



عنوان دوره آموزشی

## نکات چالش برانگیز تست های الیزا و خطاهای رایج آن

3	..... طبقه بندی الایزا	•
7	..... کنترل کیفی و چگونگی ارزیابی تست های الایزا	•
11	..... فاکتور های موثر بر روی دقت	•
12	..... خطاهای مربوط به مواد اولیه و معرفیها	•
14	..... (sensitivity) حساسیت	•
16	..... عوامل موثر در حساسیت یک روش	•
18	..... (Accuracy) صحت	•
21	..... (Recovery) آزمایشات بازیافت	•
22	..... (Parallelism) تست موازی بودن یا (Linearity) خطی بودن	•
24	..... شناسایی وجود تداخل	•
28	..... تاثیرات نمونه	•
33	..... (Cross-Reactivity) یا واکنش های متقاطع (Specificity) ویژگی	•
35	..... ارزیابی کیت های کیفی	•
35	..... نمونه های به کار رفته برای مطالعه عملی آزمایش	•
38	..... D-SN و D-SP تعیین تعداد سرم مورد نیاز برای محاسبه	•
39	..... استاندارد طلایی طبقه بندی افراد غیر آلوده	•
45	..... تستهای کنترل کیفی الایزا توسط مصرف کننده	•
46	..... (Westgard) آنالیز وستگارد	•
49	..... نکات عملی و رفع مشکل در تست های الایزا	•
56	..... راهنمای حل مشکلات در الایزا	•
85	..... خلاصه	•
88	..... منابع:	•

## طبقه بندی الایزا

سیستم الایزا بر اساس شیوه شناسی تشخیصی به چند گروه تقسیم می شود که عبارتند از:

### 1- الایزای مستقیم (Direct ELISA)

در این روش روش آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه که باید تشخیص داده شود بطور مستقیم بر سطح فاز جامد کوت می شود و سپس آنتی بادی یا آنتی ژن مکمل آن نشاندار شده است به سیستم اضافه می شود. در صورت وجود آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر در نمونه سیگنال مناسب ایجاد می شود. این روش مشابه ایمنوفلورسانس مستقیم است اما کاربرد چندانی در کیت های تشخیصی ندارد و بیشتر در کارهای تحقیقاتی استفاده می شود.

### 2- الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA)

این روش برای تعیین آنتی بادی اختصاصی و یا تیتراسیون آنتی بادی در نمونه های سرم مورد استفاده قرار می گیرد. اساس آزمایش بدین نحو است که معمولا سرم رقیق شده به آنتی ژن های کوت شده در فاز جامد ( میکروول یا چاهک ) اضافه می شود. آنتی ژن کوت شده آنتی ژن اختصاصی مربوط به آنتی بادی است که قرار است در نمونه ردیابی شود، پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود. برحسب اینکه چه کلاسی از آنتی بادی برای ردیابی اهمیت دارد نوع آنتی هیومن مورد استفاده نیز متفاوت است مثلا برای ردیابی آنتی بادی کلاس IgG از آنتی هیومن IgG و برای ردیابی کلاس IgA از آنتی هیومن IgA استفاده می شود.

اختصاصیت سنجش مستقیما توسط آنتی ژن کوت شده در فاز جامد تعیین می شود که ممکن است کاملا خالص و اختصاصی باشد و یا نسبتا خام و غیر اختصاصی.

سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی می تواند در یک بافر برای جلوگیری از جذب غیر اختصاصی پروتئین ها و جلوگیری از اشغال نقاط اتصال آنتی ژن رقیق شود. به چنین بافری محلول رقیق کننده نمونه (Sample diluent) گفته می شود. حساست و ویژگی چنین روش هایی می تواند با به کارگیری روش Antibody capture با کاهش تداخل اثر آنتی بادی غیر اختصاصی بهتر شود.

بهترین مثال ها در مورد این روش تعیین آنتی بادی بر علیه توکسو پلاسما، روبلا، ویروس سیتومگال و هلیکوباکتر پیلوری از کلاس های IgG, IgA, IgM در سرم می باشد. البته امروزه برای تعیین IgM بر علیه این عوامل عموماً از روش Capture استفاده می شود، در روش Capture آنتی بادی های موجود در نمونه از کلاس IgM بر روی چاهک های کوت شده با آنتی هیومن IgM جذب شده و سپس برای تشخیص، از آنتی ژن اختصاصی مربوطه که توسط آنزیم نشاندار شده است و یا آنتی بادی نشاندار ضد آن بصورت مزدوج استفاده می شود.

### 3- الایزای ساندویچ

روش ساندویچ الایزا خود به دو دسته تقسیم می شود:

#### الف) روش Ag Capture یا Ab Sandwich

در این روش یک آنتی ژن در بین دو آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد، این روش شایعترین روش الایزا محسوب می شود، در این روش از یک آنتی بادی برای به دام انداختن آنتی ژن بر روی چاهکهای الایزا استفاده می شود و آنتی بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده است به عنوان شناساگر عمل می کند.

قابل ذکر است که در این روش آنتی ژن باید حداقل دارای دو ناحیه آنتی ژنیک متفاوت باشد تا قادر به اتصال به هر دو آنتی بادی باشد، مثال های بارز این روش اندازه گیری PSA,FSH,LH,TSH,HCG و... است.

#### ب) روش Antibody Capture

#### Ag Sandwich or Direct Capture -1

این روش برای تعیین سنجش آنتی بادی مورد استفاده قرار می گیرد بدین صورت که از یک آنتی ژن کوت شده بر روی فاز جامد برای به دام انداختن آنتی بادی اختصاصی آن استفاده می شود. همان آنتی بادی از طریق بازوی دیگر خود (Fab) پذیرای همان آنتی ژن اما به صورت نشاندار می باشد، در نتیجه آنتی بادی اختصاصی در بین دو آنتی ژن ساندویچ می گردد در این روش تعیین آنتی بادی توتال از هرکلاس ایمونوگلوبولین میسر است و یکی از اختصاصی ترین و حساس ترین روشها برای تشخیص آنتی بادی در نمونه است. مثال بارز این روش کیت اندازه گیری آنتی بادی بر علیه پلاسمودیوم ویواکس و ترپونماپالیدوم و HBs Ab می باشد

## Indirect Ag Sandwich or Indirect Ab Sandwich -2

در این روش پس از به دام انداختن آنتی بادی توسط آنتی هیومن گلوبولین کوت شده در کف چاهکها با اضافه کردن آنتی ژن اختصاصی و تشکیل کمپلکس، از یک آنتی بادی اختصاصی نشاندار بر علیه آنتی ژن به عنوان سیستم شناساگر استفاده می شود.

## 4-الایزای رقابتی یا مهارى

در روشهای رقابتی اساس سنجش بر رقابت دو آنتی ژن یا دو آنتی بادی ( که یکی از آن دو نشاندار است) برای اتصال به لیگاند با مقدار محدود استوار است. اگر هر دو آنالیت نشاندار و غیر نشاندار با هم به سیستم اضافه شوند روش را رقابتی می نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهارى یا بلاکینگ می نامند. در روش مهارى ممکن است در بین دو مرحله و قبل از اضافه نمودن آنالیت بعدی شستشو انجام شود یا انجام نشود، مثال بارز روشهای رقابتی و مهارى سنجش T3 و T4 می باشد. انواع روش های رقابتی عبارتند از:

### الف) روش رقابتی یا مهارى برای آنتی ژن:

اساس این روش بر رقابت بین آنتی ژن نشاندار و آنتی ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی بادی اختصاصی کوت شده در چاهک استوار است. در این روش مقدار آنتی بادی کوت

شده باید محدود باشد و ملکول سیگنال دهنده همان آنتی ژن نشاندار است، اساس RIA و EIA کلاسیک به همین روش استوار است.

در این روش منحنی پاسخ - دوز به صورت معکوس خواهد بود، بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور مقادیر زیادی از آنالیت غیر نشاندار موجود در نمونه به مقدار کمتری به آنتی بادی متصل می شود و در نتیجه سیگنال کمتری هم بوجود خواهد آمد.

محدوده تعیین آنالیت با این روش ممکن است بوسیله استفاده از مولکول نشاندار با فعالیت اختصاصی زیاد تقویت شود اما حداقل مقدار قابل تشخیص (کمترین مقدار آنالیت که قابل تشخیص خواهد بود) توسط تمایل آنتی بادی مورد استفاده تعیین می شود. با این وجود غلظتهای خیلی کم از هاپتن ها عموماً توسط همین روش قابل تعیین اند و حساس ترین روشی است که می تواند مقدار کمتر از  $\text{fmol}$  را هم تشخیص دهد.

در برخی از موارد نشاندار کردن روی خصوصیات هاپتن اثر می گذارد در نتیجه در روش رقابتی برای تعیین آنتی ژن از یک آنتی بادی نشاندار استفاده می شود، در این نوع از سنجش ها این مطلب ضروری است که فاز جامد توسط آنتی ژن با مقدار کم و ثابت پوشیده می شود، در این روش آنالیت موجود در نمونه با آنالیت کوت شده در چاهک برای اتصال به آنتی بادی نشاندار رقابت می کند. در اینجا هم منحنی استاندارد معکوس است، از این روش بیشتر برای سنجش ایمنی به روش کمی لومینسانس استفاده می شود.

### ب) روش رقابتی برای آنتی بادی:

در این روش رقابت بین دو آنتی بادی یکی در نمونه به صورت غیر نشاندار و یکی به صورت نشاندار شده با آنزیم برای اتصال به یک آنتی ژن کوت شده در چاهک صورت می پذیرد، بدیهی است که هر چه مقدار آنتی بادی نمونه بیشتر باشد آنتی بادی نشاندار کمتری به چاهک ها متصل شده و سیگنال نیز کمتر خواهد بود و در نتیجه منحنی استاندارد نیز معکوس می باشد، شاخص ترین مثال برای این روش اندازه گیری آنتی بادی بر ضد  $\text{HBc}$  (HBc Ab) است.

## کنترل کیفی و چگونگی ارزیابی تست های الایزا

روشهای سنجش ایمنی در دو مرحله مورد ارزیابی می گیرند. نخستین بخش آن در شرکت تولید کننده سپری می شود. این مرحله که در پی ساخته شدن یک کیت یا سیستم سنجش ایمنی شکل می گیرد، در اصل به ارزیابی تکنیکی عملکرد کیت یا شاخص های اجرایی آن خواهد پرداخت. دومین بخش است ارزیابی کیتها بخشی است که باید هم در شرکت تولید کننده و هم در آزمایشگاههای تشخیص طبی یا مصرف کننده انجام گیرد. این بخش از کار، در اصل در برگیرنده مراحل تضمین کیفیت و کنترل کیفیت کیتهای الایزا می باشد.

### ارزیابی شاخص های اجرایی کیت های الایزا توسط تولید کننده

این بخش از ارزیابی کیتها بخشی است که در شرکت سازنده باید به آن توجه شود. این نوع از ارزیابیها نیازمند پروتکل ها و معیارهای مختلفی است که کیتها را کاملاً مورد ارزیابی قرار دهد و همچنین بسته به چارچوب تعریف شده سنجش ایمنی، روش ارزیابی آن نیز متفاوت می باشد. این مرحله از کار در دو بخش های کمی و کیفی طبقه بندی می شود که ارزیابی هر یک از آنها دارای معیارهای خاص می باشد.

## ارزیابی کیت‌های کمی

در کلیه شرایط معیارهای مختلفی برای هر کیت مورد بررسی قرار می‌گیرند. این معیارها به ترتیب اهمیت عبارتند از دقت (Precision)، حساسیت (Sensitivity)، صحت (Accuracy) و ویژگی (Specificity) همچنین معیارهای دیگری همچون Robustness یا قدرت تحمل یا انعطاف پذیری کیت در شرایط مختلف آزمایش (همچون تغییر دما، زمان و غیره) و Ruggedness یا قدرت تحمل کیت در مناطق مختلف، دستگاه‌ها و پرسنل مختلف را می‌توان به این معیارها افزود.

### دقت (Precision)

نخستین معیار ارزیابی یک کیت و عبارتی مهمترین شاخص اجرایی کیت دقت (Precision) آن می‌باشد. واژه‌های دیگری که برای این معیار به کار می‌رود عبارتند از تکرار پذیری (Repeatability) و یا تجدید پذیری (Reproductibility) که اشاره به قدرت تکرارپذیری نتایج آزمایش بدست آمده از یک نمونه دارد. در نقطه مقابل این معیار، عدم دقت (Imprecision) قرار می‌گیرد که هرچه مقدار دقت بالاتر باشد عدم دقت پایین خواهد بود. اولین قدم برای ارزیابی یک کیت باید از دقت آن یا به عبارتی وجود جواب‌های یکسان توسط کیت مطمئن شد تا بتوان معیارهای بعدی را مورد بررسی قرار داد.

### چگونه معیار دقت در یک کیت سنجیده می‌شود؟

1- به منظور تعیین معیار دقت در یک کیت بر اساس استانداردهای NCCLS باید سه نوع مخلوط سرم (Pool Serum) در حدود پایین، وسط و بالای آنالیت مورد نظر را تهیه نمود. جذب نوری تعیین شده برای حد پایین آنالیت حدود 5-2/5 برابر (20%BO) حد وسط 20-5 برابر (50%BO) و برای مقادیر بالا باید بیشتر از 20 برابر مقدار جذب نوری زمینه (80%BO) باشد.

پس از تهیه این انواع مخلوط سرم باید بر روی هر یک از آن‌ها آزمایشات متعدد انجام داد (توجه به توضیحات ذیل) و نسبت به محاسبه میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات (Coefficient of variation) اقدام نمود. مقدار در اصل بیانگر دقت آزمایش می باشد بطوریکه بعنوان مثال هر چه CV پایین تر باشد آزمایش از دقت بیشتری برخوردار است. همانطور که در بالا ذکر شد باید بر روی هر یک از انواع مخلوط های سرمی یکسری آزمایش صورت گیرد تا نتایج آماری ذکر شده از آنها به دست آید. بر همین اساس می توان آزمایشات دقت را به انواع مختلفی تقسیم نمود.

### دقت درون سنجی (Intra-assay یا Within-Run Precision)

منظور از این نوع دقت درون سنجی در تکرار پذیری است که در یک RUN یا یک بار پروسه آزمایش بر روی حداقل 20 تکرار از هر یک از انواع مخلوط سرمی بدست خواهد آمد. در این نوع از دقت نمونه ها نباید به صورت پشت سر هم چیده شوند و همچنین مقادیر خارج از محدوده نیز باید کاملاً مورد بررسی قرار گیرند.

### دقت میان سنجی (Inner-assay یا Between-Run Precision)

منظور از دقت میان سنجی دقتی است که حاصل سری آزمایشات مختلف (Run to Run) روی هر یک از انواع مخلوط سرمی در یک روز و یا در روزهای مختلف می باشد (Day to Day).

در بررسی این نوع دقت مابین دو سری آزمایش در یک روز باید حداقل دو ساعت باشد، همچنین مقدار تکراری که برای هر یک از مخلوط سرم ها در هر سری آزمایش باید در نظر گرفت 4 بار بود و کل روز هایی که باید آزمایشات را برای اصول نتیجه صحیح مورد بررسی قرار داد حداقل 5 روز و حداکثر تا 20 روز باشد.

بدلیل افزوده شدن تعداد متغیرها در هر یک از سری آزمایشات و همچنین با توجه به انجام آزمایش در روزهای مختلف معمولاً ضریب تغییرات (CV%) این نوع دقت بالاتر از مقدار

ضریب تغییر را به دقت نوع درون سنجی می باشد که البته این مسئله لزوم است ثابت نمی باشد.

### دقت بین سری (Between lot Precision)

دقت در اصل برآورده نمودن نتایج مختلف به دست آمده از سری ساخت های مختلف تولید شده می باشد. برای به دست آوردن این نوع دقت بر اساس استانداردهای NCCLS باید حداقل سه سری ساخته شده از یک کیت مورد آزمایش قرار گیرد. از هر یک از این سه سری باید سه نمونه برداشته شده و بر روی هر نوع این سه بار آزمایش صورت گیرد.

### دقت بین روش، گروه و آزمایشگاه ها

(Within Method, Within Method Group and all Laboratory Precision)

این نوع از دقت در اصل توسط سیستمهای کنترل کیفیت خارج از شرکت سازنده صورت گرفته که در آن اقدام به نمونه برداری از کیتهای شرکت سازنده می نمایند و آنها را با روشهای مختلف مورد بررسی قرار می دهند.

### دامنه کاری دقت (Precision Profile)

منظور از تعیین محدوده کاری دقت برای یک آنالیت در اثر مشخص کردن عملکرد آن در دامنه وسیعی از غلظتهای آن آنالیت است.

تعیین این نوع دقت به خصوص در روش های سنجش ایمنی که در مقادیر کم و یا مقادیر بالا از دقت کمی برخوردار می باشد بسیار مفید می باشد.

برای تهیه دامنه کاری دقت اقدام به ترسیم منحنی CV بر علیه آنالیت می نمایند. در روشهای رقابتی دامنه کاری دقت به صورت یک منحنی U شکل خواهد بود ولی در روشهای ایمونومتریک به صورت منحنی صاف در می آید. در مقادیر بسیار کم یا بعبارت دیگر در جائیکه حد قابل تشخیص (Detection limit) یک آنالیت تعریف می شود حساسیت، دقت آزمایش را تحت تاثیر قرار داده و این مسئله را در حدود بالای منحنی نیز می توان مشاهده نمود.

از سوی دیگر ر به منظور به دست آوردن CV و رسم منحنی مربوط به دامنه کاری دقت باید هر یک از استانداردها را به تعداد 10-20 بار مورد آزمایش قرار داد. هرچه مقدار تکرار بیشتر باشد دقت صحیح تری به دست خواهد آمد. از نظر تعداد استاندارد مورد استفاده برای این آزمایش باید تا جای ممکن از تعداد استانداردهای بیشتری بهره برد و حداقل تعداد سه استاندارد حد پایین (20% B0) میانی (50% B0) و بالا (80% B0) را در آزمایش قرار داد. (B0 جذب نوری استاندارد صفر)

از نکات مهم دیگر در تعیین مقدار استانداردها، دامنه آنالیت مورد نظر می باشد که باید دامنه‌ای را انتخاب نمود که از نظر بالینی نیز دارای اهمیت باشد. با تهیه دامنه کاری دقت برای یک آزمایش سنجش ایمنی می‌توان به دامنه کاری آنالیت رسید و این دامنه در اصل دامنه ای از آنالیت می‌باشد که در آن سنجش آنالیت از دقت کافی برخوردار می‌باشد.

### فاکتور های موثر بر روی دقت

از آنجائیکه دقت مهمترین فاکتور تکنیکی عملکرد یک کیت می باشد، مشخص نمودن عوامل و منابع عدم دقت در آزمایشات می تواند بسیار مهم باشد. این عوامل به تنهایی یا به صورت ترکیب با یکدیگر می‌توانند دقت آزمایش را کاهش دهند (جدول ۱-۳).

جدول ۱-۳. عواملی که به تنهایی یا به صورت ترکیب با یکدیگر می‌توانند دقت آزمایش را کاهش دهند:

---

-مواد و معرفها

آنتی بادی یا آنتی ژن، آنتی بادی یا هاپتن کونزوگه شده، کالیبراتور، رقیق کننده، محلول شستشو، سوبسترا

-خطاهای مربوط به پی پت

صحت، دقت، کالیبراسیون، تنظیم، تجدید پذیری

-واکنش اتصال

زمان افزودن معرفها، زمان و دمای انکوباسیون، تعادلی یا غیر تعادلی بودن روش، اثر هوک در غلظت‌های بالا

-واکنش رنگ و مرحله شناسایی

زمان، دما، کم شدن رنگ، پایداری سوبسترا و محصول رنگی، خطای اسپکتروفوتومتری

## -عوامل مداخله‌گر (Interfering substances)

عواملی که باعث افزایش یا کاهش میزان رنگ می‌شوند (بیلیروبین، داروها) عواملی که همچون آنزیمها رفتار می‌نمایند (مثل هموگلوبین، آلکالین فسفاتاز درونی)، مهارکننده‌های فعالیت آنزیمها (مثل فلزات)، عوامل پراکنده کننده نور (چربیها و ماکرومولکولها)

-پردازش داده‌ها

## خطاهای مربوط به مواد اولیه و معرفها

اولین منبع خطا در دقت یک آزمایش به معرفها و مواد اولیه بکار رفته در روش بستگی دارد. در این دسته بیشترین منبع خطا نیز به استانداردها برمی‌گردد. از سوی دیگر در مرحله دوم عواملی که بر روی واکنش آنتی ژن و آنتی بادی موثرند می‌توانند در بروز خطا نقش داشته باشند. این عوامل عبارتند از غلظت آنتی‌بادی، حرارت و زمان، pH، غلظت یونی مخلوط واکنش و تغییر در دانسیته آنتی بادی کوت شده چنانچه از آنتی‌بادی برای آماده نمودن بستر جامد استفاده شده باشد.

