

کنترل کیفی و کالیبراسیون الیزا ریدر



الیزا ریدر یا خوانشگر الیزا که به اسامی میکروپلیت ریدر و خوانشگر میکروپلیت فتومتریک نیز معروف است یک اسپکتروفتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج تست الیزا طراحی شده است. بر خلاف اسپکتروفتومترهای معمولی که قرائت جذب را در گستره وسیعی از طول موج‌ها تسهیل می‌کنند، الیزا ریدر دارای فیلترها یا گراتینگ‌های انکساری بوده که گستره طول موج‌ها را محدود کرده و معمولاً بین ۴۰۰ تا ۷۵۰ نانومتر عمل می‌کنند. در این دستگاه‌ها ابتدا یک شعاع نوری از نمونه‌ای که دارای قطر بین ۱ تا ۲ میلی‌متر است عبور کرده و سپس یک سیستم آشکار کننده، نور عبوری از نمونه را آشکار و تقویت می‌کند.

کنترل کیفی الیزا ریدر

اخیراً برخی شرکت‌های تولید کننده کیت‌های آزمایشگاهی جهت ارزیابی عملکرد الیزا ریدر، کیت‌های کنترل کیفی معرفی کرده‌اند که با استفاده از آنها می‌توان عملکرد الیزا ریدر، واشر و سیستم سمپلینگ را مورد ارزیابی قرار داد. در این روش پارامترهای مهمی چون خطی بودن (Linearity)، دقت الیزا ریدر (Precision) کارایی الیزا واشر (Efficiency) و صحت سیستم توزیع کننده دستی (سمپلرها) یا دستگاهی (Accuracy) را مورد ارزیابی قرار می‌دهند.

خطی بودن در دستگاه الیزا یک پارامتر مهم در کارایی دستگاه فوق است چرا که کنترل صحت فتومتریک تا حدود زیادی با گذاشتن استانداردهای مختلف در هر ران کاری قابل کنترل است. اما اگر خطی بودن دستگاه دچار اشکال باشد تفاوت‌های فاحشی در جوابها حاصل می‌شود. جهت چک کردن Linearity دستگاه ابتدا باید یک محلول با حداکثر جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا نزدیک به آن (محلول اسید پیکریک پیشنهاد می‌شود) انتخاب شود. آن را در تمام چاهک‌های پلیت بریزید و پلیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت کنید. نتیجه جذب نوری تمام چاهک‌ها در صورت سالم بودن فیلتر بایستی < 3 باشد سپس یکبار دیگر بدون پلیت جذب نوری را قرائت می‌کنیم در چنین شرایطی باید جذب نوری برای تمام چاهک‌ها بین ± 0.1 باشد. در صورتی که نتایج بالا حاصل نشد با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.

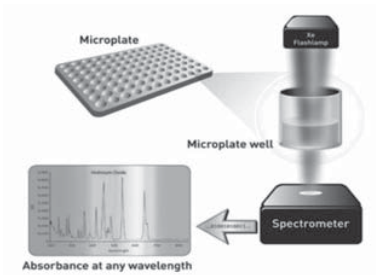
روشی دیگر

در بررسی خطی بودن دستگاه مقدار محتویات داخل wellها حتماً باید یکسان باشد (چون مسیر نوری path length چاهک‌های مختلف باید حتماً یکسان باشد).

ابتدا معرف دی کرومات پتاسیم (۳/۱ گرم دی کرومات پتاسیم را در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، سپس ۳/۳ گرم پتاس به آن اضافه می‌کنیم و حجم را به یک لیتر می‌رسانیم) یک رقت سریال تهیه کرده (به نسبت ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸) و سپس با یک سمپلر ۲۰۰ λ کالیبر شده، ۲۰۰ λ از هر رقت (از رقیق نشده هم به عنوان

کنترل خطی بودن (Linearity)

کنترل خطی بودن دستگاه باید به‌طور ماهانه مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از این آزمون تعیین قابلیت دستگاه در تبعیت از قانون بیر (bear's Law) است که طبق این قانون غلظت محلول نسبت مستقیم با مقدار نور جذب شده دارد. توجه شود که کنترل



محدوده قابل قبول به صورت ذیل محاسبه می شود:

$$0.438 \pm ((0.01 \times 0.438) + 0.01) \rightarrow 0.438 \pm 0.0144$$

در نتیجه محدوده قابل قبول برای رقت ۱/۴، ۰/۴۵۲۴ - ۰/۴۲۳۶ است.

TEST 186

همچنین جهت چک فیلترها می توانیم از برنامه Test # 186 استفاده کنیم چنانچه عدد بدست آمده بین ۱۰-۲ 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 صبر کرده 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 ۰، ۱، ۲، ۳ ظاهر می شود که اگر این اعداد بین ۱۰-۲ باشد نشان دهنده سلامت فیلترها است (در فیلترهای نو این عدد به ۱۰ نزدیک تر است و در فیلترهای کهنه به ۲ نزدیک تر 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، به عبارت دیگر هدف تعیین تفاوت جذب واقعی با جذب مشاهده شده است. صحت فتومتری به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش فتوالکتربیک، نوع و کیفیت منوکروماتور (تک رنگ کننده) بستگی دارد.

رقت ۱/۱) به ۳ چاهک به طور متوالی اضافه می کنیم (از هر رقت در سه چاهک ریخته می شود) سپس در Absorbance Mode، با فیلتر اولیه ۴۵۰ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰ nm جذب آنها خوانده شده و با مقادیر مورد انتظار به دست آمده از میانگین جذب نوری ۳ چاهک اول (که مستقیماً از خوانش OD معرف اصلی به دست می آید) مورد مقایسه قرار می دهیم.

برای بدست آوردن محدوده مورد انتظار (Expected value) در هر رقتی ابتدا میانگین جذب نوری بدست آمده برای محلول اصلی را به عنوان عدد پایه در نظر می گیریم و سپس برای رقت های مختلف ضریب ضریب رقت می کنیم.

برای به دست آوردن محدوده مورد نظر در هر رقت از فرمول ذیل استفاده می کنیم:

$$\text{Expected value} \pm (1\% \text{ of the expected value} + 0.01A)$$

به طور مثال اگر برای رقت ۱/۴ عدد مورد انتظار ۰،۴۳۸ باشد

جدول دفع عیب		
مشکل	علت احتمالی	راه حل
پلیت فوان مقادیر (ا نشان می دهد که بی معنی است)	لامپ کار نمی کند	لامپ را با لامپ دیگری با همان مشخصات اصلی تعویض کنید.
قرائت های پلیت فوان در هر (دیف متفاوت است)	منسور های نوری کیفیت است	منسورها را تمیز کنید
	نیزها یا اجزای سیستم روشایی کیفیت است	نیزهای سیستم روشایی را تمیز کنید
	عدم وجود کالیبراسیون در یک کانال یا بیشتر	کالیبراسیون هر یک از کانالها را بررسی کنید
	تاریخ مصرف معرف به پایان رسیده یا به درستی انتخاب نشده است	بررسی کنید که TMP بی رنگ و آماده سازی صحیح انجام گرفته است
	آلودگی (ناخالصی) در نمونه های دیگر است	بررسی نشانه گذاری، شستوی آزمایش را تکرار کرده و ببینید که چگونه بیست استفاده شده است
	طول موج فیلتر درست نیست	طول موج توصیه شده برای آزمایش را بررسی کنید و در صورت لزوم اصلاح کنید
پلیت فوان مقادیر جذب بالایی (ا نشان می دهد)	شستوی ناکافی یا غیر موثر انجام گرفته است	روش شستوی را بررسی کنید، از یک روش کنترل کیفیت مناسب استفاده کنید
	زمان انکوباسیون یا دمای خیلی زیاد است	زمانها و دماهای انکوباسیون را بررسی کنید
	رقیق سازی نادرست انجام شده است	فرایند رقیق سازی را بررسی کنید.
	از برخی معرفها صرف نظر شده است	بررسی کنید که آزمایش بر اساس روش های تعیین شده انجام گرفته است
	زمان کوتاه انکوباسیون و دمای خیلی کم را بررسی کنید	زمانهای انکوباسیون و دماها را بررسی کنید
	دمای معرفها در محدوده دمای اتاق نیست	پایداری معرف ها در دمای اتاق را بررسی کنید
	پلیت بیش از حد شستوی داده شده است	روند شستوی بر اساس آنچه سازنده دستگاه توصیه کرده بررسی کنید
	طول موج فیلتر نادرست است	طول موج های انتخابی برای آزمایش را بررسی کنید و در صورت نیاز اصلاح کنید
	تاریخ مصرف معرف به پایان رسیده است یا به درستی انتخاب نشده است	معرف های استفاده شده را بررسی کنید و رقیق سازها را آزمایش کنید
پلیت فوان مقادیر جذب بالایی (ا نشان می دهد)	از برخی معرفها صرف نظر شده است	بررسی کنید که آیا آزمایش بر اساس روش تعیین شده انجام شده است
	در پاتین حفره های پلیت خراشهایی مشاهده می شود	یک پلیت جدید تهیه کرده و آزمایش را تکرار کنید
	پلیت انتخابی کیفیت یا نادرست است	نوع پلیت استفاده شده را بررسی کرده و در صورت نیاز پلیت را تعویض و آزمایش را مجدداً تکرار کنید
	پلیت درست قرار داده نشده یا بصورت ناقص در پلیت خوان قرار گرفته است	محل قرار گیری پلیت را بررسی کرده و قرائت را تکرار کنید
	رطوبت یا اثر انگشت در قسمت بیرونی پاتین پلیت وجود دارد	بررسی کنید که پلیت زیر حفره ها تمیز است



آبان، آذر ۹۲
شماره ۹۵،۹۴

پخش
آزمایشگاهی



دستورالعمل‌های تهیه شده بوسیله سازنده آن دستگاه انجام گیرد. برای انجام کالیبراسیون، نیاز به در اختیار داشتن یک مجموعه از فیلترهای خاکستری سوار شده بر روی یک پلیت با همان اندازه هندسی مورد استفاده در تحلیل‌ها است. سازندگان دستگاه‌ها این گونه پلیت‌های کالیبراسیون را برای استفاده در هر طول موج تدارک دیده و در اختیار مصرف کنندگان قرار می‌دهند.

پلیت‌های کالیبراسیون حداقل به ۳ محدوده از دانسیته نوری در دامنه‌های کم، متوسط و زیاد مجهز هستند. برای انجام کالیبراسیون رعایت فرایندهای زیر الزامی است:

- ۱- پلیت کالیبراسیون را بر روی دستگاه قرار دهید
- ۲- یک قرائت کامل به وسیله پلیت کالیبر شده را انجام دهید
بررسی کنید که آیا اختلافی میان مقادیر قرائت شده در هر چاهک از حفره‌ها وجود دارد. در صورت وجود چنین اختلاف، پلیت را ۱۸۰ درجه چرخانده و عمل قرائت را مجدداً تکرار کنید تا دریابید که آیا این اختلاف بر طرف شده است یا خیر؟ به طور کلی اگر نتایج پلیت در دو طول موج مطابق با نتایج مورد انتظار بود معمولاً نیازی به کالیبراسیون اضافی نیست.
- ۳- بررسی کنید که آیا پلیت خوان‌ها نیاز به کالیبراسیون دارند یا خیر.

در صورت نیاز به انجام کالیبراسیون این عمل را مطابق دستورالعمل شرکت سازنده دستگاه ادامه داده و سپس بررسی کنید که خطی بودن پلیت خوان‌ها در همه مراحل بدست آمده است یا خیر؟
۴- در صورتی که این دستگاه از یک پلیت کالیبراسیون برخوردار نیست می‌توان عمل کالیبراسیون را با پر کردن حفره‌های پلیت از یک محلول رنگی، نسبت به قرائت کامل و سریع آن اقدام به عمل آورد و

برای بررسی صحت فتومتریک 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 می‌کنیم و حجم را به یک لیتر می‌رسانیم) استفاده می‌کنیم. با یک سمپلر ۲۰۰ ل (که به دقت کنترل کیفی شده و CV آن زیر ۳ است) مستقیماً از معرف فوق به داخل ۵ چاهک ریخته و در Absorption Mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰ nm جذب آن را می‌خوانیم و سپس میانگین آنرا محاسبه می‌کنیم. عدد به دست آمده باید در محدوده 0.235 ± 0.040 قرار گیرد.

کنترل تکرارپذیری

این آزمون برای پی بردن به وجود هر گونه اختلال در کثیف بودن حس گرها، لنزهای دستگاه و کالیبراسیون نامناسب یک یا چند کانال دستگاه و یا ناپایداری لامپ دستگاه است که در این حالت حداقل ۸ بار خوانش OD در غلظت‌های مختلف انجام شود و سپس CV% (Coefficient Variation) آنرا محاسبه کنید (کمتر از ۳ درصد قابل قبول است).

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 ۲۰۰ ل به ۸ چاهک اضافه کرده و در Absorption Mode با فیلتر اولیه ۴۰۵ nm و فیلتر افتراقی ۶۳۰ nm جذب آن را می‌خوانیم و سپس میانگین، انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات آنرا محاسبه می‌نماییم.

کالیبراسیون الیزا ریدر

کالیبراسیون الیزا ریدر به عنوان یک روند تخصصی است که بایستی به وسیله یک تکنیسین یا مهندس آموزش دیده با استفاده از

سپس با چرخاندن پلیت به میزان ۱۸۰ درجه برای بار دوم عمل قرائت را مجدداً تکرار کرد. در صورت یکسان بودن نتایج هر دو قرائت، میانگین نتایج در هر ردیف را به دست آورید. بدین ترتیب پلیت خوان کالیبره شده است.

۵- بررسی کنید که آیا پلیت خوان ستون به ستون کالیبره است. بدین منظور یک پلیت خالی و تمیز را بر روی دستگاه قرار داده و عمل قرائت را انجام دهید. در صورت عدم وجود هر گونه اختلاف میان مقدار میانگین ستون‌های اول تا آخر پلیت، می‌توان گفت که پلیت خوان کالیبره است.

ذکر این نکته ضروری است که نحوه کالیبره کردن بعضی از دستگاه‌ها از طریق سازندگان دستگاه و در قالب بروشور و جزواتی که به همراه دستگاه به خریدار ارائه می‌شود مشخص شده است.

نگهداری دوره ای الیزا ریدر

دوره : هر سه ماه یکبار

۱- پایداری نور لامپ را بررسی کنید. در این رابطه با استفاده از یک پلیت کالیبره شده، قرائت‌های پیوسته ای را با دوره زمانی ۳۰ دقیقه با استفاده از یک پلیت یکسان انجام دهید. این نتایج قرائت شده را مقایسه کنید. در بین آنها نباید هیچ گونه اختلافی مشاهده شود.

۲- سیستم های حسگر نوری و نور دهنده را تمیز کنید.

۳- کشو پلیت را تمیز کنید.
۴- انطباق محور هر حفره با سیستم‌های انتشار دهنده و آشکار ساز را بررسی کنید.

بروز خطا در قرائت اطلاعات

قرائت‌های غلط به وسیله دستگاه الیزا ریدر می‌تواند ناشی از عوامل زیر باشد :

۱- چاهک میکروپلیت در سمت پائین خش برداشته باشد.
۲- از طول موج غلط استفاده شده باشد.
۳- دستگاه به طور غلط برنامه ریزی شده باشد.

