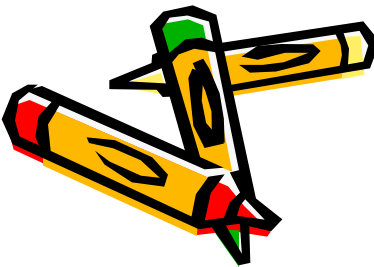


بنام حق





ELISA

تعريف

Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay (*ELISA*)



- الایزا نامی عمومی برای روشهای آنزیم ایمنواسی است.
- آنتی ژن یا آنتی بادی بر روی یک فاز جامد coat شده است.



Immuno Assay(IA)

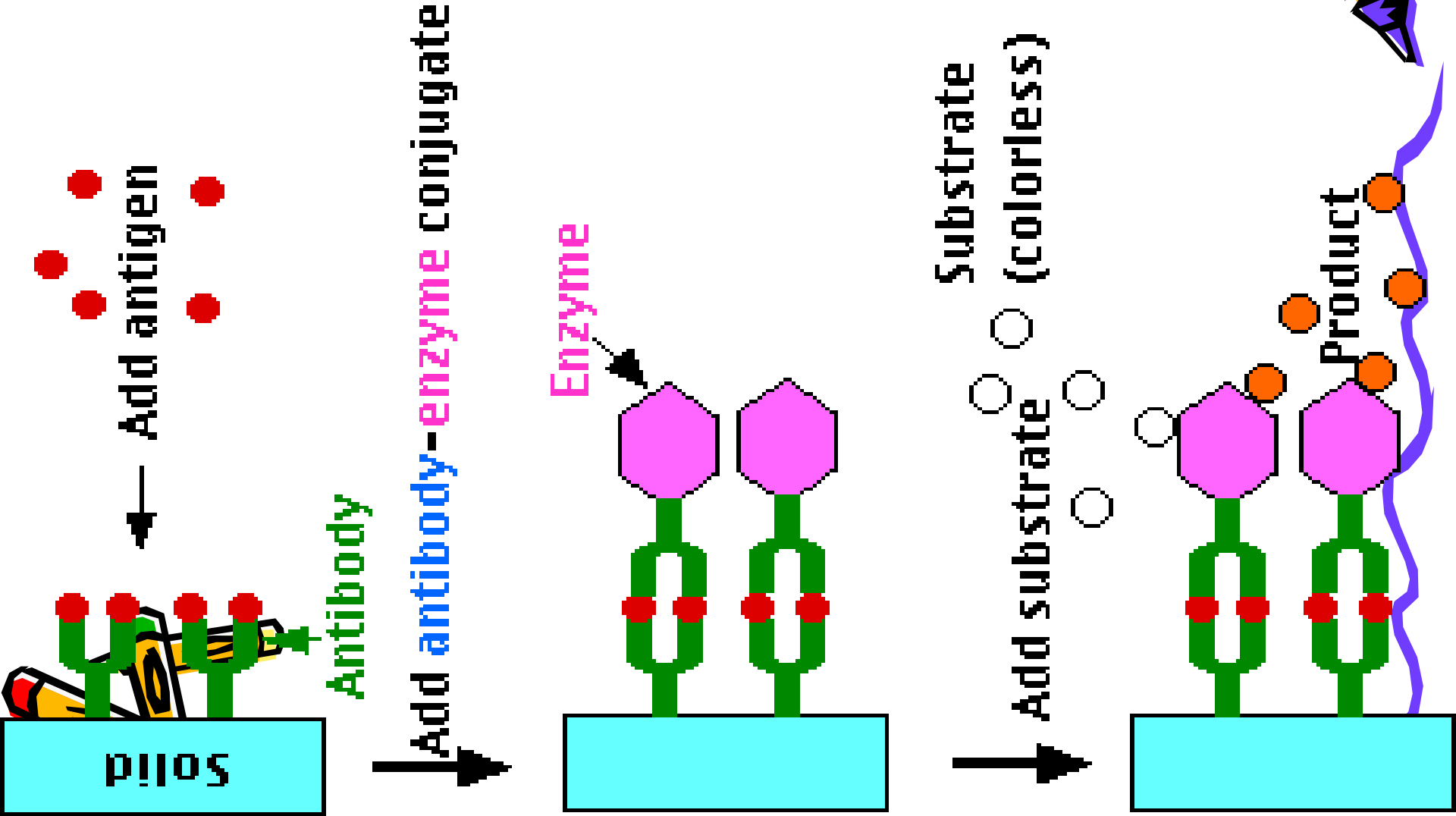


- روشهایی هستند که از آنتی بادی ها و آنتی ژنها بعنوان فاکتور شناساگراستفاده میشود.

- Yalow&Berson در سال ۱۹۵۹ از آنتی ژن نشاندار و آنتی بادی برای شناسایی انسولین استفاده کردند.



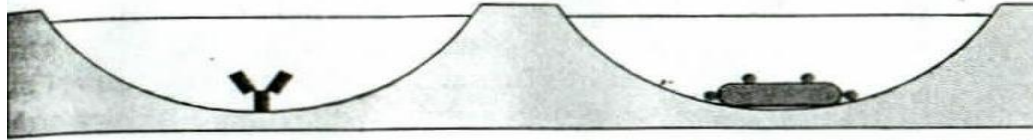
اساس کار اليزا



ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

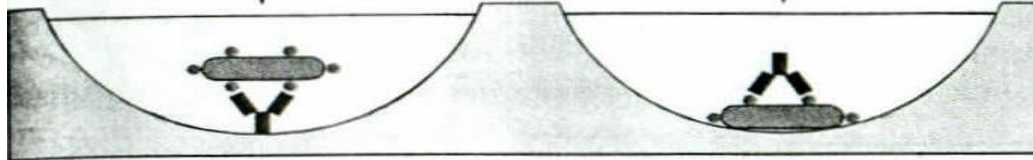
(a) Double antibody sandwich assay

(b) Indirect immunosorbent assay



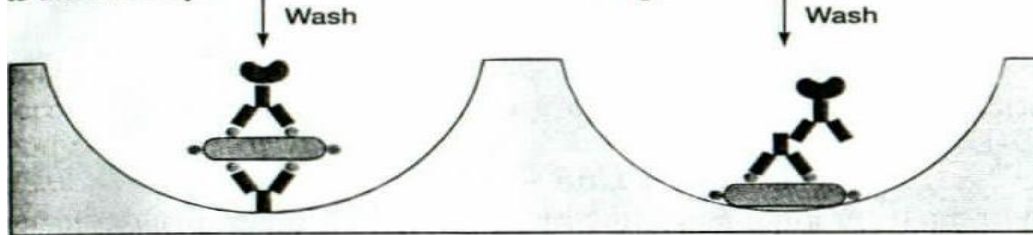
Antibody is absorbed onto the well and sensitizes the plate.

Antigen is absorbed onto the well and sensitizes the plate.



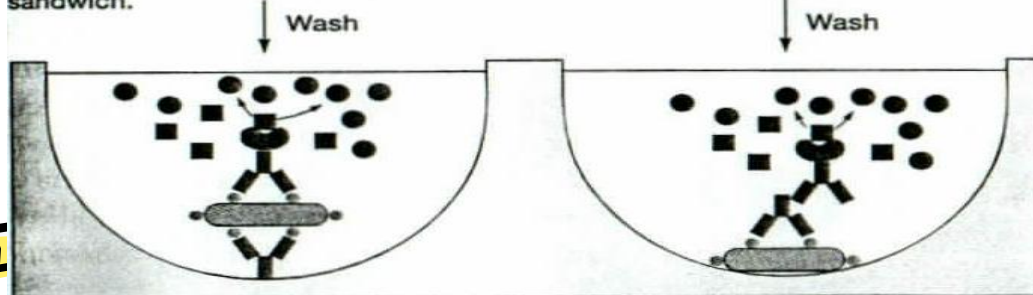
Test antigen is added; if complementary, antigen binds to the antibody.

Test antiserum is added; if antibody is complementary, it binds to the antigen.



Enzyme-linked antibody specific for test antigen then binds to antigen, forming a double antibody sandwich.

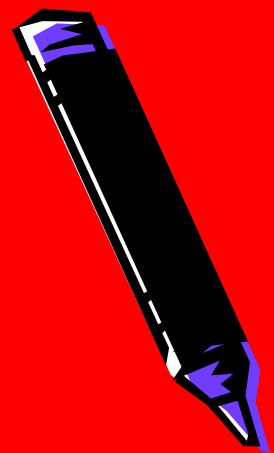
Enzyme-linked anti-gamma globulin (anti-antibody) binds to bound antibody.



Enzyme's substrate (■) is added, and reaction produces a visible color change (●) which is measured spectrophotometrically.

Enzyme's substrate (■) is added, and reaction produces a visible color change (●) which is measured spectrophotometrically.





- Heterogenous method

(جدا سازی مولکول نشاندار از غیر نشاندار)

- Homogenous method

(نیاز به جداسازی ندارد.)



سیستم الایزا به طور خلاصه شامل مراحل زیر است :

- ۱- فرایند کوتینگ Ab یا Ag
- ۲- افزودن نمونه تست یا استاندارد
- ۳- انکوباسیون و انجام واکنش
- ۴- جداسازی واکنش دهنده های آزاد با شستشو
- ۵- افزودن معرف نشاندار شده با آنتی بادی
- ۶- جداسازی گنژوگه اتصال یافته از نوع آزاد توسط شستشو
- ۷- افزودن سیستم نمایانگر که سوبسترای آنزیم است و کروموفور ایجاد رنگ می کند
- ۸- قرائت چشمی یا طیف سنجی

طبقه بندی الیزای

۱- الیزای مستقیم

۲- الیزای غیر مستقیم

۳- الیزای ساندویچ

۴- الیزای رقابتی یا مهارتی

جمع آوری و نگهداری نمونه

برای تمام سنجش های ایمنی از سرم استفاده می شود اگر در کیت استفاده از پلاسما توصیه شد . باید مشخص شود از چه نوع ضد انعقادی برای بدست آوردن پلاسما می توان استفاده کرد استفاده از پلاسمای حاوی EDTA باید با احتیاط برخورد شود زیرا کوفاکتور آتريم آلکالن فسفاتاز را مهار می کند و سدیم آزاید یک مهار کننده قوی پر اکسیداز است لیپمی و همولیز در سنجش برخی آنالیت ها ایجاد تداخل می کند . همولیز به ویژه در سنجش Free T4 باعث خطا در نتایج می شود . اکثر آنالیتها در حرارت اتاق و یخچال (2-8 c) پایدار هستند . در ACTH حداکثر پلاسما را تا ۲ ساعت در لوله های پلاستیکی باید نگهداری کرد ولی اغلب آنالیت ها LH و FSH و PRL و T4 و T3 و TSH در حرارت یخچال تا یک هفته و در فریزر ۲۰- تا چندین ماه پایدار هستند .

عوامل ایجاد کننده خطا و مشکلات احتمالی

• عوامل قبل از انجام آزمایش

– محکم بستن و یا طولانی بسته بودن گارو

– تاثیر ضد انعقاد ها هنگام استفاده از پلاسما (EDTA روی آنزیم آکالین فسفاتاز)

– نمونه همولیز (افزایش Hb و باقی ماندن آن در محیط بعد از شستشودر سنجش هایی که از آنزیم پراکسیداز استفاده میشود تداخل ایجاد میکند)

عوامل ایجاد کننده خطا و مشکلات احتمالی



– نمونه لیپمیک باعث کدر شدن و شیری شدن سرم
میشود

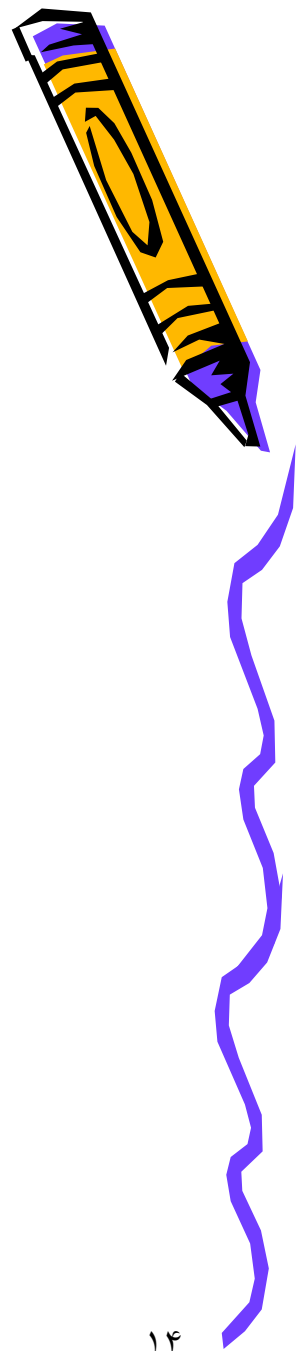
– نمونه ایکتریک (سرم زرد تیره – بیلروبین بعنوان
دترژنت عمل کرده – واکنش با قسمت‌های هیدروفوب
آنتی ژن و آنتی بادی)

– تاثیر مواد نگهدارنده

(اثر سدیم آزاید روی آنزیم‌های پراکسیداز)



ELISA TROUBLESHOOTING



مقادیر بالای کنترل منفی و یا یک گراوند



تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

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

آلوده شدن چاهک های کنترل
منفی با کنترل مثبت



مقادیر بالای کنترل منفی و یا یک گراند



دلایل احتمالی

تصحیح ایراد

- همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهکها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید

- برای هر نمونه برداری از نوک سمپلر جدید استفاده کنید

آلوده شدن ویال کنترل منفی

- توجه داشته باشید که نوک سمپلر به اندازه کافی بلند باشد تا نمونه ها با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند

- تست را با مواد کیت تازه تکرار کنید



مقادیر بالای کنترل منفی و یا بک گرانند

تصحیح ایراد

- در هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده های آنزیم کنژوگه از چاهک ها خارج شده اند
- تمامی نمونه ها و مواد را در مرکز کف چاهک ها بریزید و از تماس نوک سمپلر با دیواره و لبه چاهک ها بپرهیزید



دلایل احتمالی

شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن
کنترل منفی با آنزیم کنژوگه



مقادیر پائین کنترل مثبت یا ابزوربنسهای پائین



تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

- مطمئن شوید که تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده اند (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد)

در زمان تست مواد داخل کیت به دمای اتاق رسانده نشده اند

- مطمئن شوید که نوک سمپلرها خوب و محکم فیت شده اند لوله سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید و در صورت عدم کالیبره بودن آنها باید کالیبره شوند

مقدار نمونه کمتر از مقدار لازم است



مقادیر پائین کنترل مثبت یا ابزوربنسهای پائین

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی



محلول کروموژن - سوبسترا را درست قبل از
استفاده آماده کنید

طرز تهیه محلول کروموژن - سوبسترا را در
بروشور مطالعه کرده و به آن عمل کنید

محلول کروموژن - سوبسترا
بدرستی تهیه نشده است

آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی
کنترل مثبت به باکتری



مقادیر پائین کنترل مثبت یا ابزور بنسهای پائین

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی



دقت در زمان انکوباسیون

زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است

عملکرد صحیح نم گیر داخل کیسه پلیت
را بررسی کنید

ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت

استریپهائی که مصرف نمی شوند را در
کیسه قرار داده و در آن را محکم ببندید

دمای نامناسب در مدت انکوباسیون

بررسی دمای انکوباتور یا اتاق



مقادیر پائین کنترل مثبت یا ابزوربنسهای پائین

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی



بررسی دمای اتاق

دمای اتاق برای انکوباسیون سوبسترا
خیلی پائین است

انجام تمام مراحل تست بدون وقفه

خشک شدن چاهکها در خلال انجام تست

کنتر وگه را دوباره با صحت کامل تکرار کنید

افزودن ناکافی آنزیم کنتر وگه غلیظ به محلول
رقیق کننده برای ایجاد محلول آماده کار



در تمام خانه های پلित رنگ ظاهر شده است



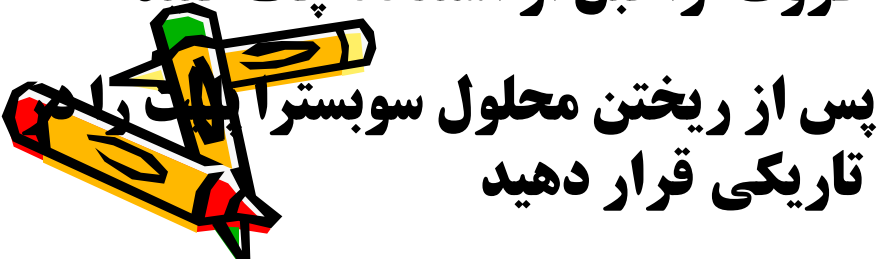
تصحیح ایراد

پر کردن چاهکها هنگام شستشو

– بررسی لوله سمپلر از نظر وجود ذرات مایع یا خشک شده

– نوک سمپلر به حد کافی بلند باشد که مایع با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند

ظروف را قبل از استفاده چک کند



پس از ریختن محلول سوپسترا به یک ظرف تاریکی قرار دهید

دلایل احتمالی

استفاده از حجم کم محلول شستشو و واکنش سوپسترا با ذرات باقی مانده آنزیم کنژوگه

محلول سوپسترا با کنژوگه آلوده است

ظرف محتوی سوپسترا آلوده و کثیف است

در خلال انکوباسیون سوپسترا پلित در مقابل نور قرار گرفته



واکنشهای مثبت کاذب

دلایل احتمالی

تصحیح ایراد

شستشوی نا کافی یا مسدود شدن
کانالهای واکشش الایزا

وجود گلبولهای قرمز در نمونه

تبخیر نمونه آنزیم کنژوگه در خلال
انکوباسیون ۳۷ درجه

دمای انکوباسیون بالا

اطمینان از صحت عملکرد واکشش الایزا
انجام کالیبراسیون و تعمیرات روتین

نمونه را قبل از استفاده سانتریفوژ نمائید

پلیت را با برچسب مخصوص بپوشانید

دمای اتاق یا انکوباتور را چک کرده
و در میزان مورد نظر کالیبره کنید





واکنشهای مثبت کاذب

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

آنزیم کنژوگه را با دقت در مرکز کف
چاهکها اضافه نموده و از تماس نوک سمپلر
با دیواره ها و لبه های چاهکها بپرهیزید

آلوده شدن چاهکها با آنزیم کنژوگه

بازرسی لوله سمپلر از نظر عدم وجود
ذرات مایع یا خشک شده خارجی و استفاده
از نوک سمپلر بلند

آلوده شدن سوبسترا به آنزیم
کنژوگه

از روی دستور کار کیت يك محلول کنژوگه
آماده کار تازه بسازید

غلظت بالای آنزیم کنژوگه در
محلول رقیق کننده



قدرت تکرار پذیری ضعیف یا دوپلیکیت ناهمخوان



دلایل احتمالی

تصحیح ایراد

اشتباه در تقسیم مواد و نمونه ها

وجود حباب در چاهکها

اثر انگشت بر روی پلیت

دستگاه دیسپنسور را چک نمائید

برای از بین بردن حبابها از سوزن استفاده
کنید (برای هر چاهک از يك سوزن)

با محلول شستشو اثر انگشت را پاک کرده و
سپس پلیت را خشک کنید

هرچاهک را كاملا با محلول شستشو پر کنید ؛

محلول شستشو سر ریز نشود . پس از خالی
کردن محلول شستشو، پلیت را خوب خشک کنید



تكنيك شستشوی ضعیف یا غلط



حساسیت ضعیف

تصحیح ایراد

تهیه محلول آماده کار تازه با
استفاده از بروشور

کالیبراسیون سمپلرها را چک کنید

تکرار تست با زمان انکوباسیون مناسب



انجام تست طبق بروشور و بدون
وقفه های اضافی

دلایل احتمالی

در تهیه آنزیم کنژوگه آماده کار از مقدار
مناسب و کافی آنزیم کنژوگه غلیظ در محلول
رقیق کننده آن استفاده نشده

اشتباه در سمپلینگ آنزیم کنژوگه آماده کار

زمان انکوباسیون ناکافی

دما مناسب نیست یا پلیت بعد از انکوباسیون اول
مدت زیادی باقی مانده تا عملیات بعدروی آن

صورت گیرد



ابزوربنس کالیراتورها (استانداردها) بالاست

تصحیح ایراد

تست را طبق دستور بروشور و بدون
وقفه های اضافی انجام دهید

کالیراسون سمپلرها را بازرسی کنید



دلایل احتمالی

پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی
در دمای بالاتر از آنچه سازنده کیت
سفارش کرده باقی مانده تا عملیات بعد
روی آن صورت گیرد

مقادیر کافی از نمونه ها در چاهک ها
ریخته نشده



نمونه ابزار بنس خارج از رنج کالیبراتورها دارد

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

نمونه را با کالیبراتور صفر رقیق کرده
و تست را تکرار کنید

غلطت در نمونه بسیار بالاست



کلیه جذبه‌های نوری پائین است

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

حفظ دمای آزمایشگاه بین ۲۰ تا ۲۵
درجه

دمای اتاق زیر ۲۰ درجه سانتی گراد است



کنترل از رنج خارج است

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

تکرار تست با کنترل جدید

آلودگی کنترل

تکرار تست با کالیبراتورهای جدید

آلودگی کالیبراتورها



کروموژن آبی رنگ شده است

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

استفاده از کروموژن تازه

آلودگی کروموژن



بعد از ترکیب کروموژن و سوبسترا محلول آبی رنگ می شود

تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

استفاده از کروموژن و سوبسترای تازه

آلودگی کروموژن و سوبسترا



محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution) زرد رنگ شده



تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

استفاده از محلول متوقف کننده تازه

آلودگی محلول متوقف کننده



رسوب و ذرات سیاه در چاهکها قبل از خواندن ایزوربنس



تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

رعایت زمان توصیه شده واکنش
آنزیم کنژوگه و سوبسترا

طولانی شدن زمان واکنش آنزیم کنژوگه و
سوبسترا



پس از انکوباسیون سوبسترا رنگی ظاهر نمی شود



تصحیح ایراد

دلایل احتمالی

تهیه محلول تازه بانسبتهای صحیح

استفاده از نسبتهای نامناسب
کروموژن و سوبسترا

استفاده از سوبسترای سالم

سوبسترا خراب شده است



رنگزایی با سرعت کم و با تاخیر ایجاد می شود



تصحیح ایراد

تکرار تست با محلول آنزیم کنژوگه جدید

عدم استفاده از نگهدارنده های بازدارنده

دمای آزمایشگاه و سوبسترا را چک کنید.
(دما باید بین ۲۰ تا ۲۵ درجه باشد)



دلایل احتمالی

آنزیم کنژوگه ضعیف است

اثر منفی برخی نگهدارنده ها بر فعالیت
آنزیم (سدیم آزاید)

دمای پائین آزمایشگاه و یا دمای پائین سوبسترا

محکات مهم در تستشو



نکاتی مهم در شستشو:



- مراحل تهیه محلول شستشو را به دقت انجام دهید .
- صحت عمل دستگاه شستشو را روزانه و به صورت روتین چک کنید.

- از طراز بودن سطح پلیت در هنگام شستشو اطمینان حاصل کنید .

- مطمئن شوید که چاهکها در هنگام شستشو کاملاً پر می شوند

- از خروج باقی مانده های کنژوگه در هنگام شستشو اطمینان حاصل کنید .

- در هنگام شستشو از سر ریز شدن محلول شستشو و ورود آن به چاهکهای مجاور
پرهیزید .

- در دستگاه واشر فشار شستشو را کاهش داده و از فشارهای بالا
استفاده نکنید .



نکات مهم در مورد شستشو

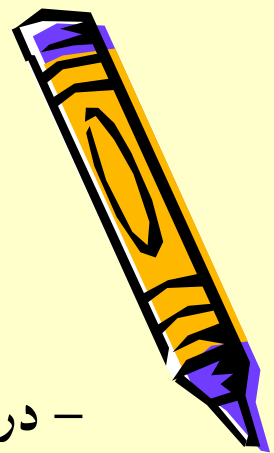
**شستشو جهت جدا کردن ترکیبات اتصال یافته به کف چاهک
از ترکیبات اتصال نیافته است**

**۱- محلول شستشو باید رقیق شود اگر غلیظ باشد باعث جدا
شدن مولکولهای اتصال یافته می شود**

۲- عمل شستشو ۳ بار انجام می شود

**رعایت و Soak Time ۳- برای شستشوی بهتر زمان انتظار
از سر ریز شدن محلول چاهک باید اجتناب کرد .**

ادامه:



- در هنگام شستشو باید طبق دستور کیت به تعداد دفعاتی که ذکر شده عملیات شستشو را انجام داد .

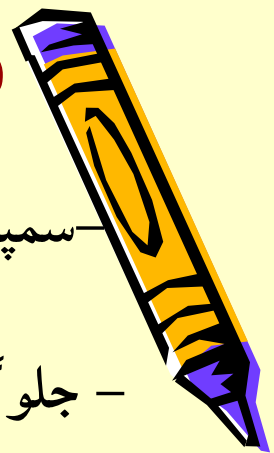
- بین هر مرحله شستشو پس از ریختن محلول شستشو ۲۰ ثانیه وقفه ایجاد کنید .

- در هنگام خالی کردن و یا آسپیره کردن محلول شستشو اطمینان حاصل کنید که تمامی آن خارج میشود .

- پس از اتمام مراحل شستشو با برگرداندن پلیت بر روی کاغذ نم گیر ذرات باقی مانده را خارج کنید .



نکاتی مهم در سمپلینگ



– سمپلرها را طبق دستور سازنده آنها مرتباً کالیبره کنید.

– جلوگیری از ایجاد کف و حباب در هنگام افزودن نمونه.

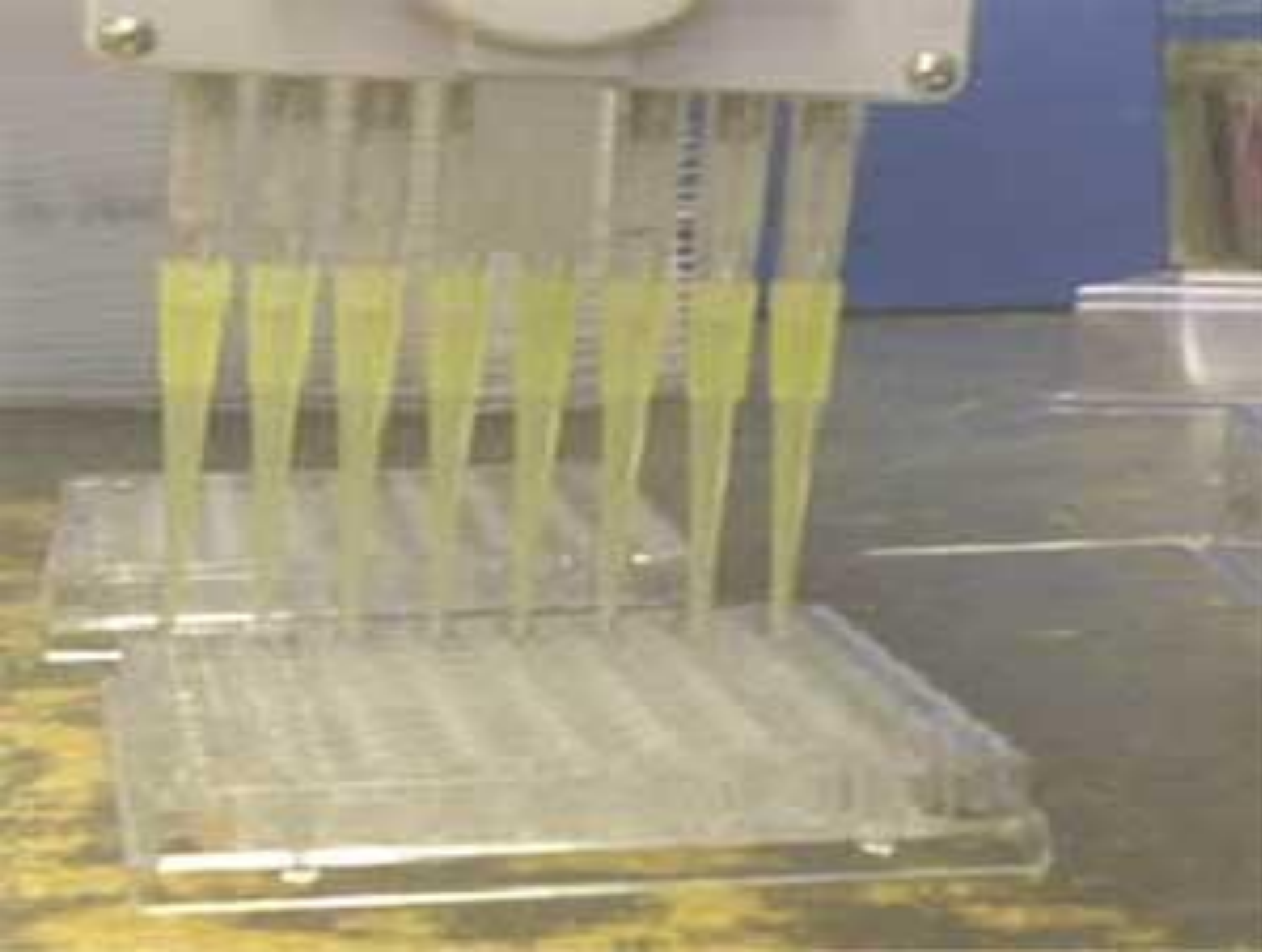
– از پاشیده شدن نمونه ها و سایر محلولها به اطراف و سایر چاهکها پرهیزید .

– برای هر نمونه یا محلول از نوک سمپلر جدید استفاده کنید .

– لوله سمپلر را جهت وجود قطرات و یا مواد خشک شده چک کرده و در صورت وجود آنها را پاک کنید.

– اطمینان از محکم شدن نوک سمپلرها بر سر سمپلر





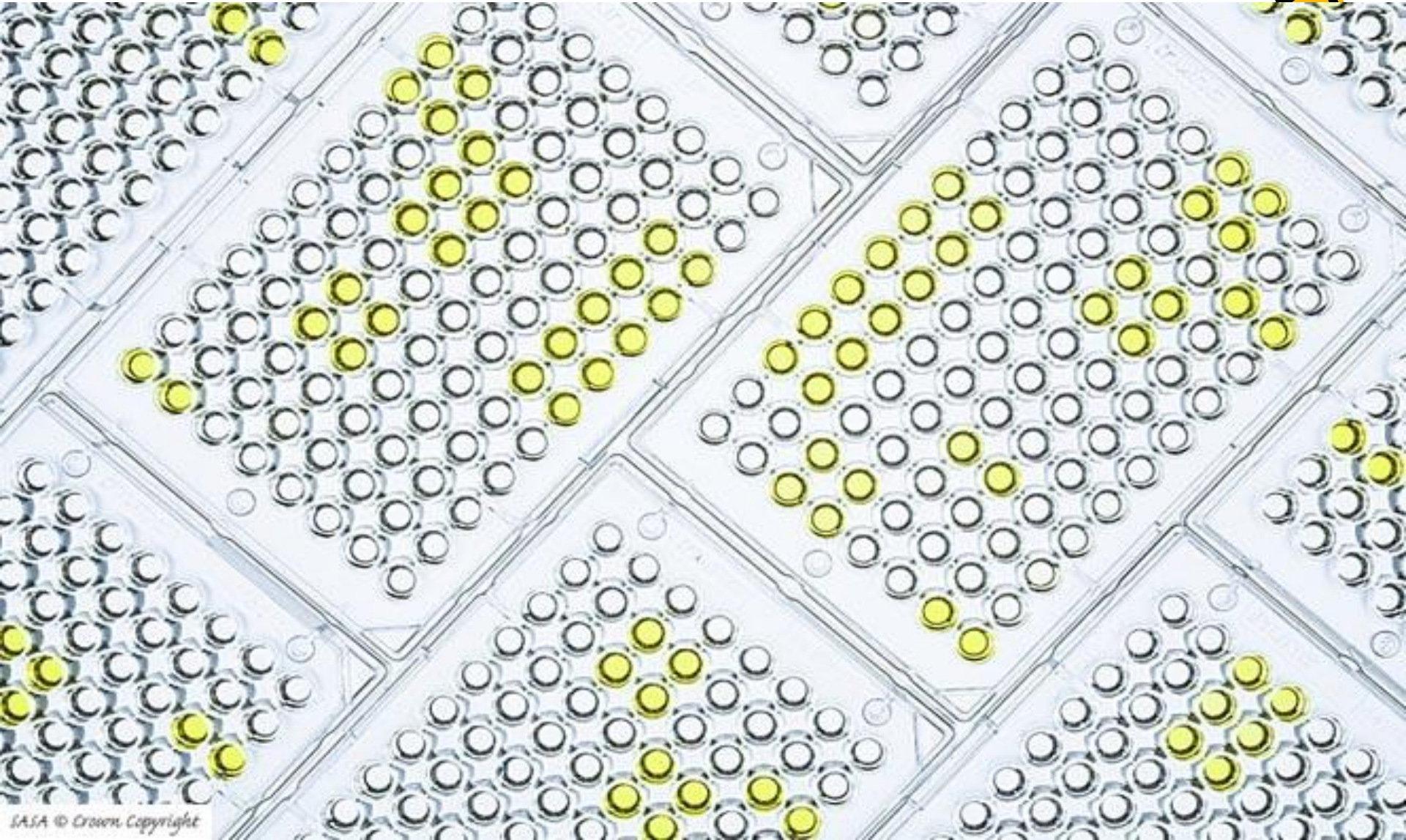
نکاتی مهم در مورد میکروپلیت :



- قبل از باز کردن درب کیسه حاوی میکروپلیت آنرا به دمای اتاق برسانید .
- بعد از افزودن سوبسترا پلیت را در جای تاریک قرار دهید.
- در هنگام خالی کردن پلیت باید دو طرف آنرا طوری فشار دهید که استریپها نتوانند خارج شوند.
- اگر استریپها در هلدِر خوب فیت نمی شوند ابتدا آنها را ۱۸۰ درجه چرخانده و جا بزنید و اگر باز هم فیت نشدند از هلدِر مناسب استفاده کنید .
- استریپهای استفاده نشده را همراه با نم گیر به داخل کیسه مخصوص برگردانده و در آنرا خوب ببندید.



نکات مهم در مورد میکروپلاست



ادامه:



در زمان باز کردن درب پلیت در بار اول تاریخ را روی کیسه پلیت یادداشت کنید .

- اثر انگشت ها را توسط محلول شستشو از روی پلیت پاک کنید و آنرا خشک کنید.

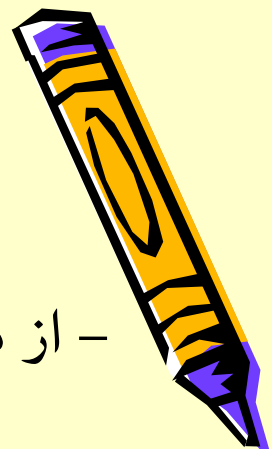
- توجه کنید که در هنگام انجام مراحل تست مانند شستشو، ریختن محلولها در چاهک ها و قرائت ابزوربنس چاهکها در جای خود باشند .

- قبل از قرائت ابزوربنس زیر پلیت را با دستمال مخصوص بدون ذرات پخش شونده پاک کنید .

- در خلال انجام تست نباید اجازه داد که کف چاهک خشک شوند.



نکاتی مهم در مورد آماده سازی سوبسترا:



- از محلولهای تازه کروموژن و سوبسترا استفاده کنید .

- طرز تهیه محلول سوبسترای آماده کار را به دقت مانند دستور کیت اجرا کنید .
- دمای محلول در نتیجه تست بسیار مهم است زیرا در تولید رنگ تاثیر بسزائی دارد.

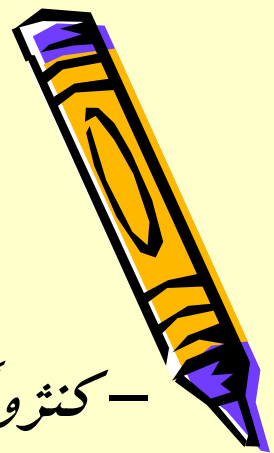
- برای نگهداری محلول، سوبسترای تازه را با محلول قدیمی در یک ظرف مخلوط نکنید .

- برای استفاده مجدد از ظروف سوبستراهای کهنه آنها را با محلول اسید سولفوریک شسته چند بار با آب مقطر شستشو دهید.



نکات مهم در مورد سوبسترا و کنژوگه

- ۱- در هنگام رقیق کردن کنژوگه و تهیه سوبسترا به پایداری آن باید توجه کرد
- ۲- از مخلوط کردن ۲ سوبسترا یا ۲ کنژوگه آنزیمی از دو سری ساخت باید اجتناب کرد .



نکاتی مهم در مورد آنزیم کنژوگه:

- کنژوگه را در دمای ذکر شده در کیت نگهداری کنید .

- کنژوگه رقیق شده را برای مدت طولانی جهت انجام تستهای دیگر نگهداری نکنید. و همیشه به اندازه نیاز برای تستی که انجام می دهید محلول کنژوگه را آماده کنید

- هرگز برای مدت طولانی محلول کنژوگه را در روی میز کار باقی نگذارید



نکاتی مهم در مورد دما :

- تقریباً نیم ساعت قبل از شروع تست تمامی اجزای کیت را به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) برسانید .

- دمای انکوباتور را بطور مرتب چک کنید.
دمای پائین تر از حد لازم می تواند باعث کاهش ابزوربنس شده و
دمای بالاتر از آن باعث افزایش ابزوربنس میشود .

- دمای مناسب برای انکوباسیون در دمای اتاق ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد
می باشد

پایان

با تشکر از حضور شما
سروران گرامی

A-BEHJATI