

اصول عملکرد، نگهداشت و کنترل کیفی تجهیزات آزمایشگاهی؛ الایزا و الایزا و اشر



وسعی از طول موج ها را آسان تر می کند، دستگاه های الایزا فیلترها یا شبکه های انکسار دارند که طول موج استفاده شده در الایزا را بین ۴۰۰ تا ۷۵۰ نانومتر محدود می سازد. بعضی از میکروپلیت ها آزمایش را در محدوده ماوراء بنفش و بین طول موج ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام می دهد. در سیستم اپتیکی، از فیبرهای نوری که نور را به چاهک های حاوی نمونه در میکروپلیت هدایت می کند، استفاده می شود. شعاع نور که از نمونه می گذرد، دارای پهنای ۱ تا ۳ میلیمتر است. یک سیستم آشکارساز، نوری را که از نمونه ساطع می شود نمایان ساخته و با تقویت سیگنال میزان جذب در نمونه را تعیین می کند. سپس یک سیستم خوانشگر آن را به اطلاعاتی تبدیل می کند که تفسیر نتایج آزمایش را ممکن می سازد.

نمونه ها در درون پلیت های خاص با تعداد مشخص چاهک قرار داده می شود که آزمایش در آنها انجام می گیرد. پلیت های معمولی دارای ۸ ستون، ۱۲ ردیف و در مجموع ۹۶ چاهک است، ولی پلیت هایی با تعداد چاهک های بیشتر نیز وجود دارد. برای کاربردهای اختصاصی، روش معمول، افزایش تعداد چاهک ها به ۳۸۴ است که مقدار مصرف نمونه و محلول های مورد استفاده را کمتر و کارایی را بیشتر می کند. محل قرارگرفتن حسگرهای نوری روی الایزا متفاوت است و ممکن است در بالای پلیت یا زیرچاهک ها در پلیت نصب شود.

پایه اساسی آزمایش الایزا واکنش آنتی بادی با آنتی ژن است. در روش الایزا آنتی بادی اختصاصی با یک آنتی ژن مشخص واکنش می دهد سپس به آن یک آنتی بادی اتصال یافته با یک آنزیم به عنوان سیستم نشانگر اضافه می شود در ادامه با افزودن سوبسترای آنزیم آن را تبدیل به یک محصول که یک ماده رنگی است کرده و توسط دستگاه قرائت می کنیم. طول موج رنگ به دست آمده که نشانگر حضور یک آنتی بادی (و یا آنتی ژن) و نیز غلظت آن است توسط دستگاه الایزا ریدر (فتومتر) قرائت شده و ثبت می شود.

الایزا یک روش آزمایشگاهی بیوشیمیایی ساده با حساسیت بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به صورت همزمان فراهم می نماید. این روش در آزمایشات ایمنولوژی به منظور بررسی وجود یک آنتی بادی یا آنتی ژن در نمونه های بیولوژیک مورد استفاده قرار می گیرد.

دستگاه الایزا عموماً به عنوان ابزاری تشخیصی در پزشکی و پاتولوژی و همچنین برای انجام تست کنترل کیفیت در بسیاری از صنایع کاربرد دارد. از این تکنیک در گياه پزشکی برای شناسایی ویروس ها و پاتوژن ها نیز استفاده می شود. امروزه الایزا یکی از قدرتمندترین روش های آزمایشگاهی برای پی بردن به اختلالات سیستم ایمنی است. این آزمایش به منظور پی بردن به آنتی ژن ناشی از ارگانی عفونی در بدن یا مواد غیرنرمالی که معرف برخی بیماری ها است انجام می شود. همچنین آنتی بادی هایی که در پاسخ به برخی عفونت ها یا بیماری ها به وجود آمده نیز توسط این آزمایش قابل تشخیص است. همچنین لازم به ذکر است که آزمایش الایزا اولین آزمایش متداول در غربالگری HIV است. پیش از ایجاد الایزا تنها گزینه برای انجام سنجش ایمنی و سنجش های ایمنوشیمی، روش Radioimmunoassay بود، تکنیکی که در آن از آنتی ژن یا آنتی بادی نشاندار شده با مواد رادیواکتیو استفاده می شود. در این روش، ماده رادیواکتیو سیگنال تولید می کند که نشان می دهد آنتی ژن یا آنتی بادی خاص در نمونه وجود دارد یا نه. اما از آنجاییکه رادیواکتیویته تهدیدی برای سلامتی محسوب می شود به دنبال جایگزین ایمن تری برای آن بودند که به جای سیگنال رادیواکتیو، سیگنالی غیر رادیواکتیو تولید کند. زمانیکه آنزیمی مثل پراکسیداز (Peroxidase) با سوبسترای مناسب (ماده ای که آنزیم بر آن اثر می کند) واکنش می دهد تغییر رنگی روی می دهد که به عنوان سیگنال مورد استفاده قرار می گیرد. با اتصال این آنزیم به آنتی بادی یا آنتی ژن می توان وجود هر یک را ردیابی کرد.