## خطاهای ناشی از مرحله جداسازی

پس از مرحله واکنش آنتی ژن و آنتی بادی در یک تست سنجش ایمنی مرحله جداسازی و یا بعبارت دیگر خارج نمودن آنتی ژن یا آنتی‌بادیهای باند نشده آزاد در محیط از انواع باند شده مطرح می‌شود. این مرحله که در اصل با شستشو صورت می‌گیرد، یکی از مراحل کلیدی در دقت آزمایشات می‌باشد. خارج نکردن ناکافی محلول شستشو، چسبیدن مایع به جداره چاهکها و موارد دیگر همگی عوامل کاهش میزان دقت در آزمایش می‌باشند.

یکی از مواردیکه در این مرحله عامل کاهش دقت در آزمایشات می‌باشد دستگاههای اتوماتیک شستشوی پلیت می‌باشند. این دستگاهها چنانچه به خوبی نگهداری نشده باشند و یا مرحله مکش آنها به گونه‌ای باشد که کاملاً چاهکها را خالی نکنند، باعث ایجاد خطا در آزمایش خواهند شد.

## خطاهای ناشی از عدم تعادل

یکی از منابع بالقوه در ایجاد خطا مسئله عدم هماهنگی زمان و دمای لازم برای کلیه چاهکها می باشد .

بعنوان مثال زمانی که سرم در چاهکها انکوبه گردید، در موقع شستشو چاهک های ردیف اول که زودتر سرم در آنها قرار گرفته مدت زمان بیشتری نسبت به چاهکهای ردیف آخر پلیت سپری نموده اند. حال چنانچه در موقع شستشو از چاهکهای آخر عمل شستشو شروع شود، مدت زمان کافی به چاهکهای آخر برای واکنش، داده نشده و این در حالی است که چاهکهای ردیف اول بیش از حد لازم انکوبه شده اند. همین مسئله در رابطه با دما نیز مطرح می باشد. بعنوان مثال چنانچه پلیت درون یک انکوباتور بدون تهویه مناسب قرار گیرد و یا یک پلیت در مجاور نور آفتاب قرار گرفته باشد و یا معرفهای سرد و بدون گرم شدن کافی به پلیت افزوده شوند قسمتهایی که نور و یا گرما به آنها رسیده یا معرف گرم تر آنها افزوده شده، گرم تر از بقیه چاهکها خواهند شد که این مسئله منجر به عدم تعادل دمایی پلیت و جوابهای مختلف در آن آن بخصوص در حاشیه های آن خواهد شد. این پدیده که مشهور به پدیده حاشیه ای یا (Edge Effect) می باشد یکی از منابع مهم حتی یا عدم دقت در کیت های الایزا می باشد.

## خطاهای ناشی از استانداردها

تهیه استانداردها یکی از منابع مهم ایجاد خطا در روشهای سنجش ایمنی تلقی می گردد. برای تهیه هر استاندارد باید آن را به صورت مجزا از سایر استانداردها و مستقیماً از استاندارد اصلی تهیه نمود.

در هنگام تهیه رقت برای ساخت استانداردها از پی پت نمودن به بدنه لوله ها نیز باید خودداری نمود تا از خطاهای ناشی از آن جلوگیری بعمل آید.

از آنجا که هر مرحله نمونه برداری و تقسیم نمودن خود دارای خطاهای واقعی و ذاتی می باشد، تهیه استانداردها باید تا جای ممکن بصورت حجم های زیاد و یک دفعه صورت گیرد. استانداردهای لیوفیلیزه علاوه بر مشکلات فوق دارای دو منبع خطای دیگر نیز می باشند:

الف) تقسیم اولیه آنها ب) خطاهایی که موقع آماده نمودن مجدد آنها (Reconstitution) قبل از استفاده می‌تواند رخ دهد. استانداردهایی که ماهیت آنها پروتئینی است را باید در محلولهای حاوی BSA یا سرم تهیه نمود از دنا توره شدن آن‌ها در محلولهای بسیار رقیق ممانعت بعمل آید.

### سایر خطاها

خطاهای دیگری نیز می‌توانند باعث عدم دقت در آزمایشات گردند. این خطاها عبارتند از پی‌پت نمودن نادرست، خطا در زمان افزودن مواد و بالاخره خطاهای ناشی از پرسنل. علاوه بر این، یکسری از خطاها به آنزیم‌هایی که برای نشاندار کردن به کار رفته‌اند برمی‌گردد. این خطاها بخصوص خود را در مرحله خواندن واکنش نشان می‌دهند. عواملی همچون زمان و دمای انکوباسیون، پایداری رنگ نهایی و کیفیت دستگاه خوانشگر از جمله عواملی هستند که تغییر در هر یک می‌تواند منجر به بروز خطا گردد.

### حساسیت (sensitivity)

حساسیت در اصل بیانگر کمترین مقدار آنالیت قابل شناسایی در آزمایش می‌باشد. امروزه دو نوع نگرش یا مدل برای تعیین میزان حساسیت در روشهای سنجش ایمنی مطرح می‌باشد.

#### 1. Yalow and Berson model

در این مدل برای تعریف و حساسیت از کمترین میزان قابل اندازه گیری، در تغییر شیب منحنی پاسخ- دوز، استفاده می‌نمایند.

#### 2. Ekin's Model

این مدل کاملاً برخلاف مدل اول بوده و در آن حساسیت کمترین مقدار آنالیت است که به صورت کاملاً واضح و قابل تفکیک از استاندارد صفر باشد.

یکی از اصطلاحاتی که برای بیان حساسیت در کیت‌های آزمایشگاهی به کار می‌رود حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری ( The least detectable dose ) می‌باشد که در اصل اشاره به کمترین مقدار قابل اندازه‌گیری یک آنالیت دارد.

### چگونه The least detectable dose (LDD) را تعیین می‌نماییم؟

برای تعیین LDD ، استاندارد صفر را به تعداد 10-20 بار مورد آزمایش قرار داده و میانگین و انحراف معیار آنرا مشخص می‌نماییم. با احتساب  $2SD$  بالاتر ( برای آزمایشات ایمونومتریک) و یا  $2SD$  پایین‌تر از حد میانگین (برای آزمایشات رقابتی) مقدار LDD با ضریب اطمینان ۹۵٪ بدست خواهد آمد.

این حد بیانگر حساسیت آنالیتیکی روش نیز می‌باشد. با دانستن میزان دقت واقعی یک آزمایش سنجش ایمنی می‌توان به ارزیابی میزان اختلاف غلظت در یک حد با حد دیگر نیز پرداخت. این اختلاف غلظت‌ها را اصطلاحاً کمترین میزان غلظت قابل تشخیص می‌نامند **Minimal Distinguishable Difference in Concentration (MDDC)** که آنرا تحت عنوان مقدار تفکیک یا Resolution نیز می‌نامند.

یکی از مشکلاتی که در ارتباط با تعیین حساسیت یک کیت بخصوص با استفاده از LDD وجود دارد عدم تکرار پذیری نتایج LDD در روزهای مختلف می‌باشد. از همین رو پیشنهاد می‌شود که تست حساسیت را در روزهای مختلف انجام داده و استاندارد صفر را نیز به عنوان نمونه مجهول در لابلای تست‌های دیگر آزمایش نمود.

راه دیگری که برای تعیین حساسیت وجود دارد، رقیق نمودن نمونه سرم بیمار با رقیق‌کننده کیت تا پایین‌ترین میزان قابل تشخیص می‌باشد. در این آزمایش حساسیت با استفاده از آزمایشی به نام بازیافت (Recovery) که در ادامه درباره آن بحث خواهد شد مورد بررسی قرار خواهد گرفت. در این آزمایش تا وقتی که میزان بازیافت 100٪ باشد حساسیت وجود داشته و زمانی که بازیافت از 100٪ حد پیش‌بینی شده فاصله گرفت، حساسیت کیت کاهش پیدا می‌کند.

از نکات دیگر در ارتباط با مسئله حساسیت بیان واحد برای آن می‌باشد. معمولاً واحد بیان شده به صورت غلظت آنالیت مورد نظر می‌باشد. در بحث حساسیت باید دو نکته را مد نظر قرار داد: اولاً حساسیت به شیب منحنی استاندارد بستگی داشته و ثانیاً دقت تاثیر مستقیمی بر حساسیت یک روش دارد. بطوری که در دو آزمایش با شیب منحنی یکسان، آنکه دقت بالاتری دارند از حساسیت بیشتری نیز برخوردار می‌باشد و یا در دو آزمایش با یک میزان دقت، آنکه شیب منحنی استاندارد تندتر باشد از حساسیت بالاتری نیز برخوردار می‌باشد.

دانستن فاکتورهایی که بر حساسیت یک آزمایش تاثیر می‌گذارند نیز در تنظیم بهتر آزمایش و همچنین رفع عیب کیت نقش مهمی ایفا خواهد نمود. عواملی همچون افزایش زمان، دما و مخلوط نمودن بهتره مواد همگی می‌توانند باعث افزایش اتصال آنتی ژن و آنتی بادی، دقت آزمایش و در نهایت حساسیت آن گردند. کیت‌هایی که مراحل آن بصورت متوالی صورت می‌پذیرند (دو مرحله ای) نسبت به کیت‌هایی که طراحی آنها به صورت افزودن همزمان نمونه و کنژوگه آنزیمی می‌باشد (یک مرحله ای) از حساسیت سنجش بالاتری برخوردار می‌باشند. همچنین جهت بهبود منحنی استاندارد می‌توان از استانداردهای حد پایین استفاده نمود که باعث بهبود منحنی استاندارد می‌شوند.

## عوامل موثر در حساسیت یک روش

### الف) عوامل موثر در بهبود حساسیت

1. کاهش در میزان ماده ردیاب یا به عبارت دیگر ماده نشاندار شده در روشهای رقابتی: این حد یک مقدار مشخص می‌باشد که پایین تر از آن منجر به تغییرات عمده در حساسیت کیت خواهد شد.
2. کاهش در میزان آنتی بادی در واکنشهای رقابتی: رقیق کردن باعث پایین قرار گرفتن و انحراف منحنی به سمت چپ خواهد شد ( شکل ۲-۳). با اینحال برای افزایش حساسیت با استفاده از این مسئله، باید دقت آزمایش را نیز مدنظر قرار داد.
3. افزایش زمان انکوباسیون برای سنجش‌هایی که در زمان مشخصی به تعادل می‌رسند: این مسئله بخصوص بر روی قسمت پایین منحنی بیشتر از قسمت‌های بالای منحنی تاثیر خواهد گذاشت. از سوی دیگر این نکته را نیز باید در نظر داشت که در مراحل

اولیه طراحی یک روش سنجش ایمنی باید در جهت کاهش زمان انکوباسیون صورت گیرد.

4. طراحی روش به شکل متوالی اشباعی ( Sequential saturation assay designs ) :

در این سری از آزمایشات، در مرحله اول نمونه با آنتی بادی مجاور می‌گردد ( قبل از افزوده شدن ماده نشاندار) این مسئله سبب بهبود در شیب منحنی استاندارد و در نهایت حساسیت روش خواهد شد ولی از معایب این سری از روشها می‌توان به افزایش تعداد مراحل آزمایش، کاهش دقت آزمایش و حساسیت فوق العاده آنها نسبت به زمان اشاره نمود.

5. افزایش میزان نمونه: با افزایش مقدار نمونه در آزمایشات اگرچه حساسیت افزایش خواهد یافت ولی اثر ماتریکس (در ادامه بحث خواهد آمد) و تغییرات حجمی نیز افزایش خواهند یافت. بطور کلی چنانچه غلظت کل نمونه در مجموعه معرفها و مواد کمتر از 15٪ باشد، تاثیرات غیر اختصاصی (همچون اثرات ماتریکس و تغییرات حجمی) به حداقل خواهند رسید.

6. افزایش دمای انکوباسیون: این امر سبب افزایش سرعت واکنش خواهد شد ولی همانطور که قبلاً نیز ذکر شد پدیده حاشیه ای (Edge effect) باید مورد توجه قرار گیرد.

7. افزایش دقت: با بهبود دقت سنجش، حساسیت آزمایش نیز بهبود خواهد یافت.

8. استخراج و تغلیظ آنالیت موجود در نمونه: یکی از عوامل موثر در حساسیت، غلظت آنالیت مورد نظر در نمونه می‌باشد. از همین رو استخراج و تغلیظ آنالیت می‌تواند در حساسیت روش رل مهمی ایفا نماید.

9. در آزمایشات ایمونومتری که ساندویچی، افزایش غلظت آنتی بادی، زمان و یا مقدار نمونه در حساسیت روش نقش مهمی را ایفاء می‌نمایند.

#### ب) عوامل کاهش دهنده میزان حساسیت

1. افزایش مقدار آنتی بادی و ماده نشاندار (در روش های رقابتی)

2. کاهش میزان حجم نمونه (در روش های ایمونومتریک)

3. استفاده از آنتی بادی های دارای میزان تمایل پایین

## صحت (Accuracy)

صحت در اصل توانایی یک روش برای تعیین مقدار یک آنالیت می‌باشد. این واژه در واقع به میزان نزدیک بودن میانگین آنالیت اندازه‌گیری شده به مقدار واقعی آنالیت در نمونه اشاره می‌نماید. همانند دقت کلمه‌ای در مقابل صحت قرار می‌گیرد عدم صحت (Inaccuracy) یا سوگرایی (Bias) می‌باشد.

سوگرایی به اختلاف بین مقدار اندازه‌گیری شده با مقدار واقعی اطلاق شده و در اصل می‌تواند بیانگر خطای سیستماتیک ذاتی یک روش باشد. سوگرایی می‌تواند هم به صورت مثبت و هم به شکل منفی اتفاق بیافتد.

از سوی دیگر می‌توان خطاهای سیستماتیک را بدو دسته نسبی (Proportional) و ثابت (Constant) تقسیم نمود. خطاهای نسبی به شکل درصدی و خطاهای ثابت به صورت مقداری ثابت، بالاتر یا پایین‌تر از مقدار واقعی آنالیت خود را نشان می‌دهد. هر دو نوع سوگرایی می‌توانند به صورت همزمان اتفاق بیافتند و سوگرایی کلی (Total error) بسته به دامنه مقدار آنالیت فرق کند.

صحت می‌تواند توسط هر یک از اجزای یک سنجش ایمنی تحت تاثیر قرار گیرد. این عوامل عبارتند از خطاهای سیستمیک همچون واکنش‌های متقاطع یا بازیافت ضعیف، نشانگرهای ضعیف، عدم وجود ویژگی یا اختصاصیت مناسب آنتی بادی، دقت پایین آزمایش (خطاهای تکنیکی، آنتی بادی‌های دارای قدرت تمایل پایین، یا نشانگرهای دارای کیفیت پایین) و غیره.

## چگونه صحت را تعیین می‌کنیم؟

برای تعیین صحت راههای مختلفی وجود دارد. در نخستین مرحله چنانچه روش استاندارد و یا مرجعی برای آنالیت مورد نظر وجود داشته باشد صحت روش را می‌توان با مقایسه با نتایج بدست آمده از روش مرجع مقایسه نمود. این سری از روشهای تعیین صحت تحت عنوان تست همبستگی یکی از معتبرترین روشهای بررسی مستقیم صحت یک روش می‌باشد.

روش های دیگر تعیین صحت، روشهای غیرمستقیم می باشند. این روشها عبارتند از:

- 1) مطالعات بازیافت (Recovery studies)
- 2) آزمایشات (Parallelism) یا تست های خطی بودن
- 3) بررسی اختصاصیت یا ویژگی
- 4) تداخل
- 5) سرم کنترلهای تجاری

### تست همبستگی (Correlation Test)

برای تعیین صحت با استفاده از روش مستقیم می توان از مقایسه نتایج بدست آمده از روش خود با یک روش رفرانس یا مرجع استفاده نمود و با تست همبستگی، نتایج را ارزیابی کرد.

فاکتورهای آماری که در مقایسه دو روش قابل استفاده هستند عبارتند از پارامترهایی همچون شیب (Slope)، تلاقی عرض از مبدا (Y intercept) و انحراف معیار محور عمودی (Standard error of estimate in the Y direction) علاوه بر سه فاکتور فوق فاکتورهای دیگری همچون سوگرایی انحراف معیار اختلافات (Standard deviation of differences) نیز برای مقایسه دو روش مورد استفاده قرار می گیرند.

ضریب همبستگی  $r$  تنها در شناسایی میزان خطاهای اتفاقی یا تصادفی (Random) قابل استفاده است و نمی توان از آن به عنوان یک فاکتور مقایسه برای خطاهای ثابت یا نسبی استفاده کرد.

روشهای آماری دیگری همچون F-test و t-test برای مقایسه دو روش مورد استفاده قرار می گیرند ولی نقش آنها در تصمیم گیری زیاد نیست .

### کاربرد هر یک از پارامترهای آماری در تست تعیین همبستگی

- شیب منحنی یا  $m$  یکی از فاکتورهای مهم در تعیین میزان خطای نسبی (Proportional error) است که اختلاف آن از عدد یک نشاندهنده میزان خطای

نسبی آزمایش است. این مقدار، معرف بسیار خوبی برای میزان خطایی است که در کالیبراسیون آزمایش ممکن است وجود داشته باشد.

- برای بررسی میزان خطای ثابت (Constant error) می‌توان از دو پارامتر مهم بنامهای عرض از مبدا (Y intercept) و مقدار سوگرایی (Bias) استفاده نمود. مثبت یا منفی بودن این اعداد نشان‌دهنده سوگرایی مثبت یا منفی از میزان واقعی می‌باشد.
- جهت بررسی میزان خطای تصادفی (Random error) از دو پارامتر انحراف معیار محور عمودی و انحراف معیار اختلافات استفاده می‌شود.
- روش‌های آماری F-test و t-test : t-test یکی از روش‌های آماريست که برای مقایسه نتایج به دست آمده با یک نقطه بحرانی معیار (Critical value) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

چنانچه مقدار محاسبه شده روش مورد آزمایش بیشتر از مقدار معیار باشد (به عنوان مثال زمانی که تعداد نمونه ۴۰ عدد و حدود اطمینان ۹۵٪ یا  $P=0/05$  باشد مقدار نقطه بحرانی  $t$  در جدول 2/021 می‌باشد) تفسیر این است که اختلاف ما بین دو روش زیاد بوده و در نتیجه، روش مورد بررسی غیر قابل قبول می‌باشد چنانچه این حد کمتر از معیار مربوطه باشد عملکرد روش مورد قبول واقع می‌شود. چنین نتیجه‌گیری عاری از خطا نبوده و استفاده صرف از t-test به عنوان تنها روش تفسیر می‌تواند با خطا همراه باشد.

برای محاسبه F-test از مقایسه انحراف معیار روش مورد آزمایش و روش مرجع استفاده می‌شود. برای محاسبه F-test انحراف معیارها به توان رسیده و عدد بزرگتر بر کوچکتر تقسیم می‌شود.

$$F = \frac{(SDA)^2}{(SDB)^2}$$

حال چنانچه مقدار به دست آمده از حد معیار مربوط F-test بزرگتر باشد اختلاف در دقت روش مورد مطالعه نسبت به روش مرجع معنی‌دار بوده و نتیجه غیر قابل قبول می‌باشد. استفاده از این روش همانند t-test به تنهایی با خطا همراه خواهد بود.

## چگونه آزمایش همبستگی انجام میشود؟

برای انجام تست همبستگی باید حداقل از چهل سرم (در محدوده طبیعی آنالیت مورد مطالعه) با مقادیر مشخص استفاده نمود. در شرکتهای سازنده، تعداد سرم مورد آزمایش حدود 300 - 200 مورد خواهد بود که هر سرم نیز بصورت دوپلیکت (هم با روش رفرانس و هم با روش مطالعه) مورد آزمایش قرار می‌گیرد. فاصله بین آزمایشات (هم با روش رفرانس و هم با روش مورد مطالعه) نباید از دو ساعت فراتر رود. در نهایت بر روی یک منحنی که در محور افقی نتایج به دست آمده از روش رفرانس و در محور عمودی نتایج به دست آمده از روش مورد مطالعه قرار گرفته، ترسیم می‌شود.

## آزمایشات بازیافت (Recovery)

بازیافت یک نوع بررسی غیرمستقیم صحت می‌باشد و به توانایی یک آزمایش در بازیافت یا تعیین مقدار مشخص افزوده شده به یک نمونه اطلاق می‌شود. روش تجربی برای تعیین این نوع شاخص شامل افزودن مقدار مشخصی از یک آنالیت (A) به یک مقدار پایه (B) و تعیین غلظت آن می‌باشد. درصد بازیافت را می‌توان با فرمول:

$$\frac{C - B}{A} \times 100$$

محاسبه نمود. فرض مهمی که در این سری مطالعات وجود دارد خالص بودن و صحیح بودن استاندارد است که باید به مقدار پایه (B) افزوده شود. در همین زمینه استانداردهای بین‌المللی وجود دارند ولی این مسئله الزاماً بیانگر خالص بودن آنها نیست. حجم ماده افزوده شده نیز باید تا حد امکان به حداقل برسد تا در ماتریکس مقدار پایه تغییرات فاحشی ایجاد ننماید. از همین رو باید غلظت بالایی از ماده A تهیه شود و حجم افزوده شده نیز به حداقل برسد. انتخاب ماده زمینه یا ماتریکس نیز از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. شرایط ایده‌آل، ماتریکس یا حلالی که آنالیت در آن حل می‌گردد باید فاقد آنالیت مورد نظر و یا مقدار بسیار ناچیز از آن باشد.

برای انجام این آزمایش باید حداقل سه یا چهار حد  $A$  (یا آنالیتی که باید افزوده شود) را تهیه نمود و به سه غلظت از آنالیت که در محدوده کاری آنالیت موردنظر و بعنوان پایه تلقی می‌گردند افزود.

یکی از عوامل بسیار موثر بر روی بازیافت، دقت آزمایش است. از این رو این مقادیر افزوده شده باید در غلظتی باشد که دقت کافی برای جدا ساختن این مقدار از مقدار پایه اولیه فراهم شود.

معایب تست بازیافت بعنوان تنها آزمایش برای بررسی صحت عبارتند از:

1. امکان اشتباه در محاسبات.
2. تست بازیافت تنها خطای نسبی یا Proportional error را مشخص می‌کند.
3. تست بازیافت جهت اندازه‌گیری آنتی بادیهای سرمی که از افینیتی و آویدیتی مختلفی برخوردارند نمی‌تواند پاسخ روشنی به همراه داشته باشد و بهترین راه برای بررسی صحت در این نوع نمونه‌ها بررسی بر اساس حساسیت و ویژگی آزمایشات به صورت بالینی است و معیارهای تکنیکی تنها به صورت نسبی مطرح می‌باشند.

### خطی بودن (Linearity) یا تست موازی بودن (Parallelism)

یکی از آزمایشات بسیار مفید برای نشان دادن بازیافت نسبی و صحت یک روش، تست خطی بودن می‌باشد. باید توجه داشت که در یک سنجش، صحت مستقل از غلظت آنالیت می‌باشد به عبارتی با تغییر غلظت آنالیت نباید تغییری در صحت مشاهده شود. برای اثبات این مسئله می‌توان از آزمایشات رقیق کردن نمونه استفاده کرد. با رقیق کردن نمونه و یا استاندارد با یک ماده رقیق کننده مناسب و انجام آزمایش بر روی نمونه‌های رقیق شده و محاسبه ضریب رقت در نتایج، در صورت صحیح بودن روش می‌توان یک خط مستقیم به دست آورد. چندین نمونه مختلف و حداقل سه تا چهار رقت مختلف برای هر نمونه را باید تهیه نمود تا خطی بودن نتایج نمونه‌ها آشکار شود. نمونه‌های اولیه و رقت‌های انتخاب شده در شکل ایده آل خود باید کل دامنه کاری روش مورد مطالعه را پوشش دهند.

## روش تعیین خطی بودن

رقیق نمودن درصدی نمونه ها (Fractional dilution) نسبت به رقیق سازی سریال (Serial dilution) از ارزش بالاتری برخوردار است. در همین راستا باید نمونه بسیار غلیظی را انتخاب نمود و آنرا نمونه ۱۰۰٪ آنالیت نامید و نمونه‌ای نیز که عاری از آنالیت بوده و یا در زیر حد قابل تشخیص (LDD) Detection limit سنجش باشد را به عنوان نمونه ۰٪ در نظر گرفت. سپس با مخلوط کردن این دو نمونه رقت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ درصد از نمونه را تهیه چند و مورد آزمایش قرار داد. بر روی یک منحنی در محور افقی درصدهای رقت و در محور عمودی غلظت به دست آمده را قرار داد تا پی به خطی بودن آزمایش برد.

از راههای دیگر برای نمایش خطی بودن یک روش یا یک آزمایش، محاسبه غلظت نهایی و ضرب آن در رقت مربوطه می‌باشد. نتایج را می‌توان بر روی یک منحنی که بخش افقی آن رقت های نمونه و قسمت عمودی آن غلظت می‌باشد ترسیم کرد. در این صورت وجود یک خط مستقیم موید خطی بودن نتایج خواهد بود.

از آنجائیکه روشهای سنجش آنتی بادی بیانگر غلظت و افینیتی آنتی بادی می‌باشد، تنها در صورتیکه افینیتی آنتی بادی های موجود در نمونه همانند انواع کالیبراتورهای آزمایش باشد خطی بودن نتایج به دست خواهد آمد.

از همین رو نمونه هایی را که دارای آنتی بادی با افینیتی بالا باشند می‌توانند نتایج بالاتری را در تست رقت و خود آزمایش نشان دهند و نمونه هایی که آنتی بادیهای آنها از نوع افینیتی پایین باشد بصورت نامتناسبی رقتهای پایین تری را از خود نشان خواهند داد.

## عوامل موثر بر تست Linearity

۱. ماتریکس : یکی از عوامل موثر در تست خطی بودن ماده رقیق کننده‌ای است که برای رقیق کردن نمونه ها از آن استفاده می‌شود. نمونه را بایستی به گونه‌ای رقیق نمود تا از وجود یک ماتریکس یکسان در بین نمونه ها مطمئن شد. یکی از عواملی که سبب برهم

- خوردن رابطه خطی می‌شود اختلاف در ماتریکس نمونه های رقیق شده با ماتریکس استاندارد است که برای تعیین غلظت نمونه ها از آن استفاده می‌شود.
2. خطاهای محاسباتی و پی پت: در رابطه با پی پت کردن، خطاهای ناشی از آن می‌توانند باعث خطاهای سیستمیک و افزایش خطاها در زمان رقیق کردن نمونه ها شوند.
3. عدم وجود پاسخ در دو انحنای منحنی: عدم دقت و بکارگیری استانداردهای نادرست همه می‌توانند باعث ایجاد پاسخهای اشتباه در تست خطی بودن گردند.

### تداخلات (Interferences)

یکی از موارد مهم در تعیین صحت، مسئله تداخلات یا موادی است که می‌توانند باعث تداخل در آزمایش [بصورت افزایش در نتیجه (Positive interferences) و یا کاهش در نتیجه (Negative interferences)] گردند. این عوامل جدا از عواملی هستند که باعث واکنش‌های متقاطع می‌گردند.

بیشترین تاثیر عوامل مداخله گر را تحت عنوان اثرات ماتریکس (Matrix effect) می‌شناسند .

### شناسایی وجود تداخل

راه های اثبات وجود تداخل عبارتند از:

1. استفاده از کنترل‌های دلتا: منظور از این نوع کنترلها مقایسه نتایج کنونی در آزمایشات با نتایج قبلی آنهاست که نشاندهنده یک نوع Trend یا روند کاهنده یا افزایشنده در نتایج می‌باشد.
2. عدم تطابق نتایج بیمار با شرایط بالینی بیمار: بعنوان مثال مشاهده نتایج پرکاری تیروئید در بیماری که از نظر بالینی وضعیت تیروئید آن طبیعی است.
3. مقایسه شرایط وابسته فیزیولوژیکی: بعنوان مثال ممکن است ارتباط معکوس مابین هورمونهای آزاد تیروئید و هورمون TSH مشاهده نشود.

4. نتایج کاملاً غیر منطقی: اختلاف فاحش با میزان طبیعی و حتی شرایط پاتولوژیکی می تواند شک برانگیز باشد.

5. بدست آمدن نتایج مختلف با روش های مختلف آنالیز.

عواملی که باعث ایجاد تداخل در آزمایشات می گردند را می توان در گروه های مختلف جای داد:

### 1) متغیرهای پیش آنالیزی (Preanalytical variables)

کلیه عواملی که با ترکیب نمونه سروکار دارند را اصطلاحاً متغیرهای پیش آنالیزی می نامند. این عوامل را می توان به دو گروه مربوط به بیمار و مربوط به نمونه تقسیم کرد. مسایل مربوط به بیمار همچون زمان اشتباه برای نمونه گیری و فاکتورهای محیطی همچون سیگار می توانند باعث تغییر در در غلظت آنالیت ها و در نتیجه تفسیر آزمایشات شوند.

-مسائل مربوط به نمونه

-خونگیری - توقف خون در سیاهرگها به دلیل استفاده طولانی مدت تورنیکت می تواند باعث افزایش غلظت پروتئین ها در حدود ۵٪ گردد و همین مسئله نیز باعث افزایش لیگاندهای باند شده به آنها می گردد.

-ماهیت نمونه- اکثریت آزمایشات سنجش ایمنی از سرم استفاده می شود، با این حال در پاره ای از موارد از پلاسما نیز استفاده شده، ولی استفاده از پلاسمای حاوی EDTA نیاز به دقت بسیار دارد زیرا EDTA یک ماده شلات کننده (Chelating) قوی است و می تواند باعث اتصال یونهای فلزی که جزء فعال ماده نشاندار هستند شود. در بعضی موارد نیز این ماده می تواند باعث بلوک کردن کوفاکتور آنزیمهایی همچون آلکالین فسفاتاز گردد که در این آنزیم، روی (Zinc) نقش کوفاکتوری را ایفا می کند. استفاده از EDTA مانع از ایجاد تداخل در آزمایشات نیز می شود، بخصوص این مسئله را می توان در مواردی که تداخل ناشی از تاثیر اجزای سیستم کمپلمان (Complement System) باشد مشاهده نمود. لوله های حاوی سدیم فلوراید نیز می توانند در بعضی از آزمایشات سنجش ایمنی نامتناسب باشند. نگهدارنده هایی همچون سدیم آزاید نیز می توانند بر روی نتایج تاثیر سوء بگذارند.

-همولیز و افزایش بیلروبین خون (Hyperbilirubinemia)

همولیز و افزایش بیلیروبین خون در نمونه می‌توانند تا حد کمی در آزمایشات سنجش ایمنی تداخل ایجاد نمایند.

### -افزایش چربی خون (Lipemia)

افزایش چربی خون در بعضی از آزمایشات که از مواد حلال چربی استفاده می‌کنند همچون آزمایش استروئیدها می‌توانند باعث تداخل گردند.

### -پایداری و نگهداری

پایداری اکثر آنالیت‌های مورد بررسی در آزمایشات سنجش ایمنی بسیار بالاست. حتی اگر سرم با گلبول‌های قرمز و در لوله اولیه در درجه سانتیگراد نگهداری شود، می‌توان شاهد پایداری مناسب آنالیت‌ها بود.

آنالیت‌هایی همچون TSH, FSH, LH، تیروکسین آزاد، پرولاکتین و PSA حتی تا 2 هفته در چهار درجه سانتی‌گراد در لوله اولیه خود پایدار می‌مانند. در بعضی موارد همچون تستوسترون، نگهداری سرم در مجاورت گلبول‌های قرمز باعث کاهش آن می‌گردد.

### (2) اثرات ماتریکس (Matrix effect)

دومین فاکتور پس از متغیرهای پیش آنالیزی، اثرات ماتریکس می‌باشد. این اثرات ناشی از ماهیت پیچیده مخلوط پروتئینها، کربوهیدراتها، چربیها، مولکولهای کوچک و نمکهای تشکیل دهنده نمونه می‌باشد. اثرات ناشی از این مواد بر روی روش آنالیز را اصطلاحاً اثر ماتریکس نامیده که می‌تواند به صورت جدی نتایج را تحت تاثیر قرار دهد. این اثرات همچنین می‌تواند ناشی از معرف های بکار رفته روش سنجش ایمنی نیز باشد.

### تاثیر معرفیها

**بافر ها** - قدرت یونی و pH بافرها بسیار دارای اهمیت است. بخصوص در مواردی که آنتی بادیهای مونوکلونال دارای pH ایزو الکتريک (pI) بین 5-9 باشند. انتخاب صحیح قدرت یونی می‌تواند باعث کاهش اتصالات غیراختصاصی به جداره چاهکها گردد. در بافرها اکثراً پروتئینها به همراه یک ماده پاک کننده (Detergent) قرار گرفته تا از اتصالات غیراختصاصی آنها به جداره چاهکها و یا لوله آزمایش جلوگیری بعمل آمده و همچنین دقت آزمایش بهبود یابد.

استفاده از عواملی که تحت عنوان بلوکر (Blockers) شناخته می‌شوند می‌تواند در خواص اتصالی آنتی بادی‌هایی که میزان افینیتی پایینی دارند نیز تاثیر بگذارد. از سوی دیگر افزایش میزان پاک کننده در بافرها می‌تواند باعث دناتور شدن پروتئینها و کنده شدن آنتی بادیها از فاز جامد گردند.

در بعضی از پاک کننده ها، پراکسیداز وجود دارد که می‌تواند مانع واکنش آنتی ژن - آنتی بادی گردد. بافرها همچنین محیط بسیار مناسبی برای رشد ارگانوسمهای ساپروفیت و باکتریها هستند و استفاده از آزایدها و ترکیبات جیوه اگرچه می‌توانند باعث جلوگیری از رشد باکتریها گردند ولی مواد نشاندار شده با پراکسیداز را نیز بلوک می‌نمایند.

آنتی بادی های پلی کلونال - آنتی بادیهای پلی کلونال چه به شکل ناخالص و یا اشکال خالص شده و قطعات  $Fab/F(ab)_2$  مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنتی بادی‌هایی که در آنها قطعه FC وجود ندارد کمتر دچار واکنش اتصالات غیر اختصاصی می‌گردند.

آنتی بادیهای مونوکلونال - آنتی بادیهای مونوکلونال کلاً از افینیتی پائین تری نسبت به آنتی بادیهای پلی کلونال برخوردارند. این آنتی بادیها در سیستمهای بافری بهتر از سرم یا پلاسما فعالیت نشان می‌دهند.

نشانگرهای سنجش ایمنی - نشانگرها تاثیر عمده‌ای بر واکنش دارند. ساختمان بسیاری از مولکولها به خصوص هاپتن‌ها در پی نشاندار شدن می‌تواند تغییرات عمده‌ای پیدا نماید. انتخاب پروسه نشاندار نمودن، تاثیر بسزایی در کیفیت و خلوص نشانگرها دارد بخصوص چنانچه از مواد رادیو اکتیو بخواهیم به عنوان ماده نشانگر استفاده نمائیم.

در نهایت این امر را باید مد نظر قرار داد که نشان دار نمودن مولکولهای کوچک می‌تواند در اتصال آنها با مولکول های دیگر تاثیر بگذارد .

جداسازی آنتی بادیهای متصل شده از آنتی بادیهای آزاد: این مرحله یکی از مشکلات اصلی در آزمایشات سنجش ایمنی هتروژن تلقی می‌گردد. میزان آنالیت آزاد در بخش متصل شده و بالعکس بعنوان خطای طبقه بندی نامناسب (Missclassification error) شناخته شده و باید به حداقل برسد.

روشهای بسیاری برای جدا ساختن قسمتهای متصل شده از آزاد وجود دارد. در سیستمهایی که این عمل باید در فاز مایع صورت گیرد می توان از موادی همچون ذغال (Charcol)، سیلیکاتها، پلی اتیلن گلیکول، الکل و نمک استفاده نمود. ولی در سیستمهای فاز جامد با اتصال آنتی بادی یا آنتی ژن به سطح فاز جامع همچون لوله آزمایش، ذرات پلی استیرنی، سلولز، نایلون یا میکروپلیت می توان به طور موثری این دو فاز را از یکدیگر جدا نمود. در روش اخیر علیرغم مزیت بالا یکسری معایب نیز وجود دارد و آن نیز امکان دناتوره شدن ناقصه مولکولهای متصل شده به فاز جامد است.

### تأثیرات نمونه

تأثیر پروتئینها: پروتئینهای مختلفی می توانند باعث ایجاد تداخل در آزمایشات سنجش ایمنی گردند. این پروتئینها عبارتند از: آلبومین، فاکتور روماتوئیدی، کمپلمان، لیزوزیم و فیبرینوژن. راههایی که این پروتئینها باعث تداخل می شوند عبارتند از:

آلبومین: آلبومین به دلیل غلظت بالایی که در نمونهها دارد و همچنین بدلیل قدرت اتصال و آزاد نمودن بسیاری از آنالیتها می تواند باعث تداخل گردد.

فاکتورهای روماتوئیدی: این اتوانتی بادیها، معمولاً از جنس IgM و بر علیه قسمت FC مولکولهای IgG می باشند. این آنتی بادیها را نه تنها در روماتیسم مفصلی بلکه در بسیاری از بیماریهای اتوایمیون دیگر همچون بیماری لوپوس سیستمیک، اسکرودرما و هیپاتیت مزمن فعال نیز می توان یافت. این نوع بیماریها در کمتر از ۵٪ افراد جامعه قابل مشاهده می باشند. فاکتورهای روماتوئیدی می تواند با آزمایشات تیروکسین و غیره تداخل کند.

مکمل: مکملها یکسری پروتئینهایی هستند که در شرایط التهابی افزایش می یابند. این اجزاء به FC آنتی بادیها متصل شده و مانع از اتصال اختصاصی آنتی بادیها به آنالیتها می گردند. زمانی که بخصوص از سرم تازه استفاده می شود این نوع تداخل بیشتر دیده شده و از همین رو نگهداری سرم در ۴ درجه سانتیگراد برای چندین روز و یا استفاده از پلاسما حاوی EDTA که باعث حذف کلسیم و غیر فعال شدن اجزاء سیستم کمپلمان می گردد می تواند بسیار مفید

باشد. استفاده از قطعات Fab یا استفاده از IgG مرغی (Chicken IgG) نیز می‌تواند مانع از تداخلات ناشی از مکملها گردد.

**لیزوزیم:** لیزوزیم اکثراً اتصالات محکمی به پروتئینهای دارای نقطه ایزوالکتریک (pI) پائین برقرار می‌کند. ایمونوگلوبولینها اکثراً از pI حدود 5 برخوردارند و از همین رو لیزوزیم می‌تواند مانند پلی ما بین ایمونوگلوبولینهای فاز جامد و آنتی بادی سیگنال دهنده قرار گیرد. افزودن  $Cu^{2+}$  و اوآلبومین در بافر باعث کاهش اثرات لیزوزیم خواهد شد.

**پروتئینهای داخلی متصل کننده هورمونها:** اینگونه پروتئینها از غلظتهای مختلفی در نمونه‌های سرمی یا پلاسمایی برخوردار بوده و به شدت می‌توانند بر روی عملکرد یک آزمایش تاثیر بگذارند. هم غلظت و هم خواص اتصال آنها می‌تواند تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و یا اکتسابی قرار گیرد. از انواع مهم این نوع پروتئینها می‌توان به آلبومین، گلوبولینهای متصل شونده به هورمونهای جنسی، تیروئید، کورتیکو استروئید و پری آلبومین اشاره نمود.

تغییر در غلظت این پروتئینها می‌تواند تاثیر شدیدی روی بعضی از روشها داشته باشد بعنوان مثال افزایش هورمون متصل کننده هورمونهای جنسی Sex hormone binding globulin (SHBG) در روشهای سنجش ایمنی، تستوسترون و استرادیول تاثیر مستقیم دارد. چنانچه SHBG به حدود 90 nmol/L افزایش یابد مقدار تستسترون تا ۴۰٪ کاهش می‌یابد.

تغییر در پروتئین متصل کننده تیروکسین (TBG) می‌تواند در اثر تغییرات مادرزادی، افزایش سنتز، کاهش متابولیسم و یا ترکیبی از این حالات اتفاق بیافتد. در این موارد این تغییرات تاثیر عمده‌ای بر روی نتایج تیروکسین خواهند داشت. برای حل این مشکل نیز دو راه وجود دارد:

نخست محاسبه اندکس های هورمون های تیروئید و تصحیح بخاطر تغییر غلظت TBG و دوم اندازه گیری مستقیم هورمون آزاد.

**اشکال غیر طبیعی پروتئین های داخلی متصل کننده:** در بعضی از بیماران در شرایط فامیلی اشکال غیر طبیعی از پروتئینها را می‌توان یافت. بعنوان مثال در بیماری نادر اتوزومال غالب Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH) حدود ۵۰٪ مولکولهای

آلبومی با میزان ۵۰ برابر بیشتر از حالت عادی مولکولهای تیروکسین را را به خود متصل می‌نمایند.

اتو آنتی بادی بر علیه هورمونهای تیروئید: این آنتی‌بادیها برای نخستین بار توسط رابینز (Robbins) گزارش شدند. در هر ۲۵۰۰ نمونه، یک نمونه می‌تواند دارای اتوآنتی بادی بر علیه T3 یا T4 باشد. این آنتی بادیها بخصوص Anti-T4 می‌تواند در اندازه گیری تیروکسین تام و نوع آزاد ایجاد تداخل نمایند.

آنتی بادی هیدروفیلیک : در 30-40٪ نمونه های بیماران می‌توان این نوع از آنتی بادیها را مشاهده نمود. این آنتی بادیها معمولا در پی تماس مستقیم با حیوانات و یا استنشاق پشم و غیره به وجود می‌آید. حیوانات مختلف اعم از موش، خرگوش، گوسفند و گاو همه می‌توانند منجر به ایجاد این نوع آنتی بادی در انسان شوند. آزمایشاتی که در آنها تداخل آنتی‌بادیهای هتروفیل گزارش شده است عبارتند از: CEA, CA125, hCG, TSH, T3, T4, پرولاکتین، HBsAg و دیگوکسین.

آنتی بادیهای هتروفیل می‌توانند در واکنشهای سنجش ایمنی چه بصورت ساندویچ و چه بصورت رقابتی باعث ایجاد تداخل گردند. در تستهای رقابتی این آنتی بادیها موجب کاهش جایگاههای اتصال بر روی آنتی بادی‌های اولیه و باعث پاسخ با سوگرایی مثبت (Positive bias) می‌گردند.

