

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پیمایش در تشخیص و مشاوره	<b>کیت الیزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

آماده سازی	۹۶ تستی	۴۸ تستی	معرف
آماده مصرف	2 Strip	1 Strip	چاهک‌های کنترل صحت (زرد رنگ) <b>A1</b>
آماده مصرف	2 Strip	1 Strip	چاهک‌های کنترل صحت (زرد رنگ) <b>A2</b>
آماده مصرف	2 Strip	1 Strip	چاهک‌های کنترل صحت (زرد رنگ) <b>A3</b>
آماده مصرف	3 Strip	1 Strip	چاهک‌های کنترل خطی بودن (قرمز رنگ) <b>L</b>
آماده مصرف	3 Strip	2 Strips	چاهک‌های مخصوص کنترل دستگاه شستشو <b>W</b>
آماده مصرف	<b>1 × 3 ml</b>	<b>1 × 2 ml</b>	محلول آنزیم کونژوگه (قرمز رنگ)
به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید.	<b>1 × 12.0 ml</b>	<b>1 × 12.0 ml</b>	محلول شستشو غلیظ (20X)
آماده مصرف	<b>1 × 6.0 ml</b>	<b>1 × 6.0 ml</b>	محلول سوبسترا-رنگزا (تترامیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	<b>1 × 3.0 ml</b>	<b>1 × 3.0 mL</b>	محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پوهکاران در سنجش و مشاوره	<b>کیت الایزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

## کاربرد:

کیت ELISA Color Plate شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس، جهت اطمینان از صحت دستگاه خوانشگر الایزا (ELISA Reader)، بررسی عملکرد دستگاه شستشو (ELISA Washer) طراحی گردیده است. از این کیت می‌توان جهت تصدیق (Verification) کالیبره بودن دستگاه خوانشگر الایزا و همچنین تصدیق عملکرد (Performance qualification) دستگاه شستشوی الایزا اطمینان حاصل نمود.

لازم به ذکر است این کیت فقط برای تصدیق عملکرد دستگاه‌های مورد استفاده در الایزا کاربرد دارد و برای انجام کالیبراسیون نمی‌توان از آن استفاده کرد.

## مقدمه:

از آنجا که الایزا یکی از مهم‌ترین روش‌های آزمایشگاهی برای سنجش بسیاری از آنالیت‌های موجود در بدن است، توجه به عملکرد صحیح دستگاه‌ها و تجهیزات آزمایشگاه نقش بسیار مهمی در نتایج حاصل از این روش خواهد داشت. صحت و خطی بودن دستگاه خوانشگر الایزا، عملکرد صحیح دستگاه شستشو از جمله موارد تاثیر گذار می‌باشند که باید به صورت مرتب، صحت عملکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد و در صورتی که نتایج غیرقابل قبول باشد، باید جهت کالیبراسیون و تعمیرات توسط متخصصین آموزش دیده اقدام شود.

## اساس آزمایش:

### کنترل صحت خوانشگر الایزا

دستگاه خوانشگر الایزا دارای طراحی فتومتریک برای اندازه‌گیری جذب نوری (Optical Density) نمونه‌های مایع موجود در چاهک‌های میکروپلیت می‌باشد. این دستگاه‌ها معمولاً اندازه‌گیری جذب نوری طیف مرئی (400-700 nm) را پوشش می‌دهند و بعضاً در محدوده نزدیک به UV و تا 340 nm کار می‌کنند. صحت خوانش الایزا به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش فتوالکتریک، نوع و کیفیت منوکروماتور (تک رنگ کننده)

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پرفکادر در سنجش و مشاوره	<b>کیت الایزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

بستگی دارد. کنترل دستگاه خوانشگر الایزا از نظر صحت بهتر است هر سه ماه یکبار انجام گیرد. آزمون صحت خوانش الایزا با هدف تعیین تفاوت جذب نوری واقعی با جذب نوری به دست آمده از دستگاه می‌باشد. بدین منظور در این کیت از چاهک‌هایی با جذب نوری مشخص که توسط دستگاه‌های کالیبره تعیین شده است استفاده می‌گردد.

### کنترل خطی بودن دستگاه خوانشگر الایزا

دستگاه‌های خوانشگر الایزا معمولاً دارای جذب خطی در رنج 0 تا 1.5 و تفکیک 0.001 هستند همچنین دستگاه‌هایی با جذب بالاتر تا 4 نیز موجود می‌باشند. کنترل خطی بودن در دستگاه الایزا یک پارامتر مهم در کارایی دستگاه می‌باشد. عدم خطی بودن در غلظت‌های بالا معمولاً نشان دهنده وجود نورهای ناخواسته (stray light) می‌باشد که می‌تواند به دلیل زوال فیلترها باشد. بنابراین بهتر است خطی بودن (Linearity) دستگاه بطور ماهیانه مورد ارزیابی قرار گیرد.

### کنترل تکرار پذیری دستگاه خوانشگر الایزا

با استفاده از استریپ‌های موجود در این کیت می‌توان در دفعات مختلف جذب نوری بدست آمده از چاهک‌ها را قرائت کرد و بدین ترتیب اختلال در حسگرها و مسیر خوانش دستگاه خوانشگر الایزا و همچنین دقت و تکرار پذیری سمپلرها و دستگاه را نیز بررسی نمود.

### کنترل عملکرد دستگاه شستشو

یکی دیگر از تجهیزات بسیار مهم در روش الایزا دستگاه شستشو می‌باشد. در صورت کالیبره نبودن دستگاه و یا خرابی آن ممکن است عمل شستشو به درستی انجام نگردد و در نتیجه اتصالات غیر اختصاصی در چاهک‌ها

RUO-REF: PSECP		<b>کیت الایزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
Ver. No: 01	پیشگامان سنجش پرفکابر سنجش و مشاوره	<b>ELISA Color Plate Kit</b>

باقی مانده و منجر به ایجاد جذب نوری کاذب می‌شود. در صورتیکه محلول شستشو قابل قبول باشد میزان جذب نشان داده شده غیر واقعی بوده و مربوط به نقص دستگاه شستشو می‌باشد.

### مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلهای ۵۰ ، ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می‌گردد.
۲. آب مقطر با هدایت کمتر از  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$
۳. دستگاه خوانشگر الایزا دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که جهت شستشو از آن استفاده می‌کنید.

### نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف‌ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند.
۲. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
۳. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نمگیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته شود.
۴. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۵. محلول سوبستر-رنگ‌زا باید بی‌رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پرفکار در سنجش و مشاوره	<b>کیت الیزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

## احتیاطات و هشدارها:

۱. کیت فقط برای بررسی دقت و صحت عملکرد دستگاه‌های نامبرده کاربرد دارد و برای انجام کالیبراسیون نمی‌توان استفاده کرد.
۲. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را به خوبی فرا گرفته‌اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته‌بندی شده‌است، استفاده کنید.
۳. کلیه جوانب ایمنی در اجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش‌های صحیح میکروب شناسی و تکنیک‌های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.
۴. از تماس تمام معرف‌ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.
۵. برخی از معرف‌ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می‌باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزیدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه دفع پسماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

## نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن پیوندهای غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می‌گردد.

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پرفکادر سنجش و مشاوره	<b>کیت الیزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو اهمیت زیادی دارد.
۳. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
۴. معرفها و نمونهها را قبل از آزمایش به خوبی مخلوط نمایید.
۵. جهت پیت کردن محلول سوبسترا-رنگزا و محلول توقف از میکروپیپت‌های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.
۶. زمان‌های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
۷. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می‌گردد.
۸. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک‌ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

### آماده‌سازی معرفها:

۱. همه معرفها باید قبل از استفاده به دمای اتاق ( $22-27^{\circ}\text{C}$ ) برسند.
۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

### روش انجام آزمایش:

#### کنترل صحت خوانشگر الیزا

تعداد مورد نیاز از چاهک‌ها یا استریپ‌های A1، A2 یا A3 را جدا کرده و در نگهدارنده پلیت قرار دهید. ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به هر یک از چاهک‌های A1، A2 یا A3 اضافه نمایید و به مدت ۲ دقیقه به آرامی تکان دهید تا رنگ زرد ظاهر و از حل شدن کامل رنگ مطمئن شوید. سپس جذب نوری هر چاهک حداکثر تا مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰/۶۳۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر الیزا خوانده شود.

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پرفکابر سنجش و مشاوره	<b>کیت الایزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

نتایج خوانش الایزا مربوط به A1، A2 یا A3 باید در محدوده قابل قبول جذب نوری که در زیر ذکر شده باشد. در صورتی که نتایج اختلاف قابل اهمیت دارد، جهت کالیبراسیون دستگاه خوانشگر الایزا باید اقدام شود. هر یک از حالات A1، A2 و A3 با چند نوع دستگاه خوانشگر الایزا کالیبره خوانده شده و نتایج به شرح زیر می‌باشد:

	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>
محدوده قابل قبول (جذب نوری)	<b>0.4-0.6</b>	<b>1.4-1.8</b>	<b>2.35-2.85</b>
<b>ASYS HITECH</b>	<b>0.42</b>	<b>1.46</b>	<b>2.61</b>
<b>Bio Tek (ELx800)</b>	<b>0.41</b>	<b>1.48</b>	<b>2.48</b>
<b>TECAN (Sunrise)</b>	<b>0.46</b>	<b>1.43</b>	<b>2.51</b>
<b>Stat Fax 3200</b>	<b>0.43</b>	<b>1.49</b>	<b>2.49</b>

### کنترل دقت و تکرار پذیری دستگاه خوانشگر الایزا

میانگین جذب نوری به دست آمده از آزمایش مرحله قبل را به دست آورده سپس با محاسبه انحراف معیار، ضریب تغییرات (CV) مربوط به جذب نوری را به دست آورید. ضریب تغییرات **نباید** بیشتر از ۳٪ باشد. در صورتیکه ضریب تغییرات بیشتر از مقدار ذکر شده بود می‌تواند به دلایل زیر باشد:

۱. کالیبره نبودن دستگاه خوانشگر و عدم دقت آن
  ۲. خطای کاربر و یا تجهیزاتی که برای ریختن محلول‌ها استفاده شده است
- در صورتیکه کاربر از دقت و مهارت کافی برخوردار بوده و از سمپلر کالیبره استفاده شده است، نتایج بیانگر تکرارپذیری مناسب و دقت خوانش دستگاه می‌باشد.

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 پیشگامان سنجش پیشگامان سنجش و تشخیص	<b>کیت الایزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

با مراجعه به سایت پیشگامان سنجش ایستایس می‌توانید با استفاده از فایل موجود و وارد نمودن جذب نوری هر یک از دفعات تکرار، میزان ضریب تغییرات را به دست آورید. لازم به ذکر است که تعداد تکرارهای هر یک از چاهک‌های A1، A2 و A3 باید به طور جداگانه برای محاسبه CV وارد شود.

با توجه به خوانش OD مربوط به هر استریپ A1، A2 و A3، اگر CV در محدوده قابل قبول باشد، "OK" نمایش داده خواهد شد و اگر خوانش دستگاه الایزا در محدوده قابل قبول نباشد، "Not OK" خواهد بود، پیشنهاد می‌شود دستگاه خوانشگر الایزا جهت کالیبراسیون مجدد مورد بررسی قرار گیرد.

### کنترل خطی بودن دستگاه خوانشگر الایزا (Linearity)

۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به هریک از چاهک‌های L اضافه نمایید و به مدت ۲ دقیقه به آرامی تکان دهید تا از حل شدن کامل رنگ مطمئن شوید. سپس جذب نوری هر استریپ حداکثر تا مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰/۶۳۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر الایزا خوانده شود. دستگاه باید میزان جذب ۸ چاهک L را به صورت خطی قرائت نماید. درصد ریکاوری هر رقت از ۱:۲ تا ۱:۳۲ باید بین ۹۰-۱۱۰ درصد باشد، این مقدار در رقت ۱:۶۴ تا ۱:۱۲۸ ممکن است بین ۷۰-۱۲۰ درصد باشد. بررسی خطی بودن چند دستگاه خوانشگر الایزا متفاوت کالیبره انجام شد و نتایج به شرح زیر می‌باشد:

چاهک	رقت	میانگین جذب نوری دستگاه ASYS HITECH	میانگین جذب نوری دستگاه Bio Tek (ELx800)	میانگین جذب نوری دستگاه TECAN (Sunrise)	میانگین جذب نوری دستگاه Stat Fax 3200
<b>A</b>	<b>1</b>	<b>2.539</b>	<b>2.605</b>	<b>2.679</b>	<b>2.574</b>
<b>B</b>	<b>1:2</b>	<b>1.301</b>	<b>1.325</b>	<b>1.340</b>	<b>1.303</b>
<b>C</b>	<b>1:4</b>	<b>0.65</b>	<b>0.637</b>	<b>0.670</b>	<b>0.645</b>
<b>D</b>	<b>1:8</b>	<b>0.327</b>	<b>0.332</b>	<b>0.335</b>	<b>0.32</b>
<b>E</b>	<b>1:16</b>	<b>0.162</b>	<b>0.165</b>	<b>0.167</b>	<b>0.167</b>
<b>F</b>	<b>1:32</b>	<b>0.08</b>	<b>0.083</b>	<b>0.084</b>	<b>0.083</b>
<b>G</b>	<b>1:64</b>	<b>0.044</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>



RUO-REF: PSECP	 پیشگامان سنجش پژوهش‌های تشخیص و توسعه	<b>کیت الایزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
Ver. No: 01		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

H	1:128	0.022	0.19	0.021	0.021
---	-------	-------	------	-------	-------

روش محاسبه درصد ریکاوری:

۱. جذب نوری اولین چاهک (A) از استریپ L را به عنوان معیار ۱۰۰ درصد در نظر می‌گیریم.
  ۲. مقدار جذب نوری اولین چاهک L را به ترتیب تقسیم بر رقت‌های مورد نظر می‌نماییم، یعنی تقسیم بر ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ نمایید، بدین ترتیب OD مورد انتظار در دامنه هر رقت به دست می‌آید.
  ۳. سپس OD خوانده شده توسط دستگاه خوانشگر الایزا برای هر کدام از رقت‌های استریپ L (یعنی چاهک‌های دوم تا هشتم) را تقسیم بر اعداد مورد انتظار همان رقت کرده و در عدد ۱۰۰ ضرب نمایید.
- فرمول محاسبه ریکاوری:

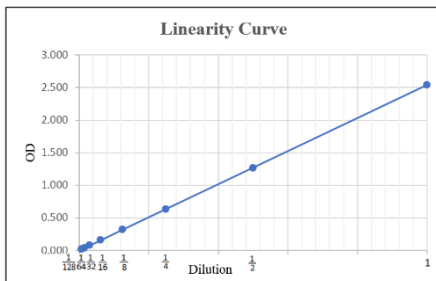
$$\% \text{ریکاوری} = 100 \times \left( \frac{\text{مقدار OD به دست آمده}}{\text{مقدار OD مورد انتظار}} \right)$$

به عنوان مثال اگر جذب نوری به دست آمده در چاهک اول L برابر با 2.545 باشد انتظار داریم جذب نوری چاهک دوم که رقتی معادل نصف چاهک اول را دارد برابر با 1.272 باشد، در این صورت درصد ریکاوری برابر با ۱۰۰ درصد خواهد بود، اما در واقعیت جذب نوری چاهک دوم 1.255 به دست آمده است، در این صورت طبق فرمول بالا میزان ریکاوری برابر با ۹۹ درصد می‌باشد.

با مراجعه به سایت پیشگامان سنجش ایستاتیس می‌توانید با استفاده از فایل موجود و وارد نمودن جذب نوری هر یک از چاهک‌های L به ترتیب از چاهک اول تا هشتم، درصد ریکاوری و نمودار خطی آن را به دست آورید.



نمودار به دست آمده برای کنترل خطی بودن دستگاه خوانشگر الایزا به صورت زیر قابل قبول می باشد:



### کنترل عملکرد دستگاه شستشو

تعداد مورد نیاز از چاهک‌ها یا استریپ‌های W را جدا کرده و در نگهدارنده پلیت قرار دهید. ۱۰۰ میکرولیتر از کونزوگه را داخل تمامی چاهک‌ها بریزید. پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس با محلول شست و شو، چاهک‌ها را ۵ مرتبه شستشو دهید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا را داخل هر یک از چاهک‌ها بریزید و ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید، سپس ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه کنید. برای سنجش جذب نوری از دستگاه خوانشگر الایزا با فیلتر ۴۵۰ نانومتر و فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس استفاده گردد. جذب نوری به دست آمده از هر یک از چاهک‌ها باید کمتر از ۰/۱ باشد، بالاتر بودن جذب نوری نشانگر نقص در شستشو می‌باشد. جهت بررسی علل احتمالی، روش تهیه محلول شستشو و شرایط اسپیراسیون و تخلیه دستگاه را چک نمایید.

<b>RUO-REF: PSECP</b>	 <p>پیشگامان سنجش پوشش‌های تشخیصی و تست‌های</p>	<b>کیت الیزا</b> <b>ELISA Color Plate</b>
<b>Ver. No: 01</b>		<b>ELISA Color Plate Kit</b>

جهت اطمینان از عملکرد کیت یک استریپ را نیز به عنوان کنترل داخلی آزمایش کنید، در این حالت آزمایش فوق را انجام داده با این تفاوت که عمل شستشو را یک بار انجام دهید. در این حالت جذب نوری به دست آمده باید بیشتر از ۰/۱ باشد که نشانگر عملکرد صحیح محلول کیت می‌باشد.

تذکر: نتایج نامطلوب که براساس این کیت حاصل می‌شود نشان دهنده‌ی نیاز به سرویس دستگاه، توسط سازنده دستگاه و یا بررسی مجدد و خطایابی روش شستشو می‌باشد.

آدرس سایت پیشگامان سنجش ایستیس:

[www.pishgamansanjesh.com](http://www.pishgamansanjesh.com)