دستگاه الایزا در واقع شبیه دستگاه فتومتر است، با این تفاوت که نوع کووت (Cuvett) یا همان ظرف محتوی نمونه، مسیر خوانش و تعداد فیلترها تغییر کرده است. به عنوان مثال به جای کووت از چاهک یا Well استفاده شده و مسیر خوانش آن نیز برخلاف تکنیک های فتومتری، به صورت عمودی است. همچنین با توجه به اینکه در تکنیک الایزا از آنزیم ها و سوبسترای مشخصی استفاده می شود، لذا دارای فیلترهای کمتری نسبت به فتومترها است.

اصول عملکرد

دستگاه الایزا در واقع یک اسپکتروفتومتر اختصاصی است. برخلاف اسپکتروفتومترهای معمولی که قرائت در محدوده



شکل ۱. ۹۶-Well Plates

خانه های را چاهک و هر ستون ۸ خانه ای را یک استریپ می گویند. جنس چاهک ها از پلی استیرن، پلی وینیل کلراید و یا پلی پروپیلن بوده و عمقی حدود یک سانتیمتر داشته و به اشکال ته صاف و یا ته گرد موجود است. چاهک های ته صاف برای قرائت اسپکتروفتومتری در سنجش هایی که افزایش رنگ دارند مناسب بوده و چاهک های ته گرد برای این امر مناسب نیست.

◆ ویال های استاندارد کنترل منفی و مثبت: این ویال ها با توجه به نوع کیت می تواند به صورت محلول یا لیوفیلیزه باشد. ◆ رقیق کننده نمونه: مزیت رقیق کننده در این است که با توجه به رقیق سازی نمونه، اثر هوک را تا حدود زیادی خنثی می کند. منظور از اثر هوک، کسب نتایج منفی کاذب به علت غلظت بالای آنالیت (Analyte) یا ماده تجزیه شونده است.

◆ کونژوگه نشان دار شده با آنزیم: مهم ترین آنزیم های مورد استفاده در الایزا شامل: پراکسیداز، آلکالین فسفاتاز و پنی سیلیناز است ولی عمدتاً از پراکسیداز استفاده می شود. آلکالین فسفاتاز به دلیل قیمت بالایی که نسبت به پراکسیداز دارد بیشتر در کارهای تحقیقاتی استفاده می شود. لازم به ذکر است نقش آنزیم مورد استفاده برای نشاندار سازی، در تعیین نوع سوبسترا و نوع محلول متوقف کننده بسیار مهم است.

◆ محلول شستشو: این محلول متشکل از بافر فسفات سالین -phosphate buffer salin-، تواین ۲۰-Tween- و تایمرسال -thimerosal- است. هرچند بافر فسفات سالین با تنظیم قدرت یونی و pH مناسب، اتصال غیراختصاصی به جداره چاهک را به حداقل می رساند، برای افزایش دقت و کاهش بیشتر اتصالات غیراختصاصی از مقدار کمی پروتئین و دترجنت مانند تواین ۲۰ استفاده می شود. از آنجاییکه محیط های بافری غالباً برای رشد میکروارگانیسم ها بسیار مناسبند، لذا از ترکیبات نگهدارنده نظیر تایمرسال استفاده می شود.

◆ محلول سوبسترا-کروموژن: این محلول به صورت جداگانه یا به صورت ترکیبی موجود است. سوبسترا بر اساس حلالیت، می تواند محلول یا غیرمحلول باشد اما سوبسترای مصرفی در آزمایش الایزا بایستی محلول باشد. نوع سوبسترا بستگی به کونژوگه آنزیمی دارد یعنی اگر کونژوگه آنزیمی پراکسیداز باشد، سوبسترا می تواند تترامتیل بنزیدین

مراحل یک آزمایش الایزا

- مراحل یک آزمایش کامل الایزا معمولاً به شرح زیر است:
- ✓ شستشوی اولیه پلیت با استفاده از شستشو دهنده میکروپلیت
- ✓ پرکردن چاهک ها از نمونه و محلول با استفاده از سیستم توزیع کننده یا پی پت های چندکاناله
- ✓ قراردادن پلیت در دمای کنترل شده انکوباتور برای شروع واکنش ها
- ✓ این مراحل را می توان بسته به نوع آزمایش چند بار تکرار کرد.
- ✓ در نهایت، زمانی که تمام مراحل تکمیل شد، پلیت به خوانشگر منتقل و نتایج خوانده شده و تشخیص قابل استنتاج است.

انواع دستگاه الایزا

دستگاه های خوانشگر الایزا (Elisa Reader) بر اساس نوع و سیستم خوانشگر به سه دسته تقسیم می شود:

◆ تک خوانشگر (Single Reader)

در هر بار خوانش تنها یک چاهک را به طریق دستی قرائت کرده و هیچگونه امکانات محاسباتی ندارد. لذا بایستی منحنی استاندارد تست ها توسط فرد آزمایش کننده به صورت دستی رسم شود به همین علت از قیمت و کیفیت پایینی برخوردار است.

◆ خوانشگر نواری (Strip reader)

تعداد ۱ الی ۳ ردیف چاهک نواری ۸ یا ۱۲ خانه ای را به صورت خودکار قرائت کرده و در عین حال منحنی تست ها را براساس مُد محاسباتی رسم می نماید. علاوه براین، به علت دارا بودن Differential Filters قابلیت خوانش در دو طول موج را به طور همزمان دارد.

◆ خوانشگر صفحه ای (Plate reader)

قابلیت خواندن یک صفحه چاهک ۹۶ خانه ای (شکل ۱) نمونه را در حداقل زمان دارا بوده و از سرعت، دقت و صحت بیشتری نسبت به دستگاه های خوانشگر نواری برخوردارند از این رو قیمت بالاتری نیز دارد.

تجهیزات لازم برای انجام آزمایش الایزا

در آزمایشگاه های پزشکی برای انجام آزمایشات سنجش ایمنی به روش الایزا امکانات زیر مورد نیاز است:

- ✓ میکروپلیت ریدر
- ✓ میکروپلیت واشر
- ✓ سمپلر و عوامل پی پت کردن
- ✓ انکوباتور برای انکوبه کردن پلیت ها
- ✓ کیت الایزا

کیت الایزا خود متشکل از موارد زیر است :

◆ یک یا دو عدد پلیت ۹۶ خانه ای که در ۱۲ ستون ۸ خانه ای قرار گرفته اند همانطور که در شکل ۱ مشخص است. هر یک از

Ortho-Tetra Methyl Benzidine- و یا ارتوفنل دی آمین -phenylenediamine- باشد و رنگ حاصل از واکنش آبی خواهد بود. اگر کونژوگه آنزیمی آلکالین فسفاتاز باشد، سوبسترا می تواند پارائیتروفنل -Para NitroPhenol- باشد و رنگ حاصل از واکنش زرد خواهد بود.

♦ **محلول متوقف کننده یا بلوکر Stopping or Blocking-**
Solution- این محلول با توجه به نوع کونژوگه آنزیمی می تواند اسیدی یا قلیایی باشد. هنگامی که کونژوگه آنزیم پراکسیداز باشد، برای توقف واکنش میبایست از محلول های اسیدی نظیر اسید کلریدریک و یا اسید سولفوریک استفاده کرد. در این صورت رنگ آبی واکنش تبدیل به زرد می شود و اگر کونژوگه آلکالین فسفاتاز باشد برای توقف واکنش از محلول های قلیایی نظیر هیدروکسید سدیم -NaOH- استفاده می شود که در این حالت رنگ زرد واکنش به رنگ قهوه ای تبدیل خواهد شد.

روش های کاهش خطا در الایزا

برای کاهش میزان خطا در نتایج آزمایشات الایزا موارد زیر می بایست رعایت شوند.

✓ اطلاعات بالینی بیمار به طور کامل در برگ پذیرش ثبت شود.
✓ نمونه گیری از بیمار باید به دقت انجام گیرد زیرا برخی عوامل به عنوان مثال بستن گارو یا تورنیکه به مدت طولانی ممکن است موجب ایجاد خطا در اندازه گیری شود.

✓ دقت در نحوه جداسازی سرم از لخته به نحوی که سرم جدا شده حاوی فبیرینوژن یا ذرات دیگر نباشد.

✓ نمونه مورد استفاده لیز، زرد رنگ (یرقان) و چربی دار نباشد.

✓ تا حد امکان از فریز و دفریز کردن نمونه ها جلوگیری شود.

برخی نکات که قبل از انجام آزمایش می بایست مورد توجه قرار گیرند عبارتند از :

✓ حمل و نقل کیت ها و همچنین نگه داری آنها باید در دمای ۲ تا ۸ درجه صورت گیرد.

✓ قبل از خریداری کیت مورد مصرف، بهتر است آن را از لحاظ اعتبار کمپانی سازنده، تاریخ تولید، بسته بندی مناسب و نیز موجود بودن تمامی استانداردها و کنترل های مثبت و منفی بررسی کنید.

✓ لوازم حجمی مانند سمپلرهای مورد استفاده کنترل شده باشند.

✓ اطمینان از کارکرد صحیح دستگاه ها و تجهیزات مورد استفاده، به عنوان مثال اطمینان از صحت طول موج فیلترهای الایزا ریدر با استفاده از ماده رنگی با ثبات، مانند بی کربنات پتاسیم و یا عملکرد صحیح دستگاه شستشو دهنده.

✓ آماده سازی بافر یا محلول شستشو با دقت کامل و به اندازه مورد نیاز برای هر بار مصرف و همچنین عدم استفاده از

محلول های شستشوی نامناسب یا آب مقطر ناخالص.

✓ استفاده از نوک سمپلرهای یک بار مصرف و لوله آزمایش عاری از هرگونه مواد شوینده و پاک کننده.

✓ برای سوبسترا بهتر است از لوله شیشه ای که با اسید سولفوریک رقیق شسته شده و با آب مقطر دوبار تقطیر آب کشی شده استفاده کرد.

نکاتی که هنگام انجام تست های الایزا می بایست مورد توجه قرار گیرند عبارتند از :

✓ تمامی محلول های موجود در کیت می بایست قبل از مصرف، خوب مخلوط و به دمای آزمایشگاه برسند.

✓ محلول های موجود در کیت باید قبل از مصرف از لحاظ کدورت و آلودگی قارچی و ذرات خارجی بررسی شوند.

✓ درب پاکت حاوی میکروپلیت ها بعد از رسیدن به دمای اتاق باز شود و برای جلوگیری از ورود گرد و غبار و رطوبت به داخل آنها سریعاً پس از جداسازی تعداد استریپ مورد نیاز به داخل کیسه منتقل شوند.

✓ در هر نوبت کاری از کلیه استانداردها و کنترل های موجود در کیت استفاده شود.

✓ برای افزایش پایداری بهتر است کیت باز شده پس از استفاده بلافاصله به یخچال منتقل شود.

✓ عمل بهم زدن و مخلوط نمودن محتویات چاهک ها باید به آرامی صورت گیرد تا از ایجاد حباب یا انتقال محلول از یک چاهک به چاهک های مجاور جلوگیری شود.

✓ جهت اطمینان از سالم بودن سوبسترا و کونژوگه، حجم های مساوی از این دو را باهم مخلوط نمایید در این صورت رنگ مورد نظر میبایستی به سرعت ایجاد شود.

✓ برای پی پت نمودن محلول ها و جلوگیری از پرتاب قطعات به سایر چاهک ها و همچنین یکسان بودن شرایط برای تمامی چاهک ها از یک تکنیک ثابت استفاده کنید، بهتر است برای این منظور عمل پی پت کردن بطور مایل و چسبیده به جدار فوقانی چاهک ها صورت پذیرد.

✓ کنترل اتصال محکم نوک سمپلر به بدنه آن در حین کار ضروری است.

✓ بهتر است از مخلوط نمودن محلول سوبسترای تازه آماده به کار با محلول قبلی اکیداً خودداری شود.

✓ سطوح زیرین چاهک ها باید عاری از خراش و کثیفی یا برجها ماندن اثر انگشت باشد.

✓ جلوگیری از بروز نوسانات ناگهانی دما در هنگام انکوباسیون توسط عوامل محیطی ضروری است زیرا شوک حرارتی و اختلاف حرارت محیط کار و محیط داخلی انکوباتور به واسطه ورود ناگهانی سرمای محیط به داخل انکوباتور موجب

جذب نوری غیریکنواخت خصوصاً در استریپ های ابتدایی می شود.
✓ در مراحل مختلف شستشو دقت شود ذرات کونژوگه
آنزیمی در کف چاهک ها باقی نماند.

نگهداری دستگاه

برنامه نگهداری روزانه

- ✓ بازمینی سنسورهای نوری هر کانال از نظر تمیز بودن. چنانچه کثیف هستند سطح پنجره های عبور دهنده نور و سنسورها را با یک برس کوچک تمیز کنید.
 - ✓ بررسی روزانه تمیز بودن سیستم نوری.
 - ✓ بررسی کالیبراسیون میکروپلیت ریدر یا خوانشگر، به این منظور اجازه دهید دستگاه هنگام شروع کارهای روزانه به مدت ۳۰ دقیقه روشن بماند تا گرم شود سپس بلانک را قرائت و بعد یک پلیت شامل سوبسترا را قرائت کنید. خوانش ها باید یکسان باشد اگر اینطور نبود، پلیت را چرخانده و قرائت را به منظور تعیین اینکه آیا اختلاف در پلیت یا در خوانشگر است، تکرار کنید.
- برنامه نگهداری ۳ ماه یکبار
- ✓ بررسی پایداری لامپ، به این منظور از پلیت کالیبراسیون استفاده می شود به این صورت که دو قرائت با فاصله ۳۰ دقیقه با همان پلیت انجام می شود و هیچ تفاوتی میان قرائت ها نباید مشاهده شود.
 - ✓ تمیز کردن سیستم های نوری و دتکتور.
 - ✓ از تراز بودن هر چاهک با نور ساطع شده و سیستم آشکارکننده اطمینان حاصل کنید.

کالیبراسیون الایزا

کالیبراسیون الایزا ریدر یک مرحله اختصاصی است که میبایست توسط یک تکنسین یا مهندس آموزش دیده که با دستورالعمل های سازنده دستگاه هم آشنایی داشته باشد، انجام شود. برای انجام کالیبراسیون، داشتن یک مجموعه از فیلترها که از لحاظ اندازه یکسانند لازم است. سازندگان دستگاه، پلیت های کالیبراسیون را برای هر طول موجی که در دستگاه به کار می رود، فراهم می سازند. برای انجام کالیبراسیون مراحل زیر را باید دنبال کرد:

- ✓ پلیت کالیبراسیون را روی دستگاه قرار دهید.
- ✓ یک خوانش کامل را با پلیت کالیبراسیون انجام داده و مشخص کنید که آیا تفاوت هایی در قرائت های به دست آمده از یک چاهک تا چاهک دیگر وجود دارد یا خیر. چنانچه اختلافی مشاهده شد، پلیت را ۱۸۰ درجه چرخانده و قرائت را مجدداً تکرار کنید. اگر نتایج پلیت در دو طول موج به گونه ای باشد که انتظار می رود، دستگاه کالیبراسیون دیگری احتیاج ندارد.

مشخص سازید که آیا دستگاه به کالیبراسیون احتیاج دارد یا خیر. چنانچه به کالیبراسیون احتیاج بود، راهنمایی های ارائه شده توسط کارخانه سازنده دستگاه برای کالیبراسیون را دنبال کنید.

کنترل کیفی الایزا

کنترل عملکرد لامپ و فیلترها

جهت کنترل عملکرد لامپ و فیلترهای دستگاه باید هر دو هفته یکبار طبق دستورالعمل شرکت سازنده دستگاه وضعیت این قسمت ها را چک کرد. مثلاً در برخی دستگاه ها با فشار دادن کلید (Self OK) دستگاه به طور اتوماتیک شدت نور خروجی، چرخش فیلترها، حرکت X-Y حمل کننده پلیت، صفحه نمایشگر و پرینتر را چک کرده و نتیجه را نمایش می دهد. پس از پایان یافتن چک دستگاه پرینتر نتایج را ثبت می کند پیام System Check OK معرف آن است که دستگاه آماده استفاده است. کنترل دستگاه به طریق مذکور هم بایستی به طور دوره ای هم به هنگام بازگشت دستگاه از سرویس انجام شود. چنانچه اختطاری مشاهده شد به دفترچه راهنما دستگاه مراجعه و با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.

کنترل خطی بودن (Linearity)

خطی بودن دستگاه بایستی به طور ماهیانه مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از این آزمون تعیین قابلیت دستگاه در تبعیت از قانون بیر (Beer's Law) است که طبق این قانون غلظت محلول نسبت مستقیم با مقدار نور جذب شده دارد. توجه شود که کنترل خطی بودن در دستگاه الایزا یک پارامتر مهم در کارایی دستگاه است چرا که کنترل صحت فتومتریک تا حدود زیادی با گذاشتن استانداردهای مختلف در هر run کاری قابل کنترل است اما اگر خطی بودن دستگاه دچار اشکال باشد تفاوت های فاحشی در جواب ها حاصل می شود. فقدان Linearity در غلظت های بالا معمولاً نشان دهنده وجود نورهای ناخواسته -Stray light- است که می تواند به علت خرابی فیلترها باشد. جهت چک کردن Linearity دستگاه ابتدا باید یک محلول با حداکثر جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا نزدیک به آن انتخاب کرده (محلول اسید پیکریک پیشنهاد می شود) در تمام چاهک های پلیت بریزید و پلیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت نمایید. نتیجه جذب نوری تمام چاهک ها در صورت سالم بودن فیلتر بایستی بیشتر از ۰,۳ باشد سپس یکبار دیگر بدون پلیت جذب نوری را قرائت می کنیم در چنین شرایطی باید جذب نوری برای تمام چاهک ها بین ۰,۱± باشد. در صورتی که نتایج بالا حاصل نشد با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.

کنترل کالیبره بودن موتور جابجا کننده پلیت

با استفاده از پلیت های کالیبره که داری سوراخ هایی در مکان های مشخصند، کنترل کالیبره بودن موتور صورت می پذیرد. این مکان ها، وضعیت قرارگیری سیستم نوری پلیت ریدر را مشخص می کند. وقتی پلیت کالیبره با بلانک هوا خوانده شود، سوراخ های این مکان ها، در وضعیت مطلوب، جذبی در محدوده ± 0.150 خواهند داشت.

الایزا و اشتر

میکروپلیت و اشتر یا الایزا و اشتر که به شستشو دهنده پلیت نیز معروف است برای انجام عملیات شستشو که در تکنیک الایزا لازم است، طراحی شده است. در روش الایزا، شستشو به دو صورت دستی و دستگاهی انجام می شود. روش دستی معمولاً با استفاده از میکروپی پت های تک یا ۸ کاناله و همچنین برخی توزیع کننده های دستی انجام می گیرد. کار الایزا و اشتر شستن چاهک های پلیت های الایزا طی مراحل مختلف تکنیک الایزا به صورت اتوماتیک یا نیمه اتوماتیک است.

اصول کار دستگاه

همان طور که ذکر شد، الایزا و اشتر دستگاهی است که عمل شستشو در تکنیک الایزا را انجام می دهد. هدف تولیدکنندگان این دستگاه، طراحی وسیله ای بوده که ضمن عدم ایجاد اختلال در تکنیک الایزا، زیر مجموعه ای از دستگاه های مورد نیاز این روش باشد که نیاز کاربر را به وسایل اضافی برطرف نماید. به طور کلی دستگاه الایزا و اشتر به وسیله میکروپروسورهای کنترل می شود که مراحل برنامه ریزی و کنترل عمل شستشورا اجرا می نماید. به عنوان مثال کنترل دفعات چرخه شستشو، زمان های مورد نیاز جهت شستشو، به کاربردن و تنظیم فشارها، تنظیم عملکرد مکش و ... تمام موارد یادشده جزئی از سیستم کنترلی دستگاه را تشکیل می دهد. سیستم کاربردی دستگاه از یک مخزن محلول شستشو، یک مخزن پسماند (برای پسماند تولید شده طی فرآیند شستشو)، یک یا چندین پمپ و سرنگ هایی تشکیل شده که محلول شستشورا وارد چاهک های می کنند.

ساختمان دستگاه

◀ سیستم کنترل

به طور کلی الایزا و اشتر توسط سیستم میکروپروسوری کنترل می شود. این سیستم وظیفه برنامه ریزی و کنترل مرحله ای مانند تعداد چرخه های شستشو، زمان مورد انتظار، ریختن و کشیدن مایعات و ... را برعهده دارد.

◀ سیستم توزیع کننده

این مجموعه به طور معمول شامل یک مخزن برای ذخیره

جهت چک فیلترها می توانیم از برنامه ۱۸۶ TEST استفاده کنیم. چنانچه عدد به دست آمده بین ۲ تا ۱۰ باشد عملکرد فیلترها مناسب است در غیر این صورت دستگاه را برای سرویس به شرکت پشتیبان ارسال نمایید. برای انجام تست ابتدا دستگاه را روشن کرده و ۱۵ دقیقه می گذاریم تا گرم شود و سپس بعد از ظاهر شدن کلمه Selection mode، دکمه Test را زده و سپس عدد ۱۸۶ را وارد کرده و Enter می کنیم. بعد از چند ثانیه چهار عدد برای فیلترهای ۱، ۲، ۳، ۴ ظاهر می شود که اگر این اعداد بین ۱۰-۲ باشد نشان دهنده سلامت فیلترها است (در فیلترهای نو این عدد به ۱۰ نزدیکتر است و در فیلترهای کهنه به ۲ نزدیکتر است).

کنترل صحت فتومتری

آزمون صحت فتومتری برای بررسی این مسئله که آیا حداکثر جذب نوری به مقدار مشخص در طول موج خاصی صورت می گیرد یا نه، کاربرد دارد. به عبارت دیگر هدف تعیین تفاوت جذب واقعی با جذب مشاهده شده است. صحت فتومتری به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش فتوالکتریک، نوع و کیفیت منوکروماتور (تک رنگ کننده) بستگی دارد.

برای بررسی صحت فتومتری از محلول رنگزای قلیائی دی کرومات پتاسیم (۴۰ میلی گرم دی کرومات پتاسیم را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده، سپس ۳،۳ گرم پتاس به آن اضافه می کنیم و حجم را به یک لیتر می رسانیم) استفاده می کنیم. با یک سمپلر مستقیماً از معرف فوق به داخل ۵ چاهک ریخته و در Absorption mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ نانومتر و فیلتر افتراقی ۶۳۰ نانومتر جذب آنرا می خوانیم و سپس میانگین آنرا محاسبه می نماییم. عدد به دست آمده باید در محدوده 0.235 ± 0.04 قرار گیرد.

کنترل تکرارپذیری

برای پی بردن به وجود هر گونه اختلال در کثیف بودن حسگرها، لنزهای دستگاه و کالیبراسیون نامناسب یک یا چند کانال دستگاه و یا ناپایداری لامپ دستگاه باید تکرار پذیری دستگاه را کنترل کنیم که در این حالت حداقل ۸ بار خوانش OD یا جذب نوری غلظت های مختلف انجام شود و سپس CV آنرا محاسبه کرده که این مقدار باید کمتر از ۳٪ باشد. برای انجام این کنترل ابتدا یک رقت ۱، ۲ از معرف تهیه شده، برای کنترل خطی بودن تهیه کرده و سپس از معرف اصلی و معرف رقیق شده به ۸ چاهک اضافه کرده و در Absorption mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ نانومتر و فیلتر افتراقی ۶۳۰ نانومتر جذب آنرا می خوانیم و سپس میانگین، انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات یا CV آنرا محاسبه می کنیم.

محلول شستشو، یک سر توزیع کننده و یا یک یا چند پمپ است. قسمت سر توزیع کننده معمولاً دارای ۸ جفت سوزن برای شستشو و مکش همزمان چاهک های یک ردیف است و به نوعی مجموعه سیستم های پخش و کشش در قسمت سر باهم تلاقی دارند. در بعضی از مدل ها، تعداد سوزن ها ۱۲ جفت و در برخی از مدل های پیشرفته فرآیند شستشو را به طور همزمان برای همه چاهک ها انجام می دهند. برخی از الایزا و اشرها دارای قابلیت کار با انواع مختلف محلول های شستشو را دارند و تغییرات محلول را مطابق برنامه ای که اپراتور به آن می دهد انجام می دهند.

سیستم مکش

این سیستم نیاز به یک مکانیزم ایجاد خلاء و همچنین یک مخزن جهت جمع آوری مایعات و پسماند برداشته شده از چاهک ها دارد. خلاء ممکن است توسط پمپ های داخلی یا خارجی تامین شود. مکش توسط یک مجموعه از سوزن ها که بر روی شستشو دهنده یا خشک کننده تعبیه شده است انجام می شود. تعداد سوزن ها برحسب نوع شستشو دهنده می تواند بین یک تا سه عدد تغییر کند، به این معنی که اگر فقط یک سوزن استفاده شود، عمل شستشو و مکش فقط با این سوزن انجام می شود. اما اگر دو سوزن به کار گرفته شود یکی برای توزیع محلول شستشو و دیگری برای تخلیه پسماند استفاده می شود و چنانچه سه سوزن داشته باشد، اولی برای تامین محلول شستشو، دومی برای تخلیه و سومی برای کنترل محلول اضافه ای که در چاهک ها ممکن است موجود باشد، به کار می رود.

سیستم پیشرفته رباتیک

مکانیزم این سیستم به این صورت است که بازوی مکانیکی که سر سیستم توزیع و تخلیه بر روی آن نصب شده است به طور افقی، محلول توزیع کننده را حرکت داده تا به بالای هر چاهک در پلیت الایزا برسد. وقتی به مکان موردنظر رسید، بازوی مکانیکی یک حرکت عمودی به سمت چاهک انجام می دهد و محلول شستشو توزیع و پسماند تخلیه می شود.

کالیبراسیون و کنترل کیفی الایزا و اشرا

عملکرد صحیح الایزا و اشرا، بی شک یکی از عوامل مهم برای انجام درست تکنیک الایزا است براین اساس کالیبراسیون الایزا و اشرا بسیار مهم است. برای این منظور بهتر است موارد زیر بررسی شوند:

موقعیت سوزن ها (سر تغذیه کننده و مکش)

ابتدا لازم است این سوزن ها تمیز و از نظر نداشتن انسداد بررسی شود. سپس موقعیت عمودی و افقی آنها نسبت به چاهک ها به دقت تنظیم و چک شود. دقت شود که تماس سوزن با انتهای چاهک ها سبب ایجاد تداخلات مکانیکی بین نوک سوزن و سطح چاهک در طی عمل مکش می شود.

زمان مکش

تنظیم زمان مکش بسیار اهمیت دارد. زیرا عدم رعایت زمان دقیق مکش سبب بازگشت مجدد محلول متصل شده به دیواره چاهک ها به ته چاهک شده و پاسخ آزمایش را دچار خطا می نماید. همچنین طولانی شدن بیش از حد زمان مکش، موجب خشک شدن مواد پوشاننده شده انتهای چاهک ها شده و خرابی آزمایش را به دنبال خواهد داشت.

حجم توزیع شده

حجم توزیع شده به کلیه چاهک ها می بایست یکسان و به اندازه ماکزیم ظرفیت چاهک باشد لذا بررسی تمیزی و عدم انسداد سوزن های توزیع کننده بسیار بااهمیت است.

خلاء

میزان خلاء مورد نیاز برای سیستم مکش باید بین ۶۰ تا ۷۰ درصد کالیبره شود. در غیر این صورت اگر خلاء به عنوان مثال خیلی قوی باشد سبب خشک شدن چاهک ها شده و فعالیت آنزیم در چاهک ها به مقدار قابل ملاحظه ای کم می شود و به دنبال آن نتایج تست کاملاً تغییر خواهند یافت.

دقت شستشو دهنده

با استفاده از کیت کنترل کیفی می توان دقت الایزا و اشرا را بررسی نمود. توصیه می شود این آزمایش به صورت هفتگی انجام شود. روش آزمایش به این صورت است که ابتدا به چاهک های استریپ میزان ثابتی کنزورگه اضافه می نمایم. سپس ۴ مرتبه استریپ ها را با بافر شستشوی موجود در کیت شسته، سوبسترا و محلول توقف آزمایش را اضافه می کنیم. جذب چاهک ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر می کنیم. مقدار خوانش هر چاهک میبایست کمتر از ۰٫۱ باشد در صورت بالاتر بودن، نشانه عدم کارایی شستشو بوده است.

برخی از منابع

- Maintenance Manual for Laboratory Equipment , 2nd Edition , World Health Organization (book) .
- Medical Laboratory Equipment ; Technical Maintenance and Quality Control Procedures , Seyed behzad Seyedalikhani (book) .
- Quality control in Shiraz Medical Laboratories by Farideh Razi (book).
- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique in quality control of biological products and designing a specific kit for this purpose By "A. EMADI" Razi Vaccine & Serum Research Institute.
- Introduction and Principles of Clinical Laboratory by S.Tahmasebi , R.Ansari
- بررسی تکنیک ها و رفع خطا در الایزا، آزمایشگاه مرجع دانشگاهی قم
- دستورالعمل کالیبراسیون الایزا ریدر سازمان انتقال خون ایران