۴- میکرو پروسسور فعال کننده دستگاه در استفاده از طول موج درست دچار خطا باشد.

۵- دستگاه الیزا ریدر در معرض گرد و خاک، لغزش، الکترومغناطیس زیاد، نور مستقیم خورشید، نوسان، رطوبت و حرارت زیاد قرار گرفته باشد.

۶- بررسی منظم دستگاه بر اساس دستورالعمل‌های تولید کننده یا توصیه‌های ارائه شده انجام نگرفته باشد.

۷- تعویض لامپ یا منبع نور به درستی انجام نگرفته باشد.

۸- دستگاه بدون توجه به احتیاط‌های لازم جا به جا شده باشد.

در ادامه جدول زیر به عمده ترین مشکلات احتمالی که ممکن است یک دستگاه الیزا ریدر با آن روبرو شود به همراه علت احتمالی پیدایش و راه حل‌های پیشنهادی اشاره دارد.

منابع

- ۱- کتاب الیزا - پشتاز طب - ۱۳۸۵
- ۲- کتاب مدیریت نگهداری تجهیزات پزشکی - دکتر محمد فلاح تفتی - ۱۳۹۰
- ۳- دستورالعمل کالیبراسیون الیزا ریدر - سازمان انتقال خون ایران

جدول رفع عیب		
مشکل	علت احتمالی	راه حل
شعاع نور متغیر است	پلیت خوان بدون استفاده از دستورالعمل های مورد نیاز چاه جا شده است	تکنیسین سرویس ویژه را بخوانید
	منبع نور عوض شده یا نصب و راه اندازی به درستی انجام نگرفته است	ساختار و تنظیمات را بررسی کنید
شناسای نادرست نمونه انجام گرفته است	پلیت به درستی پارگذاری نشده است	فرایند شناخت نمونه را چک کنید. با تنظیمات جدید قرائت را تکرار کنید
	شناخت نادرست نمونه در پلیت خوان ثبت شده است	تکنیسین سرویس ویژه را بخوانید
پلیت خوان تغییرات غیر منتظره ای را در قرائت های هگالی نوری نشان می دهد	لامپ پلیت خوان ناپایدار است	لامپ را با لامپ دیگری با همان مشخصات اصلی تعویض کنید
پلیت خوان افزایش یا کاهش تدریجی را در ستون به ستون نشان می دهد	کالیبراسیون موتور محرک پلیت نامناسب است.	محرک را طوری کالیبره کنید که در هر مرحله دقیقاً با سیستم نوری هم تراز باشد
قرائت های هگالی نوری در مقیاسه با محدوده ارزیابی نوری بسیار پائین است	عمل قرائت بوسیله طول موجی غیر از طول موج مورد نیاز انجام شده است.	طول موج انتخاب شده در زمان آزمایش را بررسی کنید و در صورت وجود مشکل طول موج را تغییر داده و قرائت را تکرار کنید. بررسی کنید که فیلتر طول موج توصیه شده را انتخاب کرده اید
	همگنی در نمونه وجود ندارد	معرف را قبل از استفاده ترکیب کرده و اجازه دهید که به دمای اتاق برسد.
	روش پیمایش گذاری نادرست است	مطمئن شوید که سرسپارها بین نمونه ها و مایع اضافه داخل آن عوض شده است
تکرار پذیری کم است	پلیت خوان کالیبره نشده است	کالیبراسیون را چک کنید
	قرائت بدون زمان کافی برای گرم شدن دستگاه انجام شده است	صبر کنید تا پلیت خوان به اندازه کافی گرم شده و به دمای عملکرد برسد
	تاریخ مصرف معرف منقضی شده است	تاریخ انقضای معرف ها را بررسی کنید
	شستجوی غیر کافی و موثر است	معرف را از واشر خالی کنید