یکی از بارزترین تاثیرات آنتی بادیهای هتروفیل را می‌توان در آزمایشات دارای قالب ساندویچی مشاهده نمود. در این آزمایشات آنتی بادیهای هتروفیل باعث ایجاد یک پل رابط (Bridge) مابین دو آنتی‌بادی و تشکیل ساندویچ می‌گردند. آنتی بادیهای هتروفیل دو ظرفیتی باعث ایجاد سوگرایی مثبت (Positive bias) و یا عدم هرگونه سوگرایی (No bias) می‌گردند.

این آنتی بادی ها به قسمتهایی که به آنالیت‌ها متصل می‌شوند اتصال نیافته، ولی به Fc و  $F(ab')_2$  متصل می‌شوند. در هر دو حالت افینیتی اتصال آنتی بادی به آنالیت کاهش می‌یابد.

افزودن سرم گونه‌های حیوانی که باعث ایجاد این آنتی‌بادیها شده، می‌تواند باعث کاهش تاثیرات آنتی بادی هتروفیل گردد. مثلا گاماگلوبولین گونه‌های مختلف همچون اسب، گاو و بز

باعث کاهش تحصیل آنتی‌بادیهای تداخل کننده خواهد گردید. سرم گاو بیشتر از سرم موش می‌تواند این آنتی‌بادیها را خنثی نماید و احتمالاً این مسئله به مصرف فراورده های دامی مثل شیر گاو و گوشت آن بر می‌گردد.

راههای مختلف دیگری نیز برای از بین بردن اثر تداخلی آنتی‌بادیهای هتروفیل وجود دارد که مهمترین آنها عبارتند از:

#### الف- حذف آنتی‌بادی های تداخل کننده

- 1- استخراج آنالیت از نمونه
- 2- افزودن سرم حیوانی ایمن شده یا ایمن نشده
- 3- افزودن سوسپانسیون پروتئین A
- 4- رسوب گذاری با 16% PEG 6000 به نسبت 50% V/V
- 5- حرارت دادن سرم تا 90-70 درجه سانتی گراد (برای آنالیت های مقاوم به حرارت)

#### ب- افزودن سرمهای غیر ایمن

- 1- پلی کلونال IgG اختصاصی گونه، آنتی هیومن IgG
- 2- مونوکلونال، آنتی بادی موشی
- 3- ایمونوگلوبولین های فرموله شده
- 4- قطعات FC آنتی بادی اختصاصی برای گونه

برخلاف فاکتور روماتوئیدی (RF) استفاده از قطعات Fab باعث کاهش اثرات تداخل کننده آنتی‌بادی‌های هتروفیل نمی‌شود. استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونال موشی بعنوان وسیله حمل عوامل Immunoscintigraphic یا عوامل شیمی درمانی برای درمان سرطانها امروزه سبب پیدایش آنتی‌بادیهای بنام Human Anti-Mouse Antibodies (HAMA) بعنوان یک مشکل اصلی شده است. غلظت این آنتی‌بادیها به مراتب بیشتر از آنتی‌بادیهای هتروفیل می‌باشد.

در روش هایی که از یک آنتی بادی مونوکلونال موشی استفاده می شود، امکان تداخل با HAMA کمتر از انواعی است که از دو آنتی بادی موشی استفاده می کنند.

### تداخل مکانیکی (Mechanical Inteference)

فیبرینوژن در نمونه هایی که کاملاً لخته نشده اند و یا در بیمارانی که زمان پروترومبین طولانی دارند می تواند در روشهای اتوماتیک سنجش ایمنی باعث ایجاد تداخل گردد.

پاراپروتئینمیا (Paraproteinemia) در بسیاری از آزمایشات باعث ایجاد تداخل می شود. در این نمونه ها ویسکوزیته بالای سرم سبب کاهش نمونه و کاهش کاذب مقدار آنالیتها خواهد شد. این پروتئینها به طور غیر اختصاصی نیز می توانند به آنالیتها یا معرفها متصل شده و نتایج مختلفی را نشان دهند.

### تداخل غیر اختصاصی (Nonspecific Inteference)

این نوع تداخل بدلیل افزایش غلظت سایر ترکیبات پلاسما اتفاق می افتد. اسیدهای چرب آزاد می توانند باعث تداخل در تست T4 آزاد شوند. تعیین میزان داروها نیز می تواند تحت تاثیر اثرات ماتریکس قرار گیرد. به عنوان مثال، در مورد تیروکسین وجود مواد مشابه با آن بخصوص در افرادی مانند به خانمهای حامله، نوزادان، بیماران مبتلا به بیماریهای کلیوی و بیماریهای کبدی می تواند باعث ایجاد نتایج کاذب گردد.

### اثر هوک (Hook Effect)

وجود پاسخ ناچیز در نمونه هایی که غلظت آنالیت در آن بسیار بالاست را تحت عنوان اثر هوک می شناسند. این تاثیر را بخصوص در واکنشهای دو طرفه یا ساندویچ می توان مشاهده نمود . در

این سری از آزمایشات چنانچه آزمایش در یک مرحله صورت گیرد، می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب به دلیل اثر هوک شود.

آزمایشاتی همچون آلفا فتوپروتئین، CA125، hCG، فریتین، پرولاکتین، PSA و TSH بیشترین آزمایشاتی هستند که اثر هوک را می‌توان در آنها دید.

مکانیسم اثر هوک به این صورت می‌باشد که در یک آزمایش ساندویچ یک مرحله‌ای آنتی بادی نشاندار و آنالیت به طور همزمان به واکنش افزوده شده و مخلوط می‌گردند. مقدار زیاد آنالیت موجود در نمونه سبب می‌شود تا کلیه جایگاههای اختصاصی و غیراختصاصی بر روی هر دو آنتی بادی موجود در سیستم (چه فیکس شده به فاز جامد و چه نشاندار شده آزاد سیستم) اشباع شوند. این مسئله سبب عدم تشکیل ساندویچ و ایجاد پاسخ بسیار ضعیف در سیستم می‌شود.

#### کاهش اثر هوک

برای از بین بردن و یا کاستن اثرات هوک می‌توان در طراحی سیستم تغییراتی ایجاد نمود. یکی از این تغییرات افزودن یک مرحله شستشو قبل از افزودن آنتی بادی ثانویه است. روش دوم استفاده از رقت مناسب برای نمونه هاست که در این شکل می‌توان از رقیق کننده موجود در خود کیت و یا سرم فرد نرمال استفاده نمود.

#### ویژگی (Specificity) یا واکنش های متقاطع (Cross-Reactivity)

یکی از مسائل مهم در جهت آزمایشات مسئله ویژگی آنهاست. ویژگی یک آزمایش را می‌توان به توانایی آزمایش در اندازه‌گیری یا شناسایی آنالیت مورد نظر مجموعه‌ای از مواد یا آنالیت‌های ناهمگون تعریف نمود. این مسئله به خواص آنتی بادی بکار رفته ارتباط داشته و انحصاری بودن ویژگی آن برای یک اپی توپ خاص، توانایی آنرا در شناسایی آنالیت موردنظر نشان خواهد داد. وجود ساختارهای مشابه بر روی اپی توپهای انواع مختلف آنتی ژنها باعث ایجاد رقابت مابین آنها بر سر اتصال آنتی بادی خواهد شد. این نوع رقابت اصطلاحاً تحت عنوان واکنش متقاطع شناخته شده و مقدار آن در اصل به مقدار اتصال آنتی بادی به سایر مواد مشابه آنالیت اصلی بستگی دارد.

مواد مشابه با آنالیت می‌توانند به اشکال مختلفی وجود داشته باشند. مولکول مشابه داخلی، متابولیت آنالیت که دارای اپی توپهای مشابه باشد و یا تزریق آنالیت‌های مشابه همچون داروها از این موارد می‌باشند.

در این قبیل موارد، صحت آزمایشات بستگی به حذف و یا به حداقل رساندن عوامل ایجاد کننده واکنش‌های متقاطع دارد.

ماهیت عوامل ایجاد کننده واکنش‌های متقاطع بسته به ماهیت آنالیت موردنظر متغیر می‌باشد. در همین راستا به عنوان مثال در سنجش هورمون تحریک کننده تیروئید TSH، به دلیل ساختار دو زنجیره ای آلفا ( $\alpha$ ) و بتا ( $\beta$ ) و وجود تشابه زنجیره آلفا با زنجیره آلفای هورمون‌های گلیکوپروتئینی دیگر مثل FSH، LH و hCG امکان ایجاد واکنش‌های متقاطع وجود دارد. به همین دلیل در هنگام بررسی ویژگی کیت سنجش TSH می‌بایست مطالعه بر روی عوامل بالقوه ایجاد کننده واکنش متقاطع با آن همچون زنجیره‌های مجزای  $\alpha$  و  $\beta$ ، سایر هورمون‌های گلیکوپروتئینی و حتی سایر هورمون‌های هیپوفیز قدامی مثل هورمون رشد و پرولاکتین صورت گیرد.

تعیین عوامل بالقوه ایجاد کننده واکنش‌های متقاطع از اهمیت فوق العاده‌ای در اندازه گیری هورمون‌های استروئیدی، اندازه گیری داروها و هورمون‌های گونادوتروپین برخوردار می‌باشد.

جهت تعیین واکنش‌های متقاطع در یک آزمایش راه‌های مختلف وجود دارد که بسته به سیستم طراحی شده برای الایزا فرق می‌کنند. در آزمایشات رقابتی متداول‌ترین روش تجربی افزودن ماده خالص ایجاد کننده واکنش متقاطع به ماتریکس عاری از آنالیت می‌باشد. در ادامه با ترسیم منحنی پاسخ حاصل از آنالیت تنها و ماده ایجاد کننده واکنش متقاطع، می‌توان به وجود این تداخل پی برد. این واکنش در اصل نقطه‌ای است که باعث کاهش ۵۰ درصدی در سیگنال‌های به دست آمده از آزمایشات عاری از آنالیت می‌باشد و آنرا بصورت درصد نمایش می‌دهند. در روش دیگر برای تعیین میزان ویژگی (روش میل والدس Miler Valdes و دیویس Davis) بدون در نظر گیری فرمت یا طراحی کیت الایزا به بررسی مسئله ویژگی کیت می‌پردازد. در این روش مستقیماً ماده ایجاد کننده واکنش متقاطع به نمونه‌های حاوی آنالیت افزوده می‌شود و حاصل به صورت درصد تغییر در غلظت آنالیت گزارش می‌شود.

برای افزایش میزان ویژگی آزمایشات نیز راههای مختلفی پیشنهاد شده از جمله تخلیص آنالیت موردنظر از نمونه و سپس انجام آزمایش بر روی آن، دوم تغییر در شرایط ترمودینامیکی آزمایشات همچون تغییر زمان و دمای انکوباسیون، جذب آنتی بادی‌های ناخواسته و غیره .

## ارزیابی کیت های کیفی

از آنجا که اکثر تستهای کیفی در ارتباط با بیماریهای عفونی مطرح می‌شوند در این بخش از کتاب به روشهای ارزیابی تست های کیفی بخصوص در زمینه بیماریهای عفونی می‌پردازیم.

برای بررسی آزمایشات بکار رفته جهت بیماریهای عفونی سه جزء برای آزمایشات در نظر گرفته می‌شوند:

- 1- عملی بودن آزمایش شامل بهینه سازی معرفها و پروتوکل
- 2- تعیین شاخصهای عملکرد آزمایش
- 3- پایش یا بررسی مداوم عملکرد آزمایش در حین استفاده روزمره

## 1- مطالعات کاربردی و عملی و آزمایش

در اولین قدم باید مشخص نمود که آیا معرفهای بکار رفته قادرند غلظت ای مختلف آنتی‌بادیهای مربوط به عامل عفونی تحت بررسی، را شناسایی نمایند. این مرحله یک فرآیند سریع بوده و با حداقل نمونه ها قابل انجام می‌باشد و می‌توانند از عملیاتی بودن آزمایش برای مراحل بعدی خبر دهد .

نمونه های به کار رفته برای مطالعه عملی آزمایش

سرم کنترلها (استانداردها)

بوجود آوردن یک تست الایزا جهت بیماریهای عفونی نیازمند وجود سرم ها یا معرفهای لازم برای آن بیماری است. در آزمایشات الایزا غیر مستقیم هدف یافتن آنتیبادی‌هایی است که با آنتی ژنهای از قبل چسبیده به پلیت اتصال می‌یابند. از سوی دیگر تلاش در جهت ایجاد آزمایشی از که بتواند به این نمونه‌های مثبت (حاوی آنتی بادی) و منفی (فاقد آنتی بادی) اختلاف ایجاد نمایند.

در این سری آزمایشات استفاده از چهار تا پنج سرم که از مقادیر بالا تا پایین آنتی بادی بر علیه عامل عفونی را دارا باشند بسیار مفید خواهد بود. از سوی دیگر جهت کنترل منفی، نمونه‌هایی که واقعیت چنین آنتیبادی‌های باشند نیز لازم می‌باشند. در ارتباط با نمونه‌های مثبت می‌بایست به نکاتی نیز توجه داشت. بعنوان مثال از فریز کردن مکرر و تکان دادن شدید نمونه‌ها باید پرهیز نمود تا آنتی بادیهای موجود در نمونه‌ها دچار دناتوراسیون نگردند. تکان دادن سرمها می‌تواند باعث ایجاد حباب و قرار گرفتن آنتیبادیها در قسمت حبابها و کم شدن آن در سایر نواحی سرم گردد. سرمهایی که از فریز خارج می‌شوند باید به آرامی تکان داده شوند.

تکانهای شدید می‌تواند باعث شکسته شدن مولکولهای IgM با افینیتی بالا نیز گردد. در حالیکه IgG های با افینیتی پایین در این نوع از سرمها باقی مانده و با آنتی ژن‌ها بصورت ضعیف واکنش می‌دهند. پس یکی از نکات مهم مسئله حمل فیزیکی نمونه‌ها است که با تکان دادن شدید نمونه‌هایی که آنتی بادیهای مثبت در آن‌ها به مقدار کم وجود دارد می‌تواند به شکل منفی در آید.

## تکرارپذیری

نخستین اقدام در جهت تأیید آماده بودن کیت طراحی شده برای مراحل بعدی، بدست آوردن نتایج قابل تکرار از آن می‌باشد. برای این منظور باید از نمونه‌های یکسان در پلیتهای مختلف و نوبتهای مکرر استفاده نمود. در شرایط ایده آل باید نمونه‌ها را بر روی حداقل ۱۰ پلیت و در ۱۰ نوبت مختلف مورد آزمایش قرار داد. CV کمتر از ۱۵ درصد می‌تواند حاکی از تکرارپذیری مناسب کیت مورد طراحی باشد.

## تنظیم هر یک از پارامترهای آزمایش

برای تعیین غلظت مناسب و صحیح آنتی ژنهای متصل شده به پلیت، سرم، کونژوگه و محلول سوبسترا باید از تیتراسیون چکربورد Chessboard or Checkerboard Titratio(CBT) استفاده نمائیم. در این نوع تیتراسیون هر پارامتر در کنار سایر پارامترها تنظیم گردیده و مقدار مناسب آن برای آزمایش تعیین می‌گردد. آزمایشات دیگری نیز می‌تواند تعیین کننده دمای مناسب به انکوباسیون، زمان، Ph و مولاریتی رقیق‌کننده، محلول شستشو و بافرهای بلوکینگ و تجهیزات بکار رفته اعم از پی‌پتور ها و غیره باشد.

## حساسیت و ویژگی آنالیز

در همین زمینه باید آزمایشاتی در جهت تعیین حساسیت (کمترین مقدار قابل تشخیص آنالیت که تحت بررسی) و ویژگی (عدم ایجاد واکنش متقاطع با سایر آنالیت‌های مرتبط با عوامل عفونی) برای کیت ساخته شده انجام گیرد.

برای تعیین حساسیت از روش آنالیز آخرین تیترا رقت (End point dilution analysis) که در آن با رقیق کردن سرم تا حدی که دیگر آنتی‌بادی را نتوان شناسایی نمود استفاده می‌نمایند.

برای تعیین ویژگی یا اختصاصیت آزمایش نیز از پانل سرم‌هایی استفاده می‌شود که از حیوانات یا افرادی که دارای بیماری‌های مشابه عفونی بوده و احتمال وجود آنتی بادی‌های واکنش دهنده متقاطع در آنها زیاد باشد استفاده می‌نمایند.

## 2- تعیین شاخصهای عملکردی کیت

پس از آن که تست‌های عملی بودن آزمایش، پتانسیل استفاده از آنرا در عمل به اثبات رساند مرحله بعدی تعیین شاخصهای عملکرد برای کیت می‌باشد. در این زمینه باید حساسیت تشخیصی (Diagnostic sensitivity (D-SN) و اختصاصیت یا ویژگی تشخیصی (Diagnostic specificity (D-SP) مشخص شود. در اصل تعداد افراد دارای بیماریست که در آزمایش مثبت شناخته شده‌اند. افراد بیماری را نیز که در آزمایش جواب منفی

گرفته‌اند را اصطلاحاً منفی کاذب (False Negative) تلقی می‌نماییم. D-SP تعداد افراد فاقد بیماریست که در آزمایش نتیجه آنها منفی شده است. در این قسمت نیز افراد غیرآلوده‌ای که پاسخ مثبت گرفته‌اند اصطلاحاً مثبت کاذب (False Positive) می‌نامند. تعداد نمونه‌ای که برای تعیین D-SN و D-SP مورد استفاده قرار می‌گیرند از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. در همین راستا هدف استفاده از آزمایش باید تعریف شود، در مواردی که هدف از آزمایش استفاده از آن برای شناسایی یک بیماری بسیار وخیم عفونی است آستانه‌ای که باعث جداسازی سرم‌های مثبت از سرم‌های منفی می‌گردد را می‌توان پایین قرار داد بطوریکه هیچ فرد آلوده‌ای بعنوان غیر آلوده طبقه‌بندی نگردد. این مسئله نیز منجر به کاهش اختصاصیت سنجش می‌شود.

از سوی دیگر چنانچه آزمایش برای یک بیماری که از شدت اندکی برخوردار است طراحی شده باشد باید حد آستانه آن را بالا گرفت تا فرد غیر آلوده، آلوده تلقی نشود. در این موارد اختصاصیت یا ویژگی بالای آزمایش مورد انتظار بوده و اغلب از آنها به عنوان آزمایشات تأییدی استفاده می‌شود.

### تعیین تعداد سرم مورد نیاز برای محاسبه D-SN و D-SP

مناسب ترین راه برای تعیین حساسیت تشخیصی، ویژگی تشخیصی (D-SP, D-SN) انجام آزمایش بر روی تعداد زیادی سرم رفرانس از هر دو گروه مثبت و منفی، یا آلوده و غیر آلوده می‌باشد. فرمول مورد استفاده برای تعیین حساسیت مطلوب تشخیصی عبارتست از:

$$n = [4 \times ds \times (1 - ds)/e^2]$$

در این فرمول  $n$  تعداد نمونه های مورد نیاز برای آزمایش با روش جدید،  $ds$  حساسیت تشخیصی مورد نظر و  $e$  مقدار خطای مجاز برای حساسیت تشخیصی می‌باشد. بعنوان مثال

چنانچه حساسیت مطلوب ۹۵٪ در نظر گرفته شده باشد و خطای مجاز روش  $\pm 5\%$  باشد، تعداد حیوان یا سرم مورد نیاز برای آزمایش  $[4 \times 0.95 \times (1-0.95)/0.52]$  برابر با ۷۶ نمونه خواهد بود. حال چنانچه بخواهیم از حد مطلوب را به ۹۹٪ با ۲٪ احتمال خطا برسانیم  $[4 \times 0.99 \times (1-0.99)/0.022]=99$  این تعداد به ۹۹ فرد یا نمونه آلوده افزایش می‌یابد. فاکتورهای مختلفی همچون سن، جنس، مرحله عفونت، پاسخهای متفاوت هر یک از افراد نسبت به عفونت، پاسخ های متفاوت میزبان در حالت های مزمن تا حالت های دیگر بیماری و تاثیر تغذیه و محیط همگی بر روی پاسخ آنتی بادی تاثیر می‌گذارند. از این رو باید برای انتخاب تعداد نمونه سعی شود تا موارد فوق مد نظر قرار گیرند. یکی از راههای کاهش خطای ناشی از تستهای آماری، افزایش تعداد نمونه می‌باشد. به همین منظور برای بررسی اعتبار یک روش لازمست تا تعداد کثیری (صد ها) از نمونه دارای آلودگی مورد آزمایش قرار گیرند. در همین قسمت حدود ۱۰۰۰ - ۵۰۰ عدد نمونه سرم مورد نیاز می‌باشد. برای تعیین اختصاصیت یا ویژگی آزمایش نیز باید تعداد کثیری نمونه انتخاب شود که بطور متوسط هزار عدد به طور ایده‌آل تا ۵۰۰۰ نمونه سرم مورد نیاز می‌باشد.

### استاندارد طلایی طبقه بندی افراد غیر آلوده

برای اینکه ثابت شود فرد غیر آلوده می‌باشد باید از یک روش و یا ترکیب چند روش مختلف استفاده کرد. نتایج حاصل از روش جدید باید با سایر روشهای استاندارد مقایسه شده تا آزمایش معتبر گردد. برپایه تعاریف آماری آزمایشاتی که به عنوان استاندارد طلایی بکار رفته‌اند بعنوان متغیر غیر وابسته و روش مورد آزمایش بعنوان متغیر وابسته تلقی می‌گردد.

