوده استفاده نکنید. در طی مراحل مختلف انکوباسیون جهت جلوگیری از آلودگی از برجسب های تازه استفاده کنید. هنگام افزودن یک معرف برای چاهک ها اطمینان حاصل کنید که نوک سمپلر با محتویات چاهک ها تماس پیدا نکرده باشد.

۰۱ کف چاهک ها آلوده است

شستشوی چاهک ها را بر اساس دستورالعمل توصیه شده انجام دهید. همچنین محلول شستشو با رقت توصیه شده در کیت تهیه گردد. در صورتیکه زمان soak time (خیساندن) توصیه شده باشد باید حتماً رعایت گردد.

۰۲ شستشوی ناکافی و یا محلول شستشوی رقیق

تهیه رقت و استفاده طبق دستورالعمل کیت

۰۳ غلظت زیاد کونژوگه آنزیمی (غلظت زیاد معرف تشخیصی)

اطمینان حاصل کنید که زمان انکوباسیون به درستی رعایت شده است و به دستورالعمل ارائه شده همراه با دفترچه راهنمای فنی پایبند باشید. کالیبراسیون تایمرها را چک کنید.

۰۴ درجه حرارت بالا در مرحله انکوباسیون و تبخیر چاهک ها

شستشوی چاهک ها را بر اساس دستورالعمل توصیه شده انجام دهید. همچنین محلول شستشو با رقت توصیه شده در کیت تهیه گردد. اطمینان حاصل کنید که همه چاهک ها با بافر شستشو پر شده و به طور کامل آسپیره شده اند. در صورتیکه زمان soak time (خیساندن) توصیه شده باشد باید حتماً رعایت گردد. در صورت امکان از دستگاه شستشو دهنده اتوماتیک پلیت استفاده کنید.

۰۵ شستشوی نامناسب و ناکافی

نمونه ها را با سوبسترا به تنهایی آزمایش کنید تا فعالیت آنزیم آلوده کننده را بررسی کنید. برای غیر فعال کردن آنزیم های آلوده کننده، مهارکننده های آنزیمی خاص را به نمونه اضافه کنید. به عنوان مثال، اگر آنزیم آلوده کننده یک پروتئاز باشد، افزودن مهارکننده های پروتئاز می تواند از تجزیه پروتئین ها یا واکنش با سوبسترا جلوگیری کند.

۰۶ آنزیم های آلوده کننده موجود در نمونه

بافر تازه تهیه کنید، بافر در ظرف تمیز نگهداری شود.

۰۷ آلودگی بافر شستشو

بلافاصله پس از افزودن محلول متوقف کننده پلیت را بخوانید.

۰۸ انتظار بیش از حد برای خواندن پلیت پس از افزودن محلول متوقف کننده

اطمینان حاصل کنید که سوبسترا در یک مکان تاریک نگهداری می شود. مجاورت با نور منجر به تشکیل رنگ زمینه ای آبی قبل از مجاورت با پلیت می گردد.

۰۹ قرار گرفتن سوبسترا در معرض نور، قبل از مصرف

انکوباسیون سوبسترا باید در تاریکی یا در شرایط توصیه شده شرکت سازنده انجام شود. در حین آزمایش نور را محدود کنید.

۱۰ انکوباسیون سوبسترا در مجاورت نور انجام شده است.

کف پلیت را با دستمال تمیز کنید. قبل از قرائت جذب نوری زیر پلیت را با دستمال مخصوص بدون ذرات پخش شونده پاک کنید.

۱۱ کثیف بودن پلیت

از کیفیت آب مقطر (سختی، pH و ...) مورد استفاده در معرف ها، از جمله بافر شستشو اطمینان حاصل کنید. آب موجود در اجزای ایمونواسی می تواند مستعد آلودگی باشد. حصول اطمینان از کیفیت آب مورد استفاده در معرف ها، از جمله بافر شستشو، در کاهش ریسک پس زمینه بالا در ELISA مهم است.

۱۲ کیفیت پایین آب در معرف ها یا بافر شستشو

برای هر نمونه برداری از پیپت و نوک سمپلر جدید استفاده کنید. از سرریز شدن چاهک ها و ورود محتویات چاهک ها به هم جلوگیری شود.

۱۳ آلودگی متقاطع با دیگر نمونه ها و یا با کنترل مثبت

برای جلوگیری از آلودگی و انقضای زودرس، از تماس محلول سوبسترا با هر منبع احتمالی آلودگی مانند مواد فلزی یا مواد مبتنی بر سیلیس خودداری کنید.

۱۴ آلودگی سوبسترا با یون های فلزی و یا عوامل اکسیدکننده

از فیلتر با جذب نوری توصیه شده در کیت استفاده شود (همچنین از فیلتر رفرانس نیز استفاده شود).

۱۵ استفاده از فیلتر نادرست برای خوانش جذب نوری

علت	راه حل
۱۶ عملکرد اشتباه دستگاه الیزا ریدر	دستگاه باید به صورت دوره‌ای کالیبره و چک شود.
استفاده از انکوباتور خشک به جای مرطوب	انکوباتورهای خشک برای اغلب روش های سنجش ایمنی مناسب نمی باشند مگر اینکه در کیت توصیه شده باشند. لذا معمولا تست های سنجش ایمنی با استفاده از انکوباتورهای مرطوب انجام می شوند.
۱۸ زمان انکوباسیون طولانی تر از آنچه در دستورالعمل توصیه شده است.	اطمینان حاصل کنید که زمان فرایند انکوباسیون به درستی و طبق دستورالعمل کیت مصرفی رعایت شده است. زمان را با استفاده از تایمرهای کالیبر شده اندازه‌گیری کرده و تنظیم نمایید.
۱۹ عدم توقف واکنش و عملکرد معیوب محلول متوقف کننده	افزودن محلول متوقف کننده سالم، منجر به توقف واکنش و تثبیت رنگ می‌شود.
۲۰ استفاده مجدد از برچسب های پلیت یا مخازن معرف ها	برای هر مرحله از برچسب و مخزن معرف تازه و تمیز استفاده کنید.

۵۵ عدم وجود سیگنال

علت	راه حل
۵۱ حذف یکی از معرف های کلیدی نظیر کونژوگه و سوبسترا در روش اجرایی کار	مراحل کار را به ترتیب و بر اساس دستورالعمل موجود در کیت انجام دهید.
۵۲ نمونه حاوی سدیم آزاد	سدیم آزاد به عنوان یک مهارکننده قوی آنزیم پراکسیداز است و هرگز نباید در سنجش هایی که کونژوگه آنزیمی آنها پراکسیداز است از نمونه حاوی سدیم آزاد استفاده شود.
۵۳ زمان انکوباسیون خیلی کوتاه	اطمینان حاصل کنید که زمان انکوباسیون به درستی رعایت شده است و به دستورالعمل ارائه شده همراه با دفترچه راهنمای فنی پایبند باشید. کالیبراسیون تایمرها را چک کنید.
۵۴ غلظت آنالیت زیر محدوده قابل تشخیص است.	اگر حجم نمونه ها کمتر از حد تشخیصی باشد ممکن است بتوان از نمونه با حجم بالا استفاده کرد. برای تغییر دستورالعمل با پشتیبان فنی تماس بگیرید.
۵۵ نوع نمونه نامناسب	در نمونه ای که به عنوان کنترل مثبت استفاده می شود و همچنین در استانداردها، ممکن است سیگنال کاهش یافته یا وجود نداشته باشد. در این صورت با پشتیبان فنی تماس بگیرید.
۵۶ مقدار ناکافی کونژوگه آنزیمی	کونژوگه آنزیمی را با مقدار توصیه شده در دستورالعمل استفاده کنید (در صورت نیاز به رقیق سازی با رقت توصیه شده در کیت تهیه گردد).
۵۷ آماده سازی نادرست نمونه و یا معرف ها	از آماده سازی یا رقیق سازی مناسب نمونه و معرف ها طبق دستورالعمل کیت مصرفی اطمینان حاصل کنید.
۵۸ دمای انکوباسیون خیلی پایین بوده است.	اطمینان حاصل کنید که انکوباسیون در دمای مناسب انجام می شود.
۵۹ طول موج نامناسب (استفاده از فیلتر نادرست برای خوانش جذب نوری)	از فیلتر با جذب نوری توصیه شده در کیت استفاده شود (همچنین از فیلتر رفرانس نیز استفاده شود).

علت	راه حل
۱۰ شستشوی شدید و یا با تعداد دفعات زیاد	بافر شستشو را به آرامی استفاده کنید و اگر از دستگاه شستشو دهنده‌ی اتوماتیک استفاده می‌کنید فشار مناسب را چک کنید. طبق دفعات توصیه شده در کیت شستشو دهید.
۱۱ چاهک‌ها خشک شده است.	پس از شروع آزمایش اجازه ندهید چاهک‌ها خشک شوند. پلیت را با استفاده از فیلم یا نوار درزگیر در زمان انکوباسیون بپوشانید. تمام مراحل انجام تست را بدون وقفه انجام دهید.
۱۲ رشد آهسته رنگ واکنش‌های آنزیمی	محلول سوبسترا را بلافاصله قبل از استفاده آماده کنید. اطمینان حاصل کنید که محلول موجود منقضی نشده و آلوده نیست.
۱۳ مواد داخل کیت (معرف‌ها) به دمای اتاق رسانده نشده‌اند.	مطمئن شوید که تمامی اجزای کیت قبل از انجام تست (۱۵ تا ۲۰ دقیقه) به دمای اتاق رسیده اند (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد).
۱۴ معرف تاریخ مصرف گذشته	تاریخ انقضای تمام معرف‌ها را بررسی کنید. اطمینان حاصل کنید تمام معرف‌ها هنوز تاریخ مصرف داشته باشند. از معرف‌هایی که تاریخ انقضا آنها گذشته است استفاده نکنید.
۱۵ مقدار نمونه برداری پائین (کمتر از مقدار لازم) است.	روش سمپلر کردن خود را بررسی کنید، ممکن است نیاز به کالیبراسیون سمپلرها باشد. مطمئن شوید که نوک سمپلرها محکم بسته شده‌اند. نوک سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند.
۱۶ عملکرد اشتباه دستگاه الیزا ریدر	دستگاه باید به صورت دوره‌ای کالیبره و چک شود.
۱۷ ذخیره سازی نادرست کیت	به شرایط نگهداری روی برجسب کیت دقت شود. بیشتر کیت‌ها باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند.
۱۸ مواد کیت قبل از استفاده خوب مخلوط نشده‌اند.	مواد را قبل از استفاده خوب مخلوط کنید.
۱۹ ضعف یا خرابی محلول متوقف کننده واکنش	افزودن محلول متوقف کننده سالم، شدت رنگ را افزایش داده و باعث تثبیت رنگ می‌شود.
۲۰ خراش دادن سطح پلیت با سر سمپلر	فاصله مناسب سر سمپلر با ته چاهک‌ها رعایت شود.
۲۱ ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت	عملکرد صحیح نم گیر داخل کیسه پلیت را بررسی کنید، استریپ‌هایی که مصرف نمی‌شوند را در کیسه پلیت قرار دهید و درب آن را محکم ببندید.

۵۶ منحنی استاندارد ضعیف

علت	راه حل
۰۱ استانداردها به طور ناقص در آزمایشگاه آماده شده یا به صورت نامناسب ذخیره شده است.	دستورالعمل های ذخیره سازی را رعایت و استانداردها را طبق دستورالعمل ارائه شده در کیت مصرفی تهیه کنید.
۰۲ معرف ها در مقادیر نادرست به چاهک ها اضافه شده اند.	خطاهای سمپلر را بررسی کنید و در صورت نیاز آنها را کالیبره کرده و مطمئن شوید مقدار درستی از استاندارد را برمی دارد.
۰۳ انکوباسیون در دمای نامناسب انجام شده است.	اطمینان حاصل کنید که زمان انکوباسیون شما به درستی رعایت شده است و به دستورالعمل ارائه شده همراه با دفترچه راهنمای فنی پایبند باشید. کالیبراسیون تایمرها را چک کنید.
۰۴ عدم آسپیراسیون کامل چاهک ها (تخلیه چاهک ها به خوبی انجام نشده باشد).	بین مراحل مختلف، چاهک ها را به طور کامل تخلیه کنید. در صورت امکان از یک واشر اتومات استفاده کنید. بین مراحل مختلف، چاهک ها را به طور کامل تخلیه کنید.
۰۵ چیدن پلیت ها روی هم در زمان انکوباسیون	پلیت ها جدا از هم قرار داده شوند.
۰۶ رقیق سازی نامناسب محلول ها	مراحل رقیق سازی را بر اساس دستورالعمل چک کنید. محاسبات و مراحل مختلف تهیه رقت (طبق دستورالعمل کیت مصرفی) را مجدد بررسی کنید.
۰۷ مخلوط شدن ضعیف معرف ها (معرف ها به خوبی مخلوط نشده اند).	اطمینان حاصل کنید که معرف ها به خوبی مخلوط شده اند. قبل از استفاده از محلول، ویال ها را بخوبی بچرخانید (spin) و از حل شدن تمامی مواد مطمئن شوید. توصیه می شود در ابتدا به مقدار مورد نیاز برای هر بار استفاده از استانداردها تقسیم کنید تا از تغییر دمایی حجم کامل استانداردها طی هر بار استفاده جلوگیری شود.
۰۸ خراب شدن استاندارد (کیفیت پایین محلول استاندارد)	چک کنید که استاندارد به درستی ذخیره و نگهداری شده باشد. شرایط نگهداری از محلول استاندارد طبق دستورالعمل کیت مصرفی لحاظ شود. از معرف ها با سری ساخت متفاوت استفاده نشود.
۰۹ منحنی با مقیاس مناسب نیست.	سعی کنید از مقیاس های مختلف ترسیم کنید، به عنوان مثال منحنی log-log و لاجستیک
۱۰ خطای سمپل کردن	چک کردن و کالیبره سمپلر. روش سمپل کردن خود را بررسی کنید، ممکن است نیاز به کالیبراسیون سمپلر ها باشد. مطمئن شوید که نوک سمپلرها محکم بسته شده اند. نوک سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند. پیپت ها و سمپلرها را کالیبره کرده و مطمئن شوید مقدار درستی از استاندارد را برمی دارند.
۱۱ آنتی بادی تشخیصی ناکافی	کونژوگه آنزیمی را با مقدار توصیه شده در دستورالعمل استفاده کنید (در صورت نیاز به رقیق سازی با رقت توصیه شده در کیت تهیه گردد).
۱۲ محاسبه نادرست رقت منحنی استاندارد	محاسبات و رقت ها را بررسی کنید و یک منحنی جدید ایجاد کنید.
۱۳ مخلوط کردن معرف های جایگزین از کیت های مختلف	از این کار اجتناب کنید زیرا می تواند بر کیفیت سنجش شما تأثیر بگذارد.
۱۴ شستشو به خوبی انجام نشده است.	مراحل شستشو را طبق دستورالعمل کیت مصرفی مورد استفاده انجام دهید.
۱۵ کثیف بودن کف پلیت (قسمت خارجی)	قبل از قرائت جذب نوری زیر پلیت را با دستمال مخصوص بدون ذرات پخش شونده پاک کنید

دلائل احتمالی و تصحیح مقادیر بالای کنترل منفی و ایجاد Background در میکروپلیت

۰۷

راه حل

در هنگام عملیات شستشو از سر ریز شدن محلول شستشو از چاهک‌های پلیت به یکدیگر اجتناب کنید.

الف) برای هر نمونه برداری از نوک سمپلر جدید استفاده کنید. ب) همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهک‌ها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید. ج) پیپت و یا سمپلر و نوک سمپلرها را چک کنید و در صورت وجود قطرات باقی مانده از قبل و یا مواد خشک شده در آنها باید تعویض شوند. د) توجه داشته باشید که نوک سمپلر به اندازه کافی بلند باشد تا نمونه‌ها با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکنند.

الف) از روش شستشوی مناسب استفاده کنید. در پایان هر مرحله شستشو، پلیت را روی دستمال نم گیر برگردانید و اجازه دهید تا کاملاً تخلیه شود و در صورت لزوم با ضربه محکمی به آن ضربه بزنید تا مایع باقیمانده خارج شود. ب) در هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده‌های آنزیم کونژوگه از چاهک‌ها خارج شده‌اند. ج) تمامی نمونه‌ها و مواد را در مرکز کف چاهک‌ها بریزید و از تماس نوک سمپلر با دیواره و لبه چاهک‌ها پرهیزید. د) در صورتیکه زمان soak time توصیه شده باشد باید حتماً رعایت گردد.

در طول انکوباسیون، چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید. هر بار که پلیت را باز می کنید از یک برچسب تازه استفاده کنید. این کار از آلوده شدن چاهک‌ها به یکدیگر جلوگیری می کند.

محاسبات و مراحل مختلف تهیه رقت (طبق دستورالعمل کیت مصرفی) را مجدد بررسی کنید.

علت

۰۱ آلوده شدن چاهک‌های کنترل منفی با کنترل مثبت

۰۲ آلوده شدن چاهک کنترل منفی در هنگام شستشو

۰۳ شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کنترل منفی با آنزیم کونژوگه

۰۴ عدم استفاده از برچسب مخصوص پوشاننده پلیت و یا استفاده مجدد از آن‌ها

۰۵ تهیه رقت‌های نادرست از معرف‌ها

دلائل احتمالی و تصحیح ایراد چاهک‌های تماماً رنگی

۰۸

راه حل

در هنگام شستشو چاهک‌ها را تا نزدیک به انتها پر کنید.

از بافر تازه استفاده گردد. بافرها در ظروف تمیز نگهداری شوند.

کونژوگه را دوباره طبق دستورالعمل و با صحت کامل تهیه کنید. کونژوگه را فقط با محلول رقیق کننده که توسط تولید کننده توصیه شده است رقیق نمایید.

سرم را حرارت ندهید.

الف) لوله سمپلر را برای وجود ذرات مایع یا خشک شده بررسی کنید.

ب) نوک سمپلر به حد کافی بلند باشد که مایع با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند.

محلول سوپسترا را پس از انقضای تاریخ مصرف، استفاده نکنید.

بعد از افزودن محلول متوقف کننده واکنش حداکثر تا ۳۰ دقیقه جذب‌ها را بخوانید.

ظروف را قبل از استفاده چک کنید.

پس از ریختن محلول سوپسترا پلیت را در یک محل تاریک قرار دهید.

علت

۰۱ حجم غیر کافی از محلول شستشو به کار گرفته شده، و سوپسترا با ذرات باقی مانده آنزیم کونژوگه در چاهک‌ها واکنش داده است.

۰۲ آلودگی محلول شستشو

۰۳ استفاده از آنزیم کونژوگه خیلی قوی (غلظت)

۰۴ تغییر برخی پروتئین‌ها و فاکتورهای سرمی در سرم حرارت دیده

۰۵ محلول سوپسترا با کونژوگه آلوده شده است.

۰۶ محلول سوپسترا تازه نیست.

۰۷ پلیت قبل از خواندن جذب نوری مدت زیادی مانده باشد.

۰۸ ظرف محتوی سوپسترا آلوده و کثیف است.

۰۹ در خلال انکوباسیون سوپسترا پلیت در مقابل نور قرار گرفته است.

۹. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد چاهک‌های فاقد رنگ

علت	راه حل
۰۱ یکی از مراحل کلیدی الایزا فراموش شده است.	دستورالعمل را به دقت مطالعه کرده و مجدداً تست را تکرار نمایید.
۰۲ آماده سازی نادرست نمونه و یا معرف ها	از آماده سازی یا رقیق سازی مناسب نمونه و معرف ها طبق دستورالعمل کیت مصرفی اطمینان حاصل کنید.
۰۳ کونژوگه آنزیمی غیرفعال شده است.	الف) با مخلوط کردن کونژوگه آماده مصرف و سوپسترا داخل یک لوله آزمایشگاهی و مشاهده رنگ آبی می‌توان از فعالیت کونژوگه اطمینان حاصل کرد. ب) محلول کونژوگه را تعویض و مجدداً تست را تکرار کنید.
۰۴ شرایط نگهداری کیت نامناسب بوده است.	الف) دمای محل نگهداری کیت‌ها را چک کنید. دما باید بین ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد باشد ب) شرایط حمل و نقل کیت با شرکت ارسال کننده چک شود.
۰۵ شستشوی چاهک‌ها به درستی انجام نشده است.	الف) سختی آب مقطر و pH محلول بررسی گردد. ب) در صورتی که شستشو به صورت دستگاهی انجام می‌شود، فاصله مناسب نیدل آسپیراسیون تا کف چاهک در هنگام شستشو رعایت شود. ج) از محلول تازه شستشو با رقت توصیه شده در دستورالعمل کیت مصرفی استفاده گردد.
۰۶ زمان انکوباسیون خیلی کوتاه	الف) اطمینان حاصل کنید که زمان انکوباسیون طبق دستورالعمل کیت مصرفی به درستی رعایت شده است. ب) کالیبراسیون تایمرها را چک کنید.

۱۰. دلایل احتمالی و تصحیح ایراد رنگ‌زایی با سرعت زیاد

علت	راه حل
۰۱ کونژوگه به درستی تهیه نشده است (غلظت زیاد کونژوگه).	مجدداً طبق دستورالعمل آن را تهیه کرده و تست را تکرار نمایید.
۰۲ آنزیم کونژوگه آلوده است.	مطمئن شوید که ظروف و وسایل مورد استفاده آلوده نبوده‌اند.
۰۳ شستشو به خوبی انجام نشده است (شستشوی ناکافی).	مراحل شستشو را طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده انجام دهید.

علت	راه حل
۰۱ نمونه‌ها و اجزای داخل کیت به دمای اتاق نرسیده‌اند.	قبل از انجام تست نمونه‌ها و اجزای داخل کیت را به دمای اتاق برسانید.
۰۲ کونژوگه ضعیف و یا رقیق است.	طرز تهیه آن را دوباره چک کنید و تست را با محلول کونژوگه دوباره آماده شده تکرار کنید.
۰۳ دمای پایین آزمایشگاه و یا دمای پایین انکوباسیون	دمای آزمایشگاه و انکوباسیون را چک کنید (دمای آزمایشگاه باید بین ۲۰ تا ۲۵ و دمای داخل انکوباتور باید ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد).
۰۴ ذخیره سازی نادرست کیت	به شرایط نگهداری روی برجسب کیت دقت شود. بیشتر کیت‌ها باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. توصیه می‌شود در ابتدا به مقدار مورد نیاز برای هر بار استفاده، از معرف‌ها تقسیم کنید تا از تغییر دمایی حجم کامل معرف‌ها طی هر بار استفاده جلوگیری شود.

علت	راه حل
۰۱ در زمان تست مواد داخل کیت به دمای اتاق رسانده نشده‌اند.	مطمئن شوید که تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده‌اند (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد).
۰۲ ذخیره سازی نادرست کیت	به شرایط نگهداری روی برجسب کیت دقت شود. بیشتر کیت‌ها باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.
۰۳ معرف های تاریخ مصرف گذشته	تاریخ انقضای تمام معرف‌ها را بررسی کنید. از معرف‌هایی که تاریخ انقضای آنها گذشته است استفاده نکنید.
۰۴ تهیه رقت‌های نادرست معرف‌ها	محاسبات و مراحل مختلف تهیه رقت (طبق دستورالعمل کیت مصرفی) را مجدداً بررسی کنید.
۰۵ مقدار نمونه برداری پائین (کمتر از مقدار لازم) است.	الف) مطمئن شوید که نوک سمپلرها خوب و محکم شده‌اند. ب) لوله سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند. ج) کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید و در صورت عدم کالیبر بودن آنها، باید کالیبر شوند.
۰۶ آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی کنترل مثبت به باکتری	مجدداً تست را با اجزای یک کیت تکرار کنید.
۰۷ آلودگی ظروف معرف یا آب مقطر به دترژنت‌ها، گندزداها یا مواد کثیف	در این مورد باید ظروف را به دقت کنترل نمود و فرایند شست و شوی ظروف را تحت کنترل قرار داد.
۰۸ زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است.	الف) کالیبراسیون تایمر را چک کنید. ب) تایم انکوباسیون را ثبت کنید.
۰۹ ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت	الف) عملکرد صحیح نم گیر داخل کیسه پلیت را بررسی کنید. ب) استریپ‌هایی که مصرف نمی‌شوند را در کیسه پلیت قرار دهید و درب آن را محکم ببندید. ج) زمان باز کردن درب کیسه پلیت را در بار اول بر روی کیسه پلیت ثبت کنید.
۱۰ دمای نادرست در مدت انکوباسیون	دمای داخل انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و یا اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) را بررسی کنید.

علت	راه حل
۱۱ شدت شستشو زیاد است، یا شستشو بیش از تعداد دفعات تعریف شده و یا شستشو با محلول شستشوی غلیظ انجام شده است.	شدت فشار شستشو در سیستم شستشو (دستی یا اتوماتیک) را کاهش داده و طبق دفعات و رقت توصیه شده در کیت مصرفی، شستشو دهید.
۱۲ شستشوی با استفاده از بافر با pH نامناسب یا دچار آلودگی باکتریایی و قارچی	از بافر تازه استفاده گردد. بافرها در ظروف تمیز نگهداری شوند.
۱۳ مواد کیت قبل از استفاده خوب مخلوط نشده‌اند.	مواد را قبل از استفاده خوب مخلوط کنید.
۱۴ در خلال انجام تست چاهک‌ها خشک شوند.	تمام مراحل انجام تست را بدون وقفه انجام دهید.
۱۵ ضعف یا خرابی محلول متوقف کننده واکنش	افزودن محلول متوقف کننده رنگ را افزایش داده و باعث تثبیت رنگ می‌شود.
۱۶ افزودن ناکافی آنزیم کونژوگه غلیظ به محلول رقیق کننده برای ایجاد محلول آماده‌ی کار	کونژوگه را دوباره طبق دستورالعمل و با صحت کامل تهیه کنید. کونژوگه را فقط با محلول رقیق کننده که توسط تولید کننده توصیه شده است رقیق نمایید.
۱۷ خراش دادن سطح پلیت با سر سمپلر	فاصله مناسب سر سمپلر با کف چاهک‌ها رعایت شود.
۱۸ استفاده از فیلتر نادرست برای خوانش جذب نوری	از فیلتر با جذب نوری توصیه شده در کیت استفاده شود (همچنین از فیلتر رفرانس نیز استفاده شود).
۱۹ عملکرد اشتباه دستگاه الیزا ریدر	دستگاه باید به صورت دوره‌ای کالیبر و چک شود.
۲۰ تغییر در دستورالعمل توصیه شده در کیت	تمامی مراحل تست را طبق دستورالعمل توصیه شده توسط تولیدکننده انجام دهید.

Sign with Confidence

Laboratory Equipment

www.vestablab.ir

info@vestablab.ir

تلفن: ۰۲۱-۷۲۸۰۱

تهران، خیابان جردن، خیابان ناهید غربی،
پلاک ۵۷، ساختمان وستا

این دفترچه راهنما بر اساس اطلاعات منتشرشده
در www.assaygenie.com تهیه شده است.

