

## کیت ELISA CHECK

### کاربرد

کیت ELISA CHECK شرکت پیشداز طب جهت بررسی عملکرد دستگاه شستشو، صحت و خطی بودن دستگاه خوانشگر الایزا و همچنین دقت سملرها طراحی شده است. این کیت نتایج مستندی جهت تائید کالیبراسیون دستگاه ها و کنترل مراحل انجام کار با کیت های الایزا را فراهم می کند و همچنین جهت شناسایی و رفع مشکل بوجود آمده در طی انجام تست مورد استفاده قرار می گیرد.

### مقدمه

تجهیزات نقش مهمی در انجام و اخذ نتایج در تست های الایزا دارند که چگونگی عملکرد آنها اثر مستقیم بر صحت و دقت نتایج خواهد داشت. عملکرد این تجهیزات هر چند وقت یکبار به صورت روتین و همچنین پس از تعمیرات باید مورد بررسی قرار بگیرد و همچنین در شرایطی که نتایج غیر قابل قبول به دست می آیند باید جهت بررسی علت آن عملکرد تجهیزات مورد بررسی قرار گیرند. از جمله این تجهیزات می توان به دستگاه شستشو، سملرها و دستگاه خوانشگر الایزا اشاره کرد. کنترل دستگاه خوانشگر الایزا از نظر خطی بودن بصورت ماهیانه و از نظر صحت هر سه ماه یکبار پیشنهاد می گردد .

### اساسی آزمون ها

#### بررسی صحت خوانشگر الایزا :

هدف از این آزمون تعیین تفاوت جذب نوری واقعی با جذب نوری بدست آمده از دستگاه می باشد. در این آزمون از محلول های رنگی با میزان جذب نوری مشخص که در برابر دستگاههای کالیبره قرائت شده استفاده می شود .

#### بررسی خطی بودن خوانشگر الایزا :

هدف از این آزمون تعیین ارتباط بین غلظت و جذب نوری است و از محلول رنگی با رابطه خطی بین غلظت و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شده است .

#### بررسی تکرارپذیری سملر و خوانشگر الایزا :

هدف از این آزمون تعیین اختلال در حسگرها و مسیر خوانش دستگاه می باشد و از محلول رنگی دارای جذب نوری مشخص در طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شده است .

#### بررسی فرایند شستشو :

این تست بر مبنای اتصال های غیر اختصاصی صورت می پذیرد و در صورتی که شستشو ناقص انجام شود جذب نوری از حد تعیین شده بالاتر می رود. وجود جذب نوری غیر قابل قبول در این تست در صورتیکه از صحیح بودن محلول شستشو اطمینان داشته باشید، مربوط به نقص در عملکرد دستگاه شستشو می باشد.

### محتویات کیت

- ۱) پلیت حاوی ۹۶ چاهک
- ۲) محلول رنگی زرد (کد A1, A2, A3) جهت بررسی صحت خوانشگر الایزا (مقادیر اصلی جذب نوری بر روی ویال درج شده است). هر ویال حاوی ۴ میلی لیتر می باشد.
- ۳) یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول رنگی قرمز (کد L) جهت بررسی خطی بودن دستگاه.
- ۴) یک ویال حاوی ۴ میلی لیتر محلول کونژوگه آماده مصرف (Enzyme conjugate).
- ۵) یک ویال حاوی ۴ میلی لیتر محلول رنگزا (Chromogen - Substrate).
- ۶) یک ویال حاوی ۴ میلی لیتر محلول متوقف کننده (Stop solution).
- ۷) یک ویال محلول شستشو حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم      خیابان یاسمن، پلاک      کد پستی  
فکس

www.pishtazteb.com      sms 300071402      info@pishtazteb.com

ویرایش      -      اردیبهشت

## مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد:

- ۱) دستگاه خوانشگر الایزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس).
- ۲) سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری دقیق.
- ۳) آب مقطر.

## شرایط نگهداری :

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمائید .
- ۲) پایداری محتویات کیت ( قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد.

## توضیحات عمومی :

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید.
- ۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند.
- ۳) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد.
- ۴) محتویات این کیت صرفاً برای مصرف در همین کیت طراحی شده است .
- ۵) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جدا خودداری نمائید.

## مراحل انجام آزمایش :

### بررسی صحت خوانشگر الایزا :

سه استریپ (ستون چاهک) از پلیت الایزا را جدا نموده و در هر یک از چاهکهای استریپ اول ۱۰۰ میکرولیتر از محلول A1 و در هریک از چاهکهای استریپ های دوم و سوم به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های A2 و A3 بصورت جداگانه ریخته و در طول موج ۴۵۰/۶۳۰ قرائت کنید. فاصله محدوده قابل قبول جذب نوری برای هر یک از محلولها روی لیبل ویال ها درج شده است .

به عنوان مثال جهت بررسی صحت دستگاه خوانشگر الایزا، عمل فوق برای هریک از محلولها بر روی سه دستگاه الایزایدر متفاوت کالیبره صورت پذیرفت که میانگین جذب نوری قرائت شده برای هر دستگاه در جدول زیر ذکر شده است . در صورت وجود اختلاف قابل اهمیت، دستگاه نیاز به کالیبراسیون دارد .

	A1	A2	A3
محدوده قابل قبول (جذب نوری)	0.20 - 0.29	0.9 - 1.1	2.4 - 2.8
Bio Tek (ELx800)	0.24	0.97	2.65
ASYS HITECH	0.25	1.0	2.66
TECAN (Sunrise)	0.24	0.97	2.55

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم      خیابان یاسمن، پلاک      کد پستی  
فکس

www.pishtazteb.com      info@pishtazteb.com      sms 300071402

ویرایش      -      اردیبهشت

### بررسی دقت خوانشگر الایزا :

میانگین و انحراف معیار جذب نوری بدست آمده از محلولهای رنگی در مرحله قبل را محاسبه و ضریب تغییرات (CV) مربوط به جذب نوری را تعیین نمایند. ضریب تغییرات ( CV ) باید 3% باشد. لازم به ذکر است که درصد ضریب تغییرات بدست آمده در این مرحله می تواند متاثر از ۳ عامل مختلف باشد که عبارتند از : دقت خوانشگر الایزا، دقت سمپلر و دقت اپراتور انجام دهنده تست؛ بنابراین با فرض اینکه فرد انجام دهنده تست شخصی با دقت و مهارت کافی می باشد و نیز از یک سمپلر دقیق و کالیبره شده استفاده می نماید، این تست بیانگر میزان دقت خوانشگر الایزا می باشد.

### بررسی خطی بودن خوانشگر الایزا :

دو استریپ از پلیت را برداشته و به چاهک اول و دوم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگی با کد L و به سایر چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه کنید سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگی با کد L را به چاهک سوم و چهارم اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول را به دو چاهک بعدی منتقل نمایید و این عمل را بصورت دوپلیکیت تا چاهک آخر ادامه دهید. ۱۰۰ میکرولیتر از دو چاهک آخر را دور بریزید. دقت نمایید که تمام چاهک ها حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول باشند و در زمان رقیق سازی از تشکیل حباب جلوگیری به عمل آید. جذب نوری چاهک ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر و در مقابل فیلتر مرجع ۶۳۰ نانومتر ( و یا ۶۲۰ نانومتر) قرائت نمایید و میانگین جذب نوری دو چاهک مربوط به هر رقت را محاسبه نمایید. دستگاه باید در محدوده هر رقت جذب نوری ادعا شده در کاتالوگ را به صورت خطی قرائت کند. جذب نوری دو چاهک اول به عنوان معیار در محاسبه جذب نوری مورد انتظار استفاده می گردد. میزان همبوشانی ( ریکاوری ) در هر رقت از رنگ باید بین ۹۰ تا ۱۱۰ درصد باشد. جهت بررسی خطی بودن دستگاه الایزایدر عمل فوق در طی ۵ سری بر روی سه دستگاه الایزایدر کالیبره متفاوت صورت پذیرفت که نتایج آن مطابق با جدول زیر می باشد.

رقت	میانگین جذب نوری دستگاه TECAN (Sunrise)	میانگین جذب نوری دستگاه ASYS HITECH	میانگین جذب نوری دستگاه Bio Tek
۱	۲/۵۸۰	۲/۴۳۸	۲/۴۹۸
۱:۲	۱/۲۹۰	۱/۲۲۲	۱/۲۷۲
۱:۴	۰/۶۶۵	۰/۶۱۰	۰/۶۳۸
۱:۸	۰/۳۳۹	۰/۳۰۶	۰/۳۳۹
۱:۱۶	۰/۱۸۲	۰/۱۵۴	۰/۱۶۴
۱:۳۲	۰/۰۹	۰/۰۷۷	۰/۰۸۵

### روش محاسبه درصد ریکاوری:

- میانگین مقدار OD ( جذب نوری ) دو چاهک اول ( جذب نوری محلول رنگی کد L ) را به عنوان معیار ۱۰۰ درصد در نظر می گیریم.
- مقدار OD ۱۰۰ درصد بدست آمده از مرحله قبل را به ترتیب تقسیم بر اعداد ۲-۴-۸-۱۶ و ۳۲ نموده تا مقدار OD مورد انتظار هر رقت بدست آید.
- مقدار نتایج بدست آمده از OD هر کدام از رقت های خوانده شده با دستگاه الایزا را تقسیم بر اعداد مورد انتظار همان رقت کرده و در عدد ۱۰۰ ضرب نمایید.

### فرمول محاسبه درصد ریکاوری :

$$\text{مقدار OD بدست آمده} \times 100 = \text{درصد ریکاوری} : \frac{\text{مقدار OD مورد انتظار}}{\text{مقدار OD بدست آمده}}$$

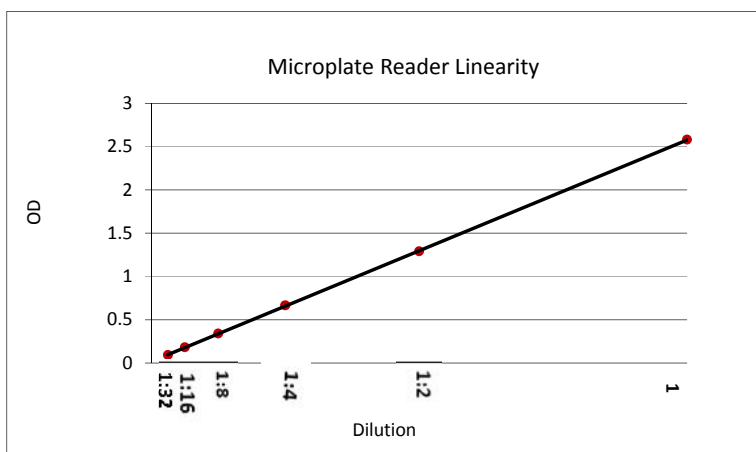
به عنوان مثال در جدول بالا میانگین OD دستگاه Biotek 2.498 میباشد، که این عدد به عنوان معیار ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است، مقدار OD مورد انتظار رقت 1/2 این محلول می بایست  $2.498 \div 2 = 1.249$  باشد ولی در خوانش با دستگاه الایزا عدد 1.272 بدست آمده است .  
با توجه به نتایج فوق درصد ریکاوری بصورت زیر محاسبه می شود:

$$\text{درصد ریکاوری} : \frac{1.272}{1.249} \times 100 = 102\%$$

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم      خیابان یاسمن، پلاک      کد پستی  
فکس

www.pishtazteb.com      sms 300071402      info@pishtazteb.com

ویرایش - اردیبهشت



### کنترل دستگاه شستشو :

۱۰۰ میکرو لیتر از کونژوگه را داخل تمامی چاهک های یک استریپ بریزید. دقیقاً " پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس با محلول شستشو، چاهک ها را چهار مرتبه شستشو دهید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول کروموژن را داخل هر یک از چاهک ها بریزید و پنج دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشها را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری از دستگاه الیزابدر با فیلتر ۴۵۰ نانومتر استفاده نمایید. توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد. جذب نوری به دست آمده از هر یک از چاهک ها باید کمتر از ۰/۱ باشد، بالاتر بودن جذب نوری نشانگر نقص در شستشو می باشد. جهت بررسی علل احتمالی، روش تهیه محلول شستشو و شرایط اسپیراسیون و تخلیه دستگاه را چک نمایید.

پیشنهاد می گردد در هر سری کاری یک استریپ به عنوان کنترل داخلی جهت اطمینان از عملکرد کیت حاضر مورد آزمایش قرار گیرد. در این حالت آزمایش مربوط به کنترل دستگاه شستشو را با یک استریپ و تعداد دو بار شستشو انجام دهید. در این حالت جذب نوری به دست آمده باید بیشتر از ۰/۱ باشد که نشانگر سالم بودن محلولهای کیت می باشد.

تذکر: از این کیت جهت کالیبراسیون دستگاه خوانشگر الیزا نمی توان استفاده کرد و جوابهای نامطلوب که بر اساس آزمونهای این کیت حاصل می شود نشان دهنده نیاز به سرویس توسط سازنده دستگاه می باشد.