حال در این سیستم افرادی که به عنوان گروه غیر آلوده شناخته می‌شوند باید دارای شرایط زیر باشند:

- 1- از مناطقی انتخاب شوند که بیماری حداقل برای سه سال در آن محل اندمیک نبوده باشد.
- 2- از افرادی که در طی سه سال اخیر فاقد هرگونه علامتی برای بیماری بوده‌اند و همچنین بر علیه بیماری واکسینه نشده‌اند انتخاب شوند.

3- از نواحی گرفته شوند که در آنها هیچ علامتی از پاسخ آنتی بادی در طی ۲-۳ سال اخیر با آزمایشات مکرر مشاهده نشده باشد.

4- از افرادی که نمونه‌ها گرفته شده باشد که نزدیک به محل اندمیک بوده و افراد در نواحی نزدیک آنها آلوده نبوده باشد.

### استاندارد طلایی برای طبقه بندی افراد به عنوان افراد آلوده

چندین استاندارد مختلف برای استفاده از سرم افراد بعنوان سرم مثبت در نظر گرفته شده است:

- 1- اثبات وجود عفونت: این مسئله بعنوان استاندارد طلایی مطلق تلقی می‌گردد. تنها استاندارد طلایی واقعی برای تلقی نمودن افراد بعنوان افراد مبتلا به بیماری، جدا نمودن ارگانیزم عامل عفونت از افراد و یا داشتن معیار هیستوپاتولوژیک قطعی برای بیماری است.
- 2- سرولوژی مقایسه‌ای (استاندارد نسبی مقایسه‌ای): گاهی جدا نمودن ارگانیزم از فرد کاری غیرممکن یا تکنیکی بسیار سخت و غیر عملی است. در این نوع شرایط، روشهای غیردقیق‌تر می‌توانند بعنوان روش استاندارد برای مقایسه با روش طراحی شده جدید بکار روند. در این سری از موارد که روش جدید با روشهای سرولوژیکی یا با ترکیبی از آزمایشات مورد ارزیابی قرار می‌گیرند، D-SP, D-SN محاسبه شده برای روش جدید را اصطلاحاً حساسیت نسبی تشخیصی و اختصاصیت یا ویژگی نسبی تشخیصی می‌نامند. بدلیل وجود امکان مثبت کاذب و منفی کاذب برای استانداردهای طلایی در این نوع مقایسه، D-SP و D-SN نسبی محاسبه شده از میزان واقعی خود پایین تر هستند.

### آلودگی تجربه یا واکسیناسیون-استانداردی برای مقایسه

استاندارد دیگری که می‌تواند برای پاسخ آنتی بادی مورد استفاده قرار گیرد، سرم‌هایی است که بصورت متوالی در طی چند ماه فرد آلوده یا واکسینه گرفته می‌شد. نقطه قوت این استانداردها در این است که توانایی روش طراحی شده را برای شناسایی تولید آنتی‌بادی در مراحل اولیه داشته و روند پاسخ آنتی بادی بر علیه عامل بیماریزا را نیز مشخص می‌نمایند. از سوی دیگر با این نوع استاندارد می‌توان به ارزیابی درمان نیز پرداخت. در صورتیکه شواهدی دال بر آلوده

بودن فرد وجود داشته و ارگانسیم نیز از فرد جدا شود ولی آنتی‌بادی مشخصی در حین 2- ماه 3 با روش جدید شناسایی نگردد حساسیت آنالیتیکی این روش پایین خواهد بود. ولی چنانچه آنتی‌بادی سریعتر از روشهای دیگر شناسایی گردید این مسئله حاکی از حساسیت بالای روش طراحی شده جدید می‌باشد. تفسیر نتایج به دست آمده از این سری از استانداردها باید با دقت صورت گیرد. نوع سرم مورد استفاده، راه تماس و دوز به کار رفته جزء چندین فاکتور اولیه برای پاسخ آنتی‌بادی تلقی می‌شود که ممکن است با عفونت طبیعی متفاوت باشد. همین مسئله برای واکسیناسیون نیز وجود دارد. بنابر این باید توجه شود که آلودگی تجربی برای ایجاد پاسخ آنتی‌بادی تا حد امکان باید شبیه آلودگی طبیعی بوده تا محاسبات D-SP و D-SN با خطا همراه نباشد. از آنجائیکه این مسئله نیز به سختی امکان پذیر است اطلاعات D-SP و D-SN به دست آمده با این روش نباید به عنوان تنها معیار برای تعیین روش طراحی شده مد نظر قرار گیرد.

### آزمایشات تصادفی افراد مناطق اندمیک بیماری

گاهی معتبرسازی یک روش بدون وجود هر نوع استاندارد برای مقایسه انجام می‌پذیرد. در این موارد معتبرسازی برپایه ابزارهای آماری همچون آنالیزهای خوشه‌ای یا ترکیبی صورت می‌گیرد.

### بررسی تکرار پذیری (Repeatability) و تجدید پذیری (Reproducibility)

پس از مطالعات اولیه کاربردی یا عملی بودن آزمایش و به دست آوردن میزان تکرار پذیری آن می‌بایست از بانک سرمهای مرجع یک سری سرم تهیه و میزانهای D-SP و D-SN با انجام تستهای متوالی در یک آزمایشگاه مشخص شود. این آزمایشات در اصل بیانگر توانایی تکرار پذیری آزمایش طراحی شده می‌باشد. برای بررسی تجدید پذیری می‌بایست تست بر روی سرمها در آزمایشگاههای مختلف صورت گیرد تا میزان تجدید پذیری آن به دست آید.

میزان ضریب تغییرات ۱۵٪ در آزمایشات تکرار پذیری و همبستگی ۹۵٪ بین آزمایشگاههای مختلف بعنوان معیار برای بررسی نتایج ان قبیل آزمایشات تلقی می‌گردد.

## انتخاب آستانه مثبت و منفی (حد آستانه Cut off)

پس از آزمایشات لازم بر روی سرمهای رفرنس می توان به پراکندگی شیوع افراد آلوده و غیر آلوده به بیماری پی برد. از یک منحنی برای ترسیم پراکندگی این دو گروه استفاده نموده که در آن محور عمودی بیانگر تعداد و محور افقی بیانگر نتایج آزمایشات در گروههای مختلف ( ۰-۴٪، ۵-۹٪، ۱۰-۱۴٪ و تا بیست گروه) می باشد. در بخشی از این منحنی دو گروه آلوده و غیر آلوده بر روی یکدیگر قرار می گیرند که چنانچه در درصد کمی از دو منحنی را شامل

(مثلاً ۲٪) این حد آستانه انتخابی را تشکیل می دهد که در میان این ناحیه و D-SP و D- SN هر دو ۹۹٪ خواهد شد. ولی چنانچه این ناحیه بزرگتر و وسیعتر باشد (مثلاً ۱۰٪)، حد آستانه می بایست به سمت چپ و کمتر شدن تعداد منفی کاذب (به نفع D-SN) و سمت راست به منظور کاستن از مثبت های کاذب منتقل شود (به نفع D-SP) که هر دو این مسائل بستگی به هدف آزمایش خواهند داشت.

### چگونه D-SN و D-SP و سایر معیارهای تشخیصی را محاسبه می کنیم؟

پس از مشخص شدن وضعیت بیماری و انجام تست بر روی نمونه های مربوط به افراد بیمار می بایست اطلاعات مختلف زیر گردآوری شده و در یک جدول رسم گردد. (جدول ۲-۳)

TP (True Positive) یا مثبت واقعی: منظور از افراد بیماری می باشند که پاسخ آزمایش آنها نیز مثبت می باشد.

TN (True Negative) یا منفی واقعی: منظور از افراد غیر بیماری می باشند که پاسخ آزمایش نیز در آنها منفی گزارش شده است.

FP (False Positive) یا مثبت کاذب: افراد غیر بیماری می باشند که پاسخ آزمایش آنها مثبت گزارش شده است.

FN (False Negative) یا منفی کاذب: افراد بیماری می باشند که پاسخ آزمایش آنها منفی گزارش شده است. برای محاسبه حساسیت تشخیصی از فرمول زیر استفاده می نمایم.

تست	بیمار	غیر بیمار
-----	-------	-----------

مثبت	TP	FP
منفی	FN	TN

جدول 3-2

$$D-SN = \frac{TP}{(TP + FN)} \times 100$$

و برای محاسبه ویژگی تشخیصی از فرمول زیر

$$D-SP = \frac{TN}{(TN + FP)} \times 100$$

استفاده می شود .

معیار های دیگری نیز برای بررسی تست های تشخیصی کیفی مورد استفاده قرار می گیرند که از آن میان می توان به موارد زیر اشاره نمود:

- مقدار پیش بینی (Predictive Value)

ارزش پیشگویی کننده مثبت (Positive Predictive Value) : این مقدار در تستهای مثبت در اصل بیانگر درصد افراد بیمار است که بدرستی با آزمایش، جواب مثبت گرفته اند و از فرمول زیر برای محاسبه آن استفاده می شود

$$PPV = \frac{TP}{(TP + FP)} \times 100$$

ارزش پیشگویی کننده منفی (Negative Predictive Value): این مقدار در تستهای منفی بیانگر افراد غیر بیمار است که بدرستی توسط آزمایش، منفی طبقه بندی شده اند و از فرمول زیر برای محاسبه آن استفاده می شود.

$$NPV = \frac{TN}{(TN + FN)} \times 100$$

### - میزان کارایی (Efficiency)

کارایی کلی یک تست تشخیصی در اصل به درصد افرادی که توسط آزمایش به طور صحیح بیمار و یا سالم تشخیص داده شده‌اند اطلاق شده و در آن میزان شروع بیماری نیز دخالت دارد. برای محاسبه این میزان از فرمول زیر استفاده می‌نمائیم.

$$EF = \frac{(TP + TN)}{(TP + FP + TN + FN)} \times 100$$

### - اندیکس یودنس (Youden's)

اندیکس یودنس برخلاف میزان کارایی بدون توجه به شیوع بیماری نشانگر درصد افراد سالم یا بیماری است که صحیح تشخیص داده شده‌اند.

$$J = Se + Sp - 1$$

در این تساوی Se حساسیت و Sp ویژگی است.

### - نسبت‌های احتمالی (Likelihood Ratios)

نسبت‌های احتمالی بعنوان پارامترهای مهمی برای تعیین میزان صحت یک آزمایش طرح می‌گردد.

نسبت‌های احتمالی نتایج مثبت آزمایش: این نسبت در اصل به نسبت احتمال وجود بیماری به احتمال عدم وجود بیماری در موارد پاسخ مثبت آزمایش می‌باشد  $LR+ = Se / (1 - Sp)$

نسبت‌های احتمالی نتایج منفی آزمایش: این نسبت نیز همانند مورد اول بوده ولی در مورد آنهایی بکار می‌رود که جواب آزمایش منفی شده است  $LR- = (1 - Se) / SP$

پایش یا بررسی مداوم عملکرد آزمایش در حین استفاده روزمره

آخرین بخش در ارزیابی کیت‌های کیفی، بررسی مداوم عملکرد آزمایش در حین کاربرد روزانه آن است. این بخش با انجام آزمایشات تکرارپذیری و بررسی حساسیت آزمایش در فواصل زمانی مناسب صورت می‌گیرد.

### تست‌های کنترل کیفی الایزا توسط مصرف کننده

مرحله دوم در پروسه کنترل کیفی کیت‌های الایزا فرایندهای تضمین کیفیت و کنترل کیفیت است که ضرورت دارد هم در حین تولید و هم در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی رعایت شوند.

### کنترل کیفی داخلی (Internal QC)

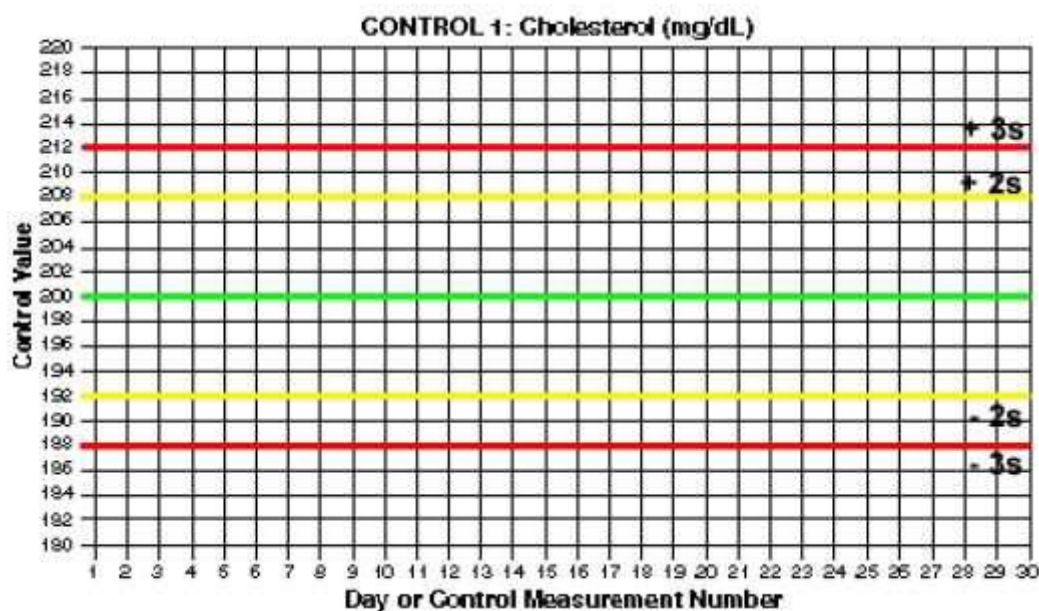
سیستم کنترل کیفیت داخلی به گونه‌ای طراحی می‌شود و از دامنه قابل قبول صحت و دقت آزمایش اطمینان حاصل شود. (بخصوص در غلظت‌هایی که از نظر بالینی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردارند). در این سیستم باید بطور منظم عملکرد دستگاهها، پایداری مواد، تکنیک، شرایط آزمایش، حمل نمونه و تمامی فاکتورهایی که به هر شکل می‌توانند بر آزمایش تاثیر بگذارند تحت بررسی قرار گیرد.

در این سیستم نمونه‌های کنترلی که دارای دامنه غلظت مهمی از نظر بالینی هستند باید در هر سری آزمایش و یا به صورت منظم در یک دوره مشخص مورد آزمایش قرار گیرند. این نوع نمونه‌ها می‌توانند یک شمای کلی از گذشته تا حال آزمایش انجام شده را نشان دهند و با مقایسه نتایج با نتایج قبلی می‌توان به قضاوت در مورد نتیجه آزمایشات پرداخت. مفیدترین و شایعترین شکل نمایش نتایج بدست آمده و پارامترهای آماری مربوطه، به شکل منحنی Shewhart می‌باشد. نخستین بار مورد استفاده قرار گرفت و بعداً توسط شخصی بنام Levey-Jennings به آزمایشگاه بالینی انتقال یافت.

در این نوع منحنی باید میانگین و انحراف معیار کنترلها را در طی مدت ۲۰ روز محاسبه نمود و نتایج را بر روی محور عمودی و تاریخ را بر روی محور افقی نمایش داد. در این منحنی میانگین در وسط و تا سه انحراف معیار در بالا و سه انحراف معیار در پایین خط میانگین کشیده می‌شود. منحنی‌های کنترلی بهترین روش برای شناسایی مشکلاتی همچون سوگرایی (Bias) و یا دقت کم آزمایش (Poor Precision) می‌باشند. جهت تفسیر نتایج حاصل از

منحنی‌های کنترل کیفی و تصمیم‌گیری بر روی نتایج آنها مفیدترین و شایعترین روش مورد استفاده Multi rules shewhart یا Westgard analysis می‌باشد.

در این نوع آنالیز بر روی معیارهایی که باعث قبول و یا رد شدن نتایج می‌شوند بحث می‌گردد.

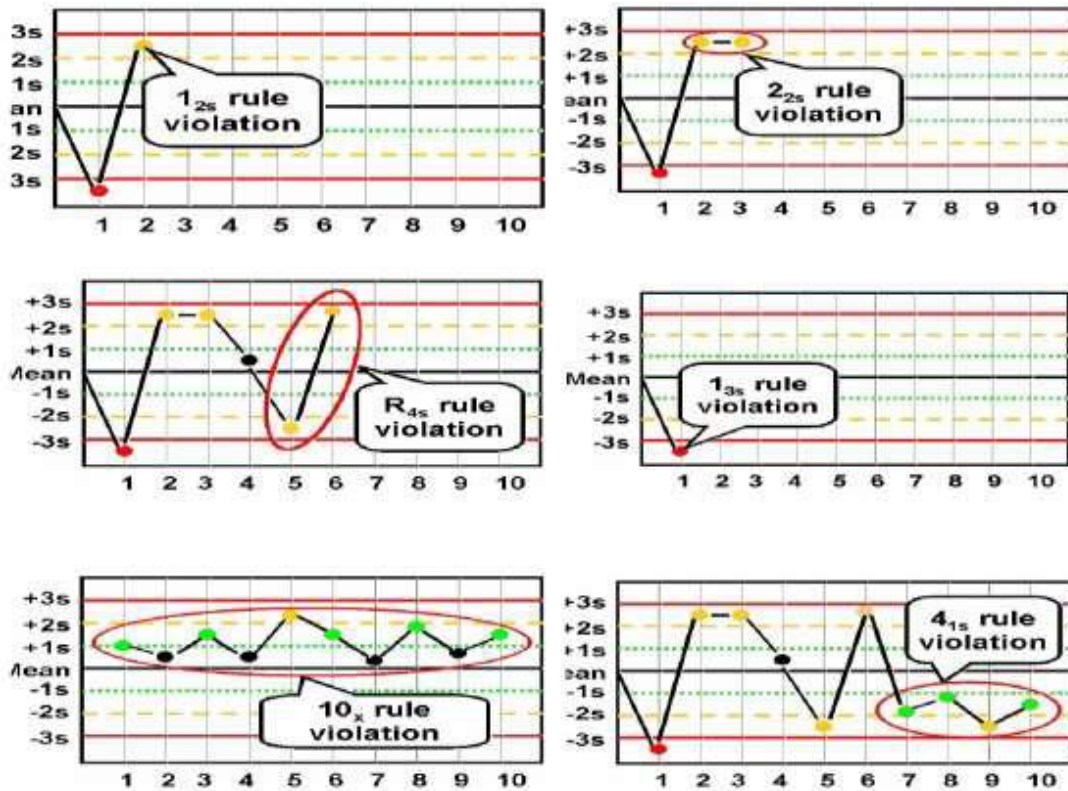


شکل 3-5. منحنی Shewhart یا Levey Jennings

### آنالیز وستگارد (Westgard)

در آنالیز Westgard، ۶ معیار برای قبول و یا رد نتایج مدنظر قرار می‌گیرد.

قانون 13s: در این قانون چنانچه مقدار یک کنترل از حد  $+3SD$  یا  $-3SD$  خارج شده باشد نتایج غیرقابل قبول می‌باشد.



شکل 3-6

**قانون 1<sub>2s</sub>:** در این قانون چنانچه مقدار کنترل از  $+2SD$  یا  $-2SD$  رد شده باشد علامت هشدار دهنده تلقی شده و باید برای سایر معیارها، منحنی مورد بررسی قرار گیرد.

**قانون 2<sub>2s</sub>:** زمانیکه مقدار کنترل در دو نوع نوبت آزمایش بیشتر از  $\pm 2SD$  باشد نتایج غیر قابل قبول هستند.

**قانون 4<sub>1s</sub>:** در این قانون چنانچه مقدار کنترل در چهار روز متوالی مقداری بیش از  $+1SD$  و یا کمتر از  $-1SD$  داشته باشد نتایج غیر قابل قبول خواهد بود.

**قانون R<sub>4s</sub>:** در این قانون چنانچه اختلاف مابین نتایج کنترل با نتایج روز قبل آن بیش از  $4SD$  باشد نتایج رد خواهد شد.

قانون  $10\bar{X}$ : در این قانون چنانچه نتایج بدست آمده است کنترل در 10 روز متوالی بیشتر یا کمتر از حد میانگین باشد نتایج غیر قابل قبول خواهد بود .

در معیارهای بیان شده از سوی Westgard یکسری از معیارها نشاندهنده خطاهای تصادفی یا Random هستند همانند  $13s$  و  $R4s$  یکسری نشاندهنده خطاهای سیستمیک می‌باشند، همچون  $41s$ ،  $10\bar{X}$  و  $22s$

از آنجاکه نتایج حاصل از منحنی‌های Shewharts یا Levey-Jennings charts نسبت به تغییرات اندک حساس نیستند، منحنی دیگری مورد استفاده قرار گرفت که بنام منحنی Cusum مشهور می باشد .

این نوع منحنی اکثراً برای وجود سوگرایی سیستمیک (Systemic Bias) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این نوع منحنی بجای رسم تک تک نتایج بدست آمده از کنترل، اختلاف آنها با میزان هدف محاسبه و با مقادیر حاصل از اختلاف نتایج قبلی جمع می‌شود. حاصل جمع‌های بدست آمده سبب افزایش میزان اختلافات و آشکار شدن خطاهای سیستم در نتایج می‌گردد.

از آنجائیکه نتایج بدست آمده از منحنی‌های Cusum به سختی قابل تفسیر می‌باشد، این نوع منحنی کاربرد چندانی در آزمایشات سنجش ایمنی ندارد .

### کنترل کیفی خارجی (External QC)

سیستم کنترل کیفی خارجی یک ارزیابی مستقل از عملکرد آزمایشگاه می‌باشد و به عنوان مکملی برای سیستم کنترل کیفی داخلی محسوب می‌شود. در این سیستم ، نمونه های کنترل کیفی یکسانی به کلیه آزمایشگاهها ارسال می‌شود که در این آزمایشگاهها باید همانند سایر نمونه های خود این کنترلها را هم تحت آزمایش قرار داده و نتایج را گزارش نمایند. دو سیستم کنترل کیفی داخلی و خارجی به عنوان دو جزء ضروری برای ارزیابی کیفیت و بازده آزمایشات

مطرح می‌باشند. در این سیستمها معمولاً سیستم کنترل کیفی داخلی دقت آزمایشگاه و سیستم کنترل کیفی خارجی صحت آزمایشگاه را مورد بررسی قرار می‌دهند.

## نکات عملی و رفع مشکل در تست های الایزا

### نکات عملی در تست های الایزا

#### 1- جمع آوری و نگهداری نمونه

تقریباً تمام سنجش های ایمنی از سرم به عنوان نمونه استفاده می نمایند با این حال گاهی ممکن است آزمایشگر به دلایلی نظیر کافی نبودن میزان سرم و یا پرهیز از نمونه گیری مجدد از نمونه پلاسما برای سنجش یک آنالیت استفاده نماید. در اینگونه موارد باید بروشور کیت به دقت بررسی شود تا نوع نمونه توصیه شده برای آن سنجش خاص مشخص گردد بویژه اگر در کیت استفاده از پلاسما نیز توصیه شده باشد باید مشخص شود که از چه نوع ماده ضد انعقادی می توان برای بدست آوردن پلاسما استفاده کرد. اگر پلاسما با استفاده از سیترات سدیم تهیه شده باشد به دلیل رقیق شدن پلاسما ممکن است سنجش با صحت کافی انجام نشود. برخی از ضد انعقاد ها بر سنجش تاثیر سوء دارند برای مثال در استفاده از پلاسمایی که از EDTA به عنوان ضد انعقاد استفاده شده است باید با احتیاط برخورد شود. EDTA به شلات کننده قوی یونهای فلزی است و روی (Zn) کو فاکتور آنزیم آلکالن فسفاتاز را مهار می نماید.

- فلورید سدیم که به عنوان نگهدارنده قند استفاده می شود می تواند فعالیت آنزیم اوره آز را مهار کند بنابراین در سنجش هائی که از آنزیم اوره آز به عنوان ماده نشانگر استفاده شده است تداخل می کند. علاوه بر این باید توجه داشت که سدیم آزاید یک مهارکننده قوی آنزیم پراکسیداز است و هرگز نباید در سنجش هائی که نشانگر آنزیمی آن پراکسیداز است از نمونه حاوی سدیم آزاید استفاده شود.

- در هنگام گرفتن نمونه باید توجه شود که طولانی شدن بستن تورنیکه ممکن است منجر به تغییر در پروتئین های حامل در خون شود که این مسئله در سنجش برخی از آنالیت ها تاثیر می گذارد.

- گاهاً لیپمی در سنجش برخی از آنالیت ها تداخل می نماید بویژه زمانی که آنالیت مورد سنجش یک مولکول آب گریز است. در این شرایط توزیع آنالیت بین دو فلز آب گریز و آب دوست به دلیل وجود لیپیدمختل می شود. در مورد برخی از آنالیت ها به پروتئین حامل متصل می شوند برخی از عناصر سرمی نظیر اسید چرب آزاد ممکن است در اتصال آنالیت به پروتئین حامل تداخل نماید و سبب سنجش کاذب میزان آنالیت آزاد شود. این اثر در سنجش هورمونهای تیروئیدی که بصورت آزاد در سرم وجود دارند اهمیت دارد بنابراین ممکن است که در اندازه گیری برخی از آنالیت ها وضعیت ناشتائی ضروری باشد.
- در زمان جداسازی سرم از لخته باید از ایجاد همولیز اجتناب شود چرا که همولیز می تواند یک عامل مداخله گر در سنجش های ایمنی آنزیمی باشد. هموگلوبین به دلیل ماهیت پروتئینی، فعالیت پراکسیدازی و همچنین به دلیل وجود مولکول آهن و هم (Heme) علاوه بر اثر تداخلی می تواند سرعت واکنش پراکسید هیدروژن و کروموژن را تسریع کند و بطور کاذب باعث افزایش جذب نوری شود. علاوه بر این هموگلوبین واکنش آنتی ژن و آنتی بادی را دستخوش تغییر می کند و زمان به تعادل رسیدن واکنش را افزایش می دهد. همولیز بویژه در سنجش هورمون T4 آزاد (Free T4) اثر دارد که سنجش آنرا بطور کاذب کاهش می دهد .
- در هنگام نمونه گیری باید به تغییرات روزانه، فیزیولوژیک و تاثیر داروها بر برخی از آنالیت ها توجه نمود.
- اکثر آنالیت های قابل اندازه گیری با روش سنجش ایمنی آنزیمی تا حدودی در درجه حرارت اتاق و یخچال (8 - 2 درجه) پایدار هستند. با این حال در مورد برخی از آنالیت ها نظیر ACTH و PTH باید نکات خاصی رعایت شود. برای مثال در مورد ACTH حداکثر زمان مجاز برای نگهداری نمونه پلاسما بر روی خون 2 ساعت توصیه شده است و در این حالت نیز باید حداکثر ظرف مدت 30 دقیقه پس از نمونه گیری برای جداسازی پلاسما عمل سانترفیوژ انجام شود. بهتر است که در صورت نگهداری پلاسما روی خون به مدت بیشتر از 2 ساعت این عمل در یخچال انجام شود. پایداری ACTH پس از جدا شدن از خون در یخچال و حتی در فریزر 20- درجه مناسب نمی باشد و باید توجه داشت که نمونه پلاسما برای سنجش ACTH باید در لوله های پلاستیکی نگهداری شود.

با این حال اغلب آنالیت‌ها نظیر TSH, T3, T4, PRL, FSH, LH در درجه حرارت یخچال تا یک هفته در فریزر 20- درجه تا چندین ماه پایدار می‌مانند.

- از دوباره ذوب و فریز کردن سرم باید پرهیز شود، اما برخی از آنالیت‌ها نسبت به فریز و ذوب شدن مجدد مقاوم هستند، مثلاً پروژسترون کاهش 1 درصدی را در هر بار فریز یا ذوب شدن نشان می‌دهد. این امر در مورد تستوسترون نیز صادق است.

## 2- نکات مهم در مورد نحوه صحیح کار با سمپلر

اضافه نمودن معرف ها و نمونه به چاهک‌های الیزا یکی از مهمترین عوامل در اجرای یک سنجش صحیح و دقیق است. با توجه به اینکه این عمل توسط سمپلر انجام می‌شود قبل از انجام هر آزمایش باید از کالیبر بودن سمپلر اطمینان حاصل شود.

برای استفاده بهینه از سمپلرها 10 نکته می‌تواند مفید واقع شود. این نکات عبارتند از:

1- پیش مرطوب کردن (Prewet) نوک سمپلر ها معمولاً در سمپلرهایی که برای حجم‌هایی بیش از 10 میکرولیتر استفاده می‌شوند باید 2 تا 3 مرتبه نوک جدید را با نمونه پر و خالی نمود.

2- در دمای اتاق کار کنید. کلیه مواد و وسایل باید به دمای اتاق برسند.

3- معاینه نوک‌ها قبل از ریختن نمونه: به آرامی کناره‌های نوک را با دستمال تمیز کنید و مراقب باشید دستمال با نوک سمپلر تماس نیابد.

4- روش استاندارد استفاده از سمپلر به کار رود. در مواردیکه نمونه‌ها غلیظ یا چسبنده باشند، از روش معکوس نیز می‌توان استفاده کرد که در آن ابتدا پیستون را تا انتها فشار داده نمونه را کشیده بعد با فشردن تا اولین ایست نمونه را خالی می‌نماییم.

5- توقف یکسان پس از هر بار کشیدن: پس از هر بار کشیدن نمونه باید بطور یکنواختی یک لحظه تامل نمود و بعد نمونه را در لوله یا در ظرف هدف خالی کرد.

6- سمپلر را مستقیم از داخل نمونه خارج کنید. باید دقت شود تا نمونه با کناره‌های سمپلر تماس حاصل نکند.

7- تماس دست با نوک سمپلر و سمپلر را به حداقل برسانید این امر به دلیل جلوگیری از انتقال حرارت بدن شما به نوکها و یا سمپلر و بر هم خوردن ظرفیت آنها می باشد.

8- نوک سمپلر را تا حد صحیح در نمونه پایین ببرید. معمولا مقدار صحیح حدود 2-5mm پایین تر از تقعر سطح نمونه در لوله است.

9- از نوک سمپلر مناسب استفاده نمایید. باید تنها نوکهایی که کاملا با سمپلر فیت می شوند استفاده شوند.

10- از سرعت و فشار ثابت برای فشردن پیستون سمپلر استفاده نمایید. برای هر سمپلر از فشار و رها سازی ملایمی برای کشیدن نمونه ها و خالی کردن آنها استفاده کنید.

در موقع ریختن معرف ها و نمونه باید به نکات زیر توجه شود:

- فقط از اولین مکث سمپلر استفاده شود بدین معنی که برای تخلیه حجم برداشتی پیستون سمپلر را فقط تا مکث اول به پائین فشار دهیم. در صورتی که پیستون تا مکث دوم پائین آورده شود ایجاد حباب می نماید که در سیستم سنجش تداخل می کند.
- معرف ها و نمونه نباید از بالا به داخل چاهک چکانده شود.
- نوک سمپلر نباید از بالا با ته چاهک تماس یابد.
- نوک سمپلر نباید با زاویه ای شدید به دیواره چاهک تماس داده شود. در این صورت ممکن است که مقداری از سرم یا معرف به دیواره باقی بماند .

در صورتی که از سمپلرهای چند کاناله استفاده می شود باید حتما سطح مایع در تمام نوک سمپلرها چک شود و برای وجود حباب و یا بسته بودن نوک سمپلر بررسی شود. برای برداشت حجم مناسب، پیستون سمپلر را تا مکث اول به طرف پائین فشار دهید و برای خالی کردن حجم برداشته شده نیز تا مکث اول پیستون را به طرف پائین فشار می دهیم.

### 3- نکات مهم در مورد شستشو

- عملیات شستشو جهت جدا کردن ترکیبات اتصال یافته به کف چاهک از ترکیباتی که متصل نشده اند صورت می گیرد. این عمل با خالی کردن چاهک از محتویات داخل آن و سپس اضافه نمودن محلول شستشو به چاهک انجام می شود.

- قبل از هر چیزی باید به روش تهیه محلول شستشو که در بروشور کیت ذکر شده است توجه شود. محلولهای شستشو اغلب به صورت غلیظ تهیه شده و باید توسط آزمایشگر رقیق شوند. تهیه محلولهای شستشو اغلب به صورت مناسب در سنجش های ایمنی بسیار اهمیت دارد چرا که محلول شستشوی غلیظ تر از حد توصیه شده، منجر به تخریب و جداسدن مولکولهای اتصال یافته می شود و جذب نوری کاهش می یابد. در مقابل کاهش توانائی محلول شستشو به دلیل رقیق سازی زیاد، باعث عدم جداسدن اتصالات غیراختصاصی و ایجاد جذب زمینه ای بالا می شود.
- مرحله شستشو باید حداقل سه بار برای هر چاهک انجام شود. بعد از هر بار اضافه کردن محلول به چاهک، محلول اضافی تخلیه شده و یا آسپیره گردد. در آخرین مرحله از شستشو و پس از خروج کامل محلول از چاهک با برگرداندن پلیت، باید محلول اضافی داخل چاهک را با کوبیدن بر سطح یک کاغذ یا دستمال نم گیر خالی نمائید.
- در هنگام شستشوی چاهک ها باید اطمینان حاصل شود که محلول تمام چاهک ها را پوشانده است. از سر ریز شدن محلول چاهک ها باید اجتناب شود.
- در برخی روشها برای شستشوی بهتر، یک زمان انتظار بنام Soak time ذکر می شود بدین ترتیب که پس از ریختن محلول درون چاهک ها مدتی صبر کرده و بعد چاهک را خالی می کنیم. این زمان از 30 ثانیه تا چند دقیقه متغیر است. در صورتی که این زمان توصیه شده باشد باید حتما رعایت گردد.
- در مورد شستشوی اتوماتیک با دستگاه واشر حتما باید توجه شود که سرعت ریختن محلول و آسپیراسیون محلول تنظیم باشد چرا که افزایش یا کاهش این سرعت بر سنجش تاثیر خواهد داشت.
- به دلیل اینکه در محلول شستشو از دترژنت استفاده می شود در هنگام تهیه محلول شستشوی آماده کار ممکن است که کف یا حباب ایجاد شود. از وارد شدن حباب یا کف به داخل چاهک ها باید جلوگیری شود چون این حباب سطح تماس محلول را با چاهک کم نموده و اثرات شستشو را کاهش می دهند.

- قبل از شروع عملیات شستشو پیشنهاد می شود که pH آب مقطر مه برای رقیق کردن محلول استفاده کی می شود، و نیز pH محلول شستشوی آماده کار چک شود. در صورتی که pH محلول شستشو بسیار اسیدی یا قلیائی باشد بر سنجش تاثیر می گذارد. در صورتی که بر طبق توصیه تولید کننده کیت، از آب مقطر به عنوان محلول شستشو استفاده می نمائید حتما pH آب را چک نمائید.

#### 4- نکات مهم در مورد میکروپلیت

- پس از خارج ساختن پلیت از یخچال به دلیل تغییرات سریع درجه حرارت ممکن است بر سطح چاهک ها بخار تشکیل شود که پایداری پلیت به دمای اتاق آنرا از کیسه مخصوص نگهداری پلیت خارج نکنید.
- پس از استفاده از پلیت، باقیمانده چاهک ها را سریعا به یخچال منتقل نمائید. دقت نمائید که در کیسه مخصوص پلیت، نمگیر وجود داشته باشد.
- در موقع خوانش پلیت حتما با یک دستمال مرطوب بدون پرز زیر چاهک را تمیز نمائید.
- در بین مراحل سنجش نباید وقفه ای ایجاد شود چرا که ممکن است منجر به تبخیر محتویات چاهک ها شود.
- در مرحله انکوباسیون سوبسترای TMB به هیچ وجه از فویل برای پوشاندن سطح پلیت استفاده ننمائید.

#### 5- نکات مهم در مورد سوبسترا و کنژوگه آنزیمی

- در موقع رقیق کردن کنژوگه غلیظ و تهیه کنژوگه آماده کار به پایداری ذکر شده آن در بروشور کیت توجه شود.
- کنژوگه را فقط با محلول رقیق کننده که توسط تولید کننده توصیه شده است رقیق نمائید.
- سوبستراهای دو محلولی را بر طبق روش گفته شده در بروشور تهیه نموده و به مدت زمان پایداری آن پس از تهیه توجه نمائید.

- از مخلوط کردن دو سوبسترا یا دو کنژوگه آنزیمی از دو سری ساخت با شماره های مختلف اجتناب نمائید.
- برای تهیه کنژوگه آماده کار و یا سوبسترای آماده کار حتما از ظروف تمیز استفاده کنید.
- برای تعیین کارائی کنژوگه پراکسیداز و سوبسترای TMB به ترتیب زیر عمل نمائید:
  - به دو لوله تمیز مقدار 200 میکرولیتر از سوبسترای آماده کار اضافه کنید. درمورد TMB این سوبسترا باید شفاف و بدون رنگ باشد.
  - به یکی از لوله ها 10 میکرولیتر از کنژوگه آماده کار اضافه کنید. پس از چند دقیقه رنگ آبی حاصل می شود.
  - به همان لوله 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه کنید. رنگ آبی به زرد تبدیل میشود.
  - به لوله دوم که حاوی 200 میکرولیتر سوبسترا است 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمائید. هیچگونه تغییر رنگی نباید حاصل شود.
  - در صورتی که نتایجی غیر از موارد ذکر شده مشاهده شد با تولید کننده کیت تماس حاصل نمائید.

## راهنمای حل مشکلات در الایزا

در این مبحث به سرفصل های مهم مشکلات موجود در یک سنجش ایمنی آنزیمی اشاره گردیده و علل احتمالی هر یک از این موارد ذکر می شود - در ادامه روش های موجود برای بر طرف کردن مشکلات ذکر خواهند شد و بررسی قدم به قدم برای رسیدن به علت مشکل به همراه یک لیست کنترل اطلاعات بیان می گردد.

### 1-عدم وجود سیگنال یا کاهش سیگنال

#### علل احتمالی

- کاهش فعالیت ردیاب: اگر شکل منحنی طبیعی است میزان فعالیت در ماده نشاندار باید چک شود. در مورد روش الایزا با اضافه نمودن کنژوگه آنزیمی به سوبسترای رنگ زا می توان از فعالیت آنزیمی آگاه شد (در مورد آنزیم پراکسیداز و سوبسترای TMB).
- غلظت زیاد آنتی ژن در ماده نشاندار در سنجش های رقابتی : در صورتی که رقیق کردن ماده نشاندار منجر به تشکیل منحنی کالیبراسیون با شکل طبیعی شود باید به این موضع شک کرد.
- ویژگی پائین ماده نشاندار: این امر به طور طبیعی توسط سازنده کیت چک می شود.
- غلظت کم آنتی بادی نشاندار در سنجش های ایمونومتریک: باعث غیر خطی و صاف شدن منحنی کالیبراسیون در غلظت های بالا می شود.
- کاهش غلظت آنتی بادی کوتینگ: در یک سنجش ایمونومتریک باعث غیر خطی و صاف شدن منحنی کالیبراسیون در غلظت های بالا می شود و در سنجش رقابتی نیز اتصال آنالیت به میزان کافی صورت نمی پذیرد.
- غیرفعال شدن آنزیم یا سوبسترا یا وجود مهارکننده در سنجش آنزیمی: این امر با طبیعی بودن شکل منحنی اما سیگنال پائین مشخص می شود. (در حالت عادی با اضافه نمودن مقدار کمی کنژوگه آنزیمی به سوبسترای کروموژن طی چند دقیقه رنگ حاصل می شود به عنوان مثال در صورتی که کنژوگه HRP و سوبسترا TMB باشد رنگ آبی پدید می آید.)

- سیستم جداسازی ناقص: در این مورد احتمالاً محلول شستشو غلیظ تهیه شده است که در این صورت دقت درون سنجی (within-assay precision) نیز مختل شده و ضعیف می باشد، به عبارت دیگر سنجش از عدم دقت برخوردار است.
- خراب شدن زود هنگام معرف ها قبل از تاریخ انقضاء یا نگهداری نامناسب کیت: در صورتی که کیت قبل از تاریخ انقضاء دچار زوال شده باشد دقت و میزان سیگنال کیت مختل می شود. چنانکه کیت در حرارت های بسیار بالا یا پائین نگهداری شود منجر به تخریب برخی از معرف ها می شود که این موضوع با کاهش سیگنال همراه است. در این حالت باید کیت را با یک کیت جدید که نحوه انتقال و نگهداری آن مناسب بوده است تعویض نمود.
- آلودگی متقاطع بین دو معرف: معمولاً این حالت به دلیل جا به جایی معرف ها از کیت های با سری ساخت های متفاوت رخ می دهد و یا آلودگی ظروف مورد استفاده در رقیق سازی معرف ها می تواند باعث این امر گردد. وسایل انتقال دهنده از جمله پی پیت ها، نوک سمپلرها و ... را چک نموده و در صورتی که کاملاً تمیز بودند معرف ها را جایگزین نمائید.
- نگهداری غیر صحیح معرف ها یا یخچال معیوب: افزایش یا کاهش در درجه حرارت باعث تخریب معرف های کیت می شود. در این حالت باید بررسی کرد که درجه حرارت نگهداری کیت ها صحیح باشد.
- استفاده از حجم های کمتر معرف: در این مورد حجم معرف های مورد استفاده کمتر از آنچه که در بروشور کیت توصیه شده، استفاده شده است (سپهوا یا عمدا). در این حالت توصیه می شود که حجم های برداشتی دقیقاً مشابه به آنچه که در کیت گفته شده است باشد و سمپلرهای مورد استفاده مالیده شود.
- استفاده از کیت تاریخ گذشته: در این حالت پس از چک کردن تاریخ انقضاء کیت از کیت جدید استفاده نمائید.
- آلودگی ظروف معرف ها یا آب مقطر به دترژنت، گندزداها یا مواد کشیف: در این مورد باید ظروف را با دقت کنترل نمود و فرآیند شستشوی ظروف را تحت کنترل قرار داد.
- کالیبراتورهای بیش از اندازه غلیظ ( در روش رقابتی) و یا بیش از اندازه رقیق ( در روش ایمونومتريک): این امر ممکن است به دلیل حل کردن نادرست و یا خراب شدن

کالیبراتورها رخ دهد در این حالت باید کالیبراتورهای که دارای عدم صحت هستند را با کالیبراتورهای مناسب جایگزین نمائید.

- عدم تهیه درست معرف ها و یا حذف یک مرحله از رقیق سازی (بوئژه در مورد معرف های لیوفیلیزه): کلیه ی مراحل برطبق پروتکل کیت چک شود.
- حذف تصادفی ماده نشاندار از مراحل آزمایش یا اضافه کردن ماده نشاندار اشتباهی: پروتکل کیت مجددا چک شود.
- تغییرات در پروتکل پیشنهادی کیت: ممکن است تغییر در زمان یا درجه حرارت انکوباسیون و یا انکوباسیون تصادفی در درجه حرارت های بالا یا پائین صورت پذیرد مثلا آزمایش در انکوباتوری که روشن نشده است انجام شود. در این حالت اختلافات بین پروتکل انجام شده با پروتکل موجود در کیت باید بررسی شود. این تغییرات معمولا بر دقت سنجش نیز اثر می گذارد.
- خراب بودن دستگاه خوانش: در این حالت به دلیل کالیبره نبودن دستگاه مقادیر سیگنال بطور واقعی ارزیابی نمی شود.
- استفاده از طول موج نادرست در خوانش چاهک های الایزا در دستگاه الایزا ریدر: در صورتی که طول موج مورد استفاده کاملا با طول موج پیشنهادی پروتکل بکسان نباشد این مشکل بوجود می آید. برای مثال خواندن چاهک ها در طول موج 405 نانومتر به جای 450 نانومتر باعث کاهش جذب نوری شده می شود در حالی که رنگ چاهک ها از نظر چشمی مناسب است.

### مراحل پیشنهادی برای تعیین مشکل

- اطلاعات حاصل از حداقل دو سنجش برای اثبات پائین بودن سیگنال باید مورد تجزیه قرار گیرد و دقت درون سنجی نیز در صورتی که نمونه ها و کالیبراتورها به صورت دوپلیکت انجام شده است مورد توجه قرار گیرد. در صورت امکان باید ثابت کرد که آیا سیگنال تام پائین است و یا دقیقا کالیبراتورها و کنترل ها دارای سیگنال پائین است. این تفاوت قادر است سیگنال پائین ناشی از ظرفیت اتصال پائین را از ضعف ماده نشاندار افتراق دهد. به نحوی که اگر سیگنال تام مناسب باشد ولی سیگنال کالیبراتور ها پائین باشد نشانه ظرفیت

پائین اتصال است اما در صورتی که سیگنال تام نیز پائین باشد نشانه ضعف در ماده نشاندار است.

- در مرحله بعد هرگونه ارتباط بین عدم وجود سیگنال یا سیگنال ضعیف با دیگر فاکتورها نظیر عملکرد پرسنل یا تاریخ مصرف معرف ها چک شود.
- تفاوت های بین پروتکل انجام شده و آنچه که در بروشور کیت ذکر شده است تعیین شود و مشخص شود که آیا تکرار تست نیز طبق روش پیشنهادی کیت انجام شده است؟
- با سازنده کیت در مورد میزان سیگنال قابل انتظار برای کیت و برای معرف هائی که مدتی از تاریخ ساخت آنها گذشته است مشورت شود و مشخص شود که آیا دیگر مصرف کننده ها نیز چنین مشاهده ای داشته اند یا خیر؟

### لیست کنترل اطلاعات

در این لیست باید:

- شماره ساخت معرف ها و کیت و تاریخ انجام سنجش نوشته شود.
- زمان بوجود آمدن مشکل ذکر شود.
- چارت کنترل کیفی درمورد کیت وجود داشته باشد.
- پرینت از تمام سنجش های قبل از مشکل و در طی ایجاد مشکل وجود داشته باشد.
- توضیحاتی درمورد اختلافات بین پروتکل مورد استفاده و پروتکل موجود در کیت داده شود.
- وسایل و دستگاههای مورد استفاده ذکر شود.
- اطلاعاتی در باره تغییرات همزمان در پروتکل، دستگاه یا پرسنل ذکر شود.

### 2- ظرفیت اتصال پائین در روش های رقابتی

علل احتمالی:

- بهینه سازی یا طراحی ضعیف کیت: در این حالت مقایسه منحنی کالیبراسیون با منحنی تیپیک ارائه شده در کیت کمک کننده است.

- زوال زودرس معرف ها پیش از زمان انقضاء کیت: معمولاً این حالت به دلیل نگهداری نامناسب صورت می پذیرد که مطالب مربوط به این علت در مبحث قبلی ذکر شده است.
- غلظت زیاد آنتی ژن در ماده نشاندار و یا وجود دیگر نواقص در معرف نشاندار شده: اگر غلظت آنتی ژن زیاد باشد رقیق سازی ممکن است شکل منحنی را طبیعی کند. وجود نواقص دیگر در ماده نشاندار می تواند بوسیله جایگزینی با ماده نشاندار مناسب تایید شود.
- فعالیت اختصاصی پائین ماده نشاندار: ایت امر بطور طبیعی توسط سازنده کیت چک می شود.
- غیرفعال شدن آنزیم و یا وجود مهارکننده آنزیمی در سنجش آنزیمی: این مشکل با ظهور یک منحنی کالیبراسیون با شکل طبیعی ولی سیگنال پائین مشخص می شود.
- نقص در کوتینگ چاهک ها: این مشکل علاوه بر کاهش سیگنال موجب عدم دقت در سنجش نیز می شود.
- استفاده از کیت تاریخ گذشته: تست باید با کیت تازه انجام شود.
- نگهداری نادرست معرف ها یا نگهداری در یخچال خراب: درجه حرارت نگهداری کیت ها باید چک شود.
- آلودگی ظروف معرف ها و یا آب مقطر به دترژنت، گندزدا و یا مواد کثیف: در این مورد باید ظروف را به دقت کنترل نمود و فرآیند شستشوی ظروف را تحت کنترل قرار داد.
- آماده سازی نادرست ماده نشاندار غلیظ: اگر ظرف ماده نشاندار لیوفیلیزه و یا محلول هنوز در دسترس است حجمی که باید برای تهیه ماده نشاندار کار مورد استفاده قرار گیرد باید مجدداً چک شود و تعداد تست های باقی مانده بر اساس تعداد تست های انجام شده محاسبه شود تا حجم صحیح از ماده نشاندار باقی مانده مشخص گردد.
- استفاده از ماده نشاندار رقیق نشده: چنانچه معرف نیازمند رقیق سازی باشد و این امر انجام نپذیرد این مشکل پدیدار می شود در صورتی که ماده نشاندار مورد استفاده در سنجش هنوز در دسترس است اطلاعات موجود در روی وسایل و بروشور کیت بررسی شود. تعداد تست های انجام شده و تعداد تست های باقی مانده محاسبه شود.
- حجم زیاد ماده نشاندار ریخته شده در چاهک: پروتکل سنجش را برای حجم مناسب چک کنید و علاوه بر این وسایل انتقال دهنده نمونه نظیر سمپلرها را از نظر کالیبراسیون بررسی نمائید.

- آماده سازی نامناسب کالیبراتورها: حجم مناسب برای رقیق کردن کالیبراتورها ( در صورت نیاز به رقیق سازی) را از بروشور کیت چک کنید. وسایل اندازه گیری حجم را به دقت چک نمایید. این حالت بسیار حائز اهمیت است چرا که کالیبراتورها باید دارای حداقل عدم صحت باشند.
- حجم بسیار زیاد نمونه: پروتکل سنجش و وسایل اندازه گیری نظیر سمپلر را چک کنید.
- زمان انکوباسیون کوتاه: پروتکل مورد استفاده را بازبینی نمایید.
- درجه حرارت انکوباسیون بسیار کم و یا بسیار زیاد: درجه حرارت انکوباسیون توسط ترمومترهای کالیبره شده باید همواره تنظیم شود و از کالیبره بودن انکوباتور اطمینان حاصل شود.
- نقص در پی پت ها، سمپلر یا دیس پنسرهای اتوماتیک: این امر منجر به تغییر در حجم اضافه شده معرف ها می گردد. این وسایل همواره باید کالیبره شده باشند.
- نقص در انکوباتور مرطوب یا خشک ( درجه حرارت بسیار پائین یا بالا): درجه حرارت انکوباتور با ترمومتر کالیبره چک شود.
- نقص در دستگاه خوانشگر: در این حالت با یک سنجش دیگر در همان طول موج می توان دستگاه را چک کرد.

### مراحل پیشنهادی برای تعیین مشکل

- اطلاعات مربوط به بیش از دو سنجش را باید برای اثبات وجود مشکل مورد آنالیز قرار داد. دقت درون سنجی نیز در صورتی که نمونه ها و کالیبراتورها بصورت دوپلیکته انجام شده است محاسبه و آنالیز شود.
- هر گونه ارتباط بین سیگنال پائین و یا عدم وجود سیگنال با دیگر فاکتورهای موجود نظیر نحوه کار پرسنل و یا تاریخ مصرف معرف های کیت چک شود.
- تفاوت بین روش انجام شده با روش پیشنهادی در پروتکل تعیین شود.
- با سازنده کیت در مورد میزان سیگنال قابل انتظار تماس گرفته شود.

### لیست کنترل اطلاعات

در این لیست باید:

- شماره ساخت معرف ها و کیت و تاریخ انجام سنجش ثبت شود.
- زمان ایجاد مشکل موجود ذکر شود.
- چارت کنترل کیفی، ضمیمه لیست کنترل شود.
- از تمام سنجش های قبلی و سنجش های مذکور که دارای مشکل بوده است مدارک وجود داشته باشد.
- اختلاف بین روش انجام شده و روش پروتکل ذکر شود.
- به تغییرات همزمان در پروتکل سنجش، دستگاهها، وسایل و پرسنل اشاره شود.
- نام و مشخصات دستگاهها و وسایل مورد استفاده ثبت گردد.

### 3- ظرفیت اتصال پائین در سنجش های ایمونومتریکی

علل احتمالی:

- بهینه سازی یا طراحی ضعیف کیت: منحنی کالیبراسیون سنجش را با منحنی تیپیک ارائه شده در بروشور کیت مقایسه نمائید.
- زوال زود هنگام معرف ها قبل از زمان انقضاء: مطالب مربوطه در مبحث قبلی ذکر شده است.
- غلظت بسیار کم آنتی بادی کوتینگ و یا فقدان آنتی بادی کوتینگ: غلظت کم آنتی بادی کوتینگ باعث غیر خطی شدن منحنی کالیبراسیون و یا صاف شدن منحنی در غلظت های بالا می شود. فقدان آنتی بادی کوتینگ منجر به فقدان اتصال و یا عدم وجود سیگنال بطور ثابت در تمام نمونه ها می گردد.
- غلظت کم آنتی بادی نشاندار: غلظت کم آنتی بادی نشاندار سبب شده ظهور یک منحنی غیر خطی و صاف شدن منحنی در غلظت های بالا می شود. فقدان آنتی بادی نشاندار منجر به فقدان اتصال و عدم تولید سیگنال می گردد.
- غیر فعال شدن آنزیم و یا سوبسترا و یا وجود مهارکننده آنزیمی: این مشکل ممکن است با شکل طبیعی منحنی کالیبراسیون اما با کاهش سطح سیگنال مشخص شود

- نقص در کوتینگ چاهک ها: این مورد علاوه بر کاهش سیگنال با کاهش دقت نیز همراه است.
- استفاده از کیت تاریخ گذشته: باید با تعویض کیت مشکل برطرف شود.
- حجم کم یا عدم وجود آنتی بادی کوتینگ: در این حالت سنجش با کاهش و یا فقدان سیگنال روبرو می شود. در صورتی که آنتی بادی کوتینگ در طی سنجش اضافه می شود باید حجم آن با پروتکل چک شود و وسایل اضافه کردن معرف ها نظیر سمپلرها نیز چک گردند.
- حجم کم یا عدم افزودن آنتی بادی نشاندار: پروتکل سنجش برای اضافه نمودن حجم مناسب به همراه وسایلی نظیر سمپلر چک شوند.
- مخلوط نمودن نامناسب معرف ها قبل از اضافه کردن: پروتکل و وسایل مخلوط کردن معرف ها را چک نمائید. حتما قبل از استفاده معرف ها را به نحوی که در پروتکل سنجش ذکر شده است مخلوط نمائید.
- حجم کم نمونه ها: پروتکل و سمپلرها را چک نمائید.
- کاهش زمان انکوباسیون: این مشکل با کاهش سیگنال روبرو می شود که باید پروتکل سنجش را از نظر زمان انکوباسیون چک نمود.
- کم یا زیاد بودن درجه حرارت انکوباسیون: درجه حرارت انکوباسیون و انکوباتور را چک نمایید درجه حرارت پائین با کاهش جذب نوری به دلیل عدم اتصال همراه است و درجه حرارت بسیار زیاد ممکن است منجر به تخریب معرف ها شود.
- نقص در پی پت ها و سمپلرها: در صورتی که سمپلرها و پی پت ها کالیبره نباشند حجم های متفاوتی ( کم یا زیاد) اضافه می نمایند.
- نقص در دستگاه خوانش الایزا: به دلیل کالیبره نبودن با وجود تولید رنگ مناسب دستگاه نتایج پائینی خواهد داشت.

#### 4-دقت ضعف درون سنجی (Within Assay imprecision)

##### علل احتمالی:

- نقص در سری ساخت معرف ها: تغییر در دقت سنجش همزمان با تغییر در شماره ساخت معرف رخ می دهد و این تنها در صورتی مورد توجه قرار می گیرد که کالیبراتورها و نمونه

سرم بصورت دوپلیکت انجام شود. در این مورد باید میزان سیگنال ، ارزش کنترل ها و شکل منحنی با بروشور کیت چک شوذ و ملاحظه شود که آیا با بروشور یکسان است یا خیر؟ همچنین باید با مقادیر بدست آمده از سنجش قبلی نیز چک شود.

- بهینه سازی و طراحی ضعیف کیت: در این موارد سایر مصرف کننده ها نیز دقت ضعیف در سنجش را تجربه می کنند و سازنده کیت گزارشات متعدد و مشابهی را دریافت می نماید.
- ناهمگونی (Variation) در کوتینگ چاهک ها: افتراق این مشکل از سایر علل سخت است. این امر تنها به وسیله انجام دوپلیکیت هایی از کالیبراتور یا سرم بطور همزمان بر روی سری ساخت ناقص و یک سری ساخت با دقت مناسب و قابل قبول در کنار هم به تائید می رسد. در ابتدا باید وسایل مورد استفاده بویژه سمپلرها و دستگاه شستشو چک شود. ضمنا به میزان عدم دقت ادعا شده در بروشور کیت مراجعه شود تا مشخص گردد که چه میزان دقت برای سنجش در نظر گرفته شده است.
- زوال زود هنگام کیت: در این حالت زوال معرف ها منجر به افزایش عدم دقت کیت خواهد شد. در این مورد تمام کیت هائی که دارای شرایط یکسانی از نظر انتقال و نگهداری هستند دچار چنین وضعیتی خواهند شد.
- عدم حساسیت سنجش در نقاط ابتدائی و انتهائی منحنی کالیبراسیون: در این شرایط ممکن است منحنی در نقاط ابتدایی و انتهایی به صورت خط صاف دیده شود. اگر عدم دقت در این نواحی یعنی در غلظت های پائین و بالا بدتر باشد باید چک شود که آیا شیب منحنی کالیبراسیون برای افتراق مناسب نقاط از یکدیگر کافی است یا خیر؟ در این صورت باید به بروشور کیت مراجعه نمود و یا از سازنده کیت اطلاعات لازم را درخواست کرد.
- مخلوط نمودن ناقص نمونه: اگر کنترل ها بین دوپلیکیت ها دارای هماهنگی خوبی است اما نتایج تعدادی از نمونه های سرم بیماران مناسب نمی باشد باید نمونه سرم را خوب ورتکس کرد و یا سانترفیوژ نمود.
- عدم آماده بودن معرف های کیت از نظر درجه حرارت سنجش قبل از استفاده: در این حالت باید مطمئن شد که تمامی معرف ها به درجه حرارت اتاق رسیده است. معرف های با حجم زیاد (بیشتر از 100 میلی لیتر) ممکن است برای رسیدن به درجه حرارت اتاق نیازمند زمان طولانی تری حتی تا یکساعت هم باشند.

- مخلوط کردن ناکافی و ناقص معرف ها( بویژه معرف هائی که از فریزر بیرون آورده شوند و یا معرف هائی که لیوفیلیزه هستند و حل شده اند): معرف ها از نظر یکنواختی بررسی نموده و تمامی معرف ها بر اساس آنچه که در بروشور گفته شده است مخلوط نمائید.
- نقص در پی پت ها، سمپلرها یا دیس پنسر اتوماتیک: آلودگی در نوک سمپلر، اتصال ضعیف بین سمپلر و نوک سمپلر، نشستی نوک سمپلر، ترشح کردن و پخش شدن معرف ها به داخل چاهک ها از جمله مواردی هستند که منجر به عدم دقت می شود. کلیه موارد فوق در صورتی که عدم دقت در سنجش ملاحظه شد باید چک شود.
- استفاده از حجم های نامناسب معرف های کیت: اختلافات اساسی بین پروتکل استفاده شده و آنچه که در بروشور ذکر شده است باید برای تاثیرات آن ها بر دقت سنجش مورد آزمایش قرار گیرد.
- ورتکس (Vortex) ناکافی و یا بسیار شدید: ورتکس ناکافی موجب مخلوط نشدن یکنواخت و ورتکس شدید منجر به تولید کف یا حباب می شود که باید زمان و سرعت مخلوط کردن آزمایش های متعدد بدست آید.
- استفاده از انکوباتور خشک به جای بن ماری: انکوباتورهای خشک برای اغلب روش های سنجش ایمنی نامناسب هستند مگر اینکه در کیت توصیه شده باشند لذا سنجش باید در بن ماری یا حمام آب گرم انجام شود.
- نقص در شستشوی چاهک ها: به طور کامل و دوره ای دستگاه شستشو باید تمیز شود. با استفاده از یک محلول رنگی میزان تخلیه محلول و سپس آسپیره کردن آن را از داخل چاهک ها یا لوله ها چک نمائید.
- تداخلات مربوط به وسایل جمع آوری نمونه: اگر علت ناهمگونی نتایج این مسئله باشد، عدم دقت فقط در برخی از نمونه ها دیده می شود و در سایر نمونه ها ملاحظه نمی گردد.
- اشکال در تکنیک خالی کردن یا زمان خالی کردن چاهک ها: در این شرایط عدم دقت ممکن است در بین تکنسین های مختلف متفاوت باشد.
- اشکال در عمل Tapping پلیت( بر عکس قرار دادن پلیت الیزا پس از خالی نمودن محتویات چاهک ها در مرحله انتهایی شستشو و قرار دادن آن بر روی یک کاغذ نم گیر و کوبیدن آن بر روی کاغذ نم گیر جهت بهتر خشک کردن آن): در صورتی که فشار وارد

آمده به تمام چاهک ها یکسان نباشد ممکن است به علت باقی ماندن مقادیر مختلف محلول شستشو در داخل چاهک ها عدم دقت در سنجش بوجود آید.

- آلودگی چاهک های پلیت الیزا با گرد و خاک و فیبرها: باید محیط اطراف چاهک ها از نظر آلودگی چک شود چرا که ممکن است این آلودگی یکنواخت نبوده و باعث ایجاد عدم دقت بین دوپلیکیت ها شود.
- استفاده از پرسنل بی تجربه: برخی موارد عدم دقت در سنجش ناشی از عملکرد تکنسین است که باید حتما چک شود.

### مراحل پیشنهادی برای تعیین مشکل

- اطلاعات سنجش در چندین مرحله آزمایش باید چک شود. اگر عدم دقت وجود دارد باید مشخص شود که چه زمانی شروع شده است؟ اگر دوپلیکیت کالیبراتورها و کنترل ها به خوبی قرائت می شود و فقط در مورد سرم مشکل وجود دارد، این عدم دقت مربوط به تهیه نمونه است که باید کلیه مراحل نمونه گیری تا آزمایش چک شود.
- محل ایجاد دوپلیکیت ضعیف باید مشخص شود. برای مثال دوپلیکیت ضعیف در چاهک های اطراف پلیت رخ می دهد یا در مرکز. در صورتی که اطراف رخ می دهد ممکن است نشاندهنده گرم نشدن کافی این چاهک ها در انکوباتور باشد (edge effect). دوپلیکیت ضعیف که در شروع یک سنجش مشاهده می شود ممکن است ناشی از نقص در پی پت و سمپلر باشد.
- اگر عدم دقت فقط در نمونه های با غلظت پائین و در روش ایمونومتری رخ می دهد علت آن ممکن است شستشوی ضعیف، خالی کردن ناکافی چاهک ها در حین شستشو، آلودگی چاهک ها با ماده نشاندار یا معرف تولید کننده سیگنال و شکل نامناسب منحنی باشد. اگر دوپلیکیت اولیه از یک نمونه با غلظت پائین در کنار یک نمونه با غلظت بالا قرار گیرد امکان پدیده Carry Over وجود دارد، به عبارتی مواد با غلظت بالا از چاهک های کناری به داخل چاهک های اولیه با غلظت کم انتقال می یابد.
- میزان سیگنال یا شمارش و شکل منحنی را چک کنید که طبیعی است یا خیر. در صورتی که طبیعی نبودند تاریخ انقضاء ظاهر و بوی معرف هارا چک نمائید. اگر نتایج آنها مشابه گزارشات قبلی بودند معرف ها را باید مورد آنالیز قرار داد.

- بررسی شود که آیا دقت در بین تکنسین ها متفاوت است و آیا یک مشکل تکنیکی وجود دارد؟
- با استفاده از یک سری کامل از وسایل و ملزومات ( در صورتی که ممکن است) تست برای وجود مشکلات ناشی از وسایل انجام شود. اگر وسایل جانشین در دسترس نمی باشد وسایل را تمیز و چک نموده و یکبار دیگر تست انجام شود.
- اختلافات موجود بین پروتکل انجام شده و آنچه که در کیت توصیه شده است مشخص شود.
- با سازنده کیت تماس حاصل شود که آیا گزارشات دیگری از عدم دقت داشته است یا خیر؟

## 5-دقت ضعف میان سنجی ( Between Assay Imprecision)

### علل احتمالی:

- بهینه سازی یا طراحی ضعیف کیت: در این موارد سایر مصرف کننده ها نیز یک عدم دقت در سنجش را تجربه می نمایند و سازنده کیت گزارشات متعدد و مشابهی را دریافت می نماید.
- کنترل های ضعیف: ممکن است در ارزش کنترل ها عدم دقت وجود داشته باشد. در این حالت تست با استفاده از چند گروه از سرم بیماران در چندین سنجش و یا استفاده از کنترل های جانشین انجام شود.
- ناهمگونی در یک سری ساخت به سری ساخت دیگر: این مشکل می تواند با چارت کنترل کیفی در صورتی که هر سری ساخت بیش از یک سنجش انجام شود تشخیص داده شود. چارت کنترل کیفی Cusum نشان دهنده ناهمگونی سری به سری ساخت (Lot to Lot) است. باید توجه داشت که دقت در یک سری ساخت (Within Lot) معمولاً بهتر از دقت در بین چند سری ساخت ( Between Lot ) است.
- خطا در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا در منحنی کالیبراسیون سازنده کیت: در صورتی که منحنی ذخیره شده دارای مشکل باشد دقت میان سنجی ارزش کنترل در سنجشی که با منحنی جدید کالیبراسیون انجام شده است قابل قبول خواهد بود مگر اینکه

منحنی کالیبراسیون سازنده کیت دچار نقص باشد که در این حالت سایر مصرف کننده های این سری ساخت کیت ممکن است همین مشکل را به سازنده گزارش نمایند.

- تغییر در ارزش کنترل ها در طی مراحل نگهداری کیت تا زمان انقضاء: به دلیل ناپایداری معرف ها ممکن است چنین مشکلی رخ دهد. باید توجه نمود که سری ساخت معرف ها و اطلاعات سنجش بر روی چارت کنترل کیفی ثبت شود تا تمایل یا Trend در ارزش کنترل را مشخص نماید. این تمایل به یک سمت از منحنی با افزایش سن معرف مشخص می شود و اختلاف واضحی را با کنترل جدید نشان می دهد.

- ناهمگونی در کوتینگ چاهک ها: افتراق این مشکل از سایر علل سخت است. این امر تنها به وسیله انجام مقایسه ای رپلیکیت هایی از کالیبراتور یا سرم بطور همزمان بر روی کیت های آن سری ساخت و یک سری ساخت با دقت مناسب و قابل در کنار هم به تایید می رسد. وسایل مورد استفاده باید در ابتدا چک شوند و به ادعای عدم دقت در بروشورکیت توجه شود.

- خرابی زود هنگام کیت: در این حالت زوال معرف ها منجر به افزایش عدم دقت کیت خواهد شد. در این حالت تمام کیت هایی که دارای شرایط یکسانی از نظر انتقال و نگهداری هستند دچار چنین وضعیتی خواهند شد.

- عدم حساسیت سنجش در نقاط ابتدائی و انتهایی منحنی کالیبراسیون: در این شرایط ممکن است منحنی در نواحی اولیه و پایانی به صورت یک خط صاف دیده شود. اگر عدم دقت در این نواحی یعنی در غلظت های پائین و بالا بدتر از سایر نقاط باشد باید چک شود که آیا شیب منحنی کالیبراسیون برای افتراق مناسب نقاط از یکدیگر کافی است یا خیر؟ در این صورت باید به بروشورکیت مراجعه نمود و یا از سازنده کیت اطلاعات لازم را درخواست کرد.

- استفاده از حجم های نامناسب معرف های کیت: اختلافات اساسی بین پروتکل استفاده شده و آنچه که در بروشور ذکر شده است باید برای تاثیرات آنها بر روی دقت سنجش مورد بررسی قرار گیرد.

- ناهمگونی در درجه حرارت انکوباسیون: دستگاه انکوباتور باید چک شده و حرارت آن بصورت روزانه ثبت شود. اگر بیش از یک دستگاه برای سنجش استفاده می شود هرکدام بطور جداگانه باید چک شوند.

- عدم آماده بودن معرف های کیت از نظر درجه حرارت سنجش قبل از استفاده: در این حالت باید مطمئن شد که تمام معرف ها به درجه حرارت اتاق رسیده است. معرف های با حجم زیاد (بیشتر از 100 میلی متر) ممکن است برای رسیدن به درجه حرارت اتاق نیازمند زمان طولانی تری حتی تا یکساعت هم باشند.
- مخلوط کردن ناکافی و ناقص معرف ها (بوئیزه معرف هائی که از فریز بیرون آورده شده است و یا معرف هائی که لیوفیلیزه هستند و حل شده اند): معرف هارا از نظر یکنواختی بررسی می نمائیم و تمام معرف ها بر اساس آنچه که در بروشور ذکر شده است مخلوط می کنیم.
- نقص در پی پت ها، سمپلرها و دیس پنسراتوماتیک: آلودگی در نوک سمپلر، اتصال ضعیف بین سمپلر و نوک سمپلر، نشستی نوک سمپلر، ترشح کردن و پخش شدن معرف ها به داخل چاهک ها از جمله مواردی هستند که منجر به عدم دقت می شود و در صورت مشاهده عدم دقت باید چک شوند.
- ورتکس ناکافی یا بسیار شدید: بهترین روش ورتکس، افزایش زمان و کاهش سرعت مخلوط کردن است.
- استفاده از انکوباتور خشک به جای بن ماری: انکوباتورهای خشک برای اغلب روش های سنجش ایمنی مناسب نمی باشند مگر اینکه در کیت توصیه شده باشند لذا تست سنجش باید در حمام آب گرم یا بن ماری انجام شود.
- تغییر درجه حرارت آزمایشگاه: در خیلی از موارد دمای نامناسب محیط می تواند بر سنجش هایی که در درجه حرارت اتاق انجام می شود تاثیرگذارد. این امر در برخی از فصول سال بیشتر دیده می شود. بهترین روش کنترل درجه حرارت قرار دادن دماسنج در فضائی است که در آن روش سنجش ایمنی انجام می شود و بر طبق درجه حرارت ترمومتر، حرارت محیط ثابت نگه داشته شود.
- نقص در شستشوی چاهک ها: دستگاههای شستشو دهنده باید به صورت دوره ای تمیز شده و تحت کنترل باشند. با استفاده از یک محلول رنگی میزان تخلیه محلول و سپس آسپیره کردن آن را از داخل چاهک ها چک نمائید.

- تداخلات مربوط به وسایل جمع آوری نمونه: اگر علت ناهمگونی نتایج این مسئله باشد، دقت ضعیف سنجش فقط در برخی از نمونه ها دیده می شود و در سایر نمونه ها دیده نمی شود.
- اشکال در تکنیک خالی کردن یا زمان خالی کردن چاهک ها: در این شرایط عدم دقت ممکن است در بین تکنسین های مختلف متفاوت باشد.
- ایراد در عمل Tapping پلیت: در صورتی که فشار وارد آمده به تمام چاهک ها یکسان نباشد ممکن است ایجاد عدم دقت نماید.
- آلودگی چاهک های پلیت الیزا با گرد و خاک و لکه های مواد مختلف: چاهک ها باید از نظر آلودگی چک شوند و قبل از قرائت در دستگاه ریدرالایزا با یک دستمال نیمه مرطوب بدون پرز پاک شوند.
- استفاده از کیت تاریخ گذشته: زمان انقضاء کیت باید چک شود.
- استفاده از پرسنل با مهارت ناکافی: در برخی از موارد عدم دقت در سنجش ناشی از عملکرد ضعیف پرسنل است که باید میزان دقت فرد چک شود.
- استفاده از یک روش Curve Fitting نامناسب: برای مثال استفاده از روش Linear interpolation بدون تبدیل اطلاعات و یا استفاده از یک روش Curve Fitting که برای کیت نامناسب است منجر به عدم دقت می شود. روش Linear interpolation برای اغلب سنجش های ایمنی نامناسب است مگر اینکه اطلاعات در ابتدا بوسیله اعمال ریاضی خطی شده باشد. برای بررسی کیفیت سایر روشهای فیت کردن باید مقدار واقعی و مقدار بدست آمده از روش فیت شده با یکدیگر مقایسه شوند.
- آلودگی معرف ها در طی اولین مرحله استفاده از کیت: در صورتی که آلودگی وجود داشته باشد در بار دوم که از کیت استفاده می شود ممکن است نتایج دیگری گرفته شود که با نتایج اولیه متفاوت است. این مشکل هنگامی مشخص می شود که زمان شروع استفاده از کیت ثبت شده باشد.
- استفاده از کیت تاریخ گذشته: قبل از انجام آزمایش باید تاریخ انقضاء کیت چک شود.
- ناهمگونی بین پرسنل مختلف: در این شرایط باید میانگین کنترل و ضریب تغییرات (CV) بدست آمده از تکنسین های مختلف محاسبه و مقایسه شود.

## مراحل پیشنهادی برای تعیین مشکل

- ضریب تغییرات (CV) میان سنجی را برای تمام کنترل ها محاسبه نموده و تعیین شود که آیا تمام کنترل ها دارای مشکل هستند و یا فقط تعدادی از آنها. در صورتی که فقط تعدادی از کنترل ها دارای مشکل باشند آیا عدم دقت فقط در غلظت های پائین رخ داده است و یا در غلظت های بالا هم مشاهده می شود؟
- اگر عدم دقت رخ داده است زمان شروع آن مشخص شود. اختلافات قابل توجه بین کیت قدیم و جدید تعیین شود. میزان دقت درون سنجی بوسیله دوپلیکیت بر روی کالیبراتورها و کنترل ها چک شود. عدم دقت درون سنجی می تواند تنها علت عدم دقت میان سنجی باشد.
- کیفیت برنامه Curve Fitting بوسیله مقایسه ارزش کالیبراتور در حالت واقعی و فیت شده بررسی شود.
- اگر دقت ضعیف فقط در غلظت پائین نمونه ها در سنجش های ایمونومتریک مشاهده شود ممکن است علت آن شستشوی ضعیف، تخلیه نامناسب چاهک ها، آلودگی با ماده نشاندار و شکل نامناسب منحنی باشد.
- میزان سیگنال و شکل منحنی را چک نمائید که طبیعی است یا خیر؟ در صورت طبیعی نبودن این عوامل، تاریخ انقضاء، ظاهر و بوی معرف ها باید بررسی شوند تا از سالم بودن آنها اطمینان حاصل شود.
- ناهمگونی بین پرسنل باید چک شود.
- با استفاده از سری کامل از وسایل و ملزومات ( در صورتی که ممکن است) تست برای وجود مشکلات ناشی از وسایل انجام شود.
- اختلافات موجود بین پروتکل انجام شده و آنچه در کیت توصیه شده است مشخص گردد.
- با سازنده کیت تماس حاصل شود که آیا گزارشات دیگری نیز از عدم دقت کیت دریافت شده است یا خیر؟

## 6- جذب زمینه ای بالا یا وجود اتصالات غیر اختصاصی

در یک سنجش رقابتی اتصال غیر اختصاصی (NSB) با انجام سنجش بدون اضافه کردن آنتی سرم اندازه گیری می شود. اگر آنتی سرم بعدا به فاز جامد اضافه می شود (سنجش فاز مایع)، باید یک بلانک از معرف آنتی سرم که شامل فاز جامد بدون آنتی بادی است مد نظر قرار گیرد. در روش های ایمونومتریکی، NSB بوسیله نمونه با غلظت صفر (در صورت در دسترس بودن) قابل اندازه گیری است. در این حالت NSB، با اتصال آنتی بادی نشاندار به فاز جامد در غیاب آنالیت قابل اندازه گیری است.

### علل احتمالی:

- نقص در بهینه سازی یا طراحی کیت: باید چک شود که NSB ثابت است یا خیر. اگر کیت بطور نامناسبی طراحی شده باشد این امر به روشنی از اطلاعات حاصل از معتبرسازی (Validation) سنجش مشخص می گردد.
- ماده نشاندار نامناسب: در صورت بروز اتصال غیر اختصاصی زیاد در هنگام استفاده از یک سری ماده نشاندار جدید باید به ماده نشاندار شک کرد.
- نقص در معرف های سیستم جداسازی: در این حالت فاز جامد و محلول شستشو می توانند دخیل باشند. در این نوع مشکل معمولا دقت درون سنجی نیز مختل شده است.
- تغییر در ماتریکس کالیبراتورها: در سنجش های رقابتی باید NSB توسط یک نمونه سرم بیمار به جای کالیبراتور اندازه گیری شود. در روش های ایمونومتریکی یک ماده جانشین با غلظت صفر استفاده می شود و یا بطور کامل نمونه را برای یافتن اثرات NSB از سیستم حذف می کنیم.
- اتصال ماده نشاندار به سطوح پلاستیکی: این امر در سنجش های فاز جامد کمتر مشاهده می شود. در سنجش های فاز مایع با استفاده از سیستم جداسازی پلی اتیلن گلیکول بیشتر دیده می شود.
- اتصال ماده نشاندار به چاهک ها: NSB اغلب بوسیله استفاده از یک نمونه فاز جامد که با آنتی سرم کوت نشده است اندازه گیری می شود. با این حال این امر می تواند عامل یک پاسخ مصنوعی (Artifact) باشد و نتایج حاصل ضرورتا نمایانگر چنین وضعیتی در یک سنجش نرمال نمی باشد.

- استفاده از کیت لعد از تاریخ انقضاء: قبل از انجام آزمایش باید تاریخ انقضاء کیت بررسی شود.
- آلودگی با آنتی سرم (در روش های رقابتی): باید روشها مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند.
- آلودگی با آنالیت (در روشهای ایمونومتریک): حتما چک شود که نمونه ای که به عنوان کالیبراتور صفر در نظر گرفته شده است دارای ارزش صفر است.
- درجه حرارت بالای انکوباسیون: پروتکل انجام آزمایش را با بروشور چک کنید.
- تفاوت پروتکل انجام آزمایش با بروشور کیت: پروتکل انجام آزمایش بویژه در مرحله شستشو را با بروشور کیت مطابقت دهید.
- نقص در تهیه محلول شستشو: باید توجه داشت که محلول شستش به خوبی تهیه شده باشد و نحوه تهیه آن مجددا چک شود.
- تهیه نادرست رقت ماده نشاندار یا نمونه های سرم: در صورتی که نمونه های سرم یا ماده نشاندار بصورت غلیظ مورد استفاده قرار گرفته باشند ایجاد جذب زمینه ای یا اتصال غیر اختصاصی می نماید. نحوه تهیه معرف ها با بروشور کیت انطباق داده شود.

## 7- رانش سنجش (Drift)

رانش عبارت است از اختلاف در غلظت بدست آمده از یک نمونه واحد در موقعیت های مختلف یک پلیت در یک نوبت کاری که شایعترین علت آن زیاد بودن تعداد آزمایش در یک نوبت کاری است له نحوی که بین افزودن محلول ها و فاصله زمانی طولانی وجود داشته باشد.

### علل احتمالی

- نقص در بهینه سازی یا طراحی کیت: در این شرایط مصرف کننده ها نیز رانش در سنجش را گزارش می کنند.
- نقص در ساخت معرف ها: این مشکل می تواند توسط آزمایش کنترل ها در شروع و پایان هر سری آزمایش و مقایسه آن با سری ساخت های مختلف چک شود. باید از ثابت بودن طول زمان سنجش و اضافه کردن معرف ها اطمینان حاصل شود.

- ناهمگونی بین چاهک ها: اگر رانش به دلیل ناهمگونی بین چاهک ها باشد، در صورتی که کنترل ها بصورت دوپلیکه در چندین وضعیت در پلایت قرار داده شوند، عدم دقت درون سنجی نیز بطور واضح نشانش داده می شود.
- سنجش تعداد زیادی چاهک در یک سری آزمایش: باید زمان اضافه کردن نمونه ها و معرف ها به اولین و آخرین چاهک و اختلاف آن محاسبه شود، سپس در صورت تطبیق با بروشور چنانچه نتیجه ای حاصل نشد با سازنده تماس گرفته شود.
- افزایش طول زمان اضافه کردن نمونه ها: زمان اضافه کردن نمونه ها از اول تا آخر ثبت شود و با ادعای سازنده تطبیق داده شود.
- افزایش زمان اضافه کردن معرف ها: زمان اضافه کردن معرف ها با ادعای سازنده چک شود.
- واکنش کند یا سریع محلول متوقف کننده: زمان اضافه کردن محلول متوقف کننده باید با زمان اضافه کردن سوبسترای رنگ زا هماهنگ باشد. بنابراین بهترین کار این است که بلافاصله پس از افزودن سوبسترا به چاهک اول زمان گرفته شود. در این حالت پس از اتمام زمان انکوباسیون سوبسترا، افزودن محلول متوقف کننده نیز از اولین چاهک شروع می شود و زمان لازم برای اضافه کردن محلول به تمام چاهک ها معادل زمان لازم برای افزودن سوبسترا به تمام چاهک ها خواهد بود.
- تغییر در پروتکل انجام آزمایش: اختلافات اساسی بین پروتکل انجام آزمایش و آنچه که در بروشور کیت ذکر شده است باید برای وجود تاثیر در رانش سنجش بررسی شود.
- عدم آماده بودن معرف های کیت از نظر درجه حرارت سنجش قبل از استفاده: در این حالت باید مطمئن شد که تمام معرف ها به درجه حرارت اتاق رسیده باشند.
- مخلوط نشدن مناسب معرف ها ( بویژه بعد از بیرون آوردن از فریز و یا پس از حل کردن معرف های لیوفیلیزه): زمان مخلوط شدن معرف ها، روش مخلوط شدن آنها با بروشور چک شود و معرف ها از نظر یکنواختی بررسی شوند.
- پایین بودن درجه حرارت انکوباسیون: درجه حرارت را چک نمائید.
- نقص در پی پت ها، سمپلرها و دیس پنسرها: آلودگی نوک سمپلر، اتصالات ضعیف نوک سمپلر به سمپلر و نشستی نوک سمپلر از عوامل رانش سنجش هستند.

- استفاده از انکوباتور خشک به جای انکوباتور مرطوب: انکوباتورهای خشک برای اغلب سنجش های ایمنی نامناسب هستند مگر اینکه در کیت توصیه شده باشند.
- نقص در انکوباتور: در این حالت درجه حرارت مناسب و لازم فراهم نمی شود و باید انکوباتور را تعویض کرد.
- نقص در محلول یا دستگاه شستشو: باید نحوه تهیه محلول و شستشو با بروشور چک شده و دستگاه شستشو نیز بطور منظم مورد بازدید قرار گیرد.

## 8-عدم خطی بودن

منظور از خطی بودن حصول نتایج یکسان از رقت های سریال یک نمونه می باشد.

### علل احتمالی

- نقص در بهینه سازی و طراحی کیت: باید بررسی شود که غیر خطی بودن ثابت است یا خیر؟ این امر به وسیله انجام رقت های سریال از چندیدن نمونه با غلظت های بالا تعیین می شود. اگر طراحی کیت ضعیف باشد عدم خطی بودن در فرایند معتبرسازی کیت بطور واضح دیده می شود.
- معیوب بودن سیستم جداسازی آنتی سرم یا ماده نشاندار: اگر سازنده عقیده داشته باشد کخ غیر خطی بودن یک پدیده نادر و غیر تیپیک در سنجش است با یک کیت دیگر از سری ساخت دیگر باید تست تکرار شود.
- پدیده هوک با غلظت بالا در سنجش ایمونومتریک: این مشکل باید با آزمایش محدوده ای از غلظت های آنالیت، که به نمونه با غلظت صفر یا کالیبراتور صفر اضافه شده است بررسی شود. سپس منحنی غلظت های اضافه شده از آنالیت در مقابل غلظت آنالیت رسم می شود. تین منحنی باید از شرایط خطی بودن (Linearity) تبعیت نماید.
- خطا در غلظت کالیبراتورها: اگر این مشکل وجود داشته باشد، عدم صحت در کنترل و خطا در فیت کردن منحنی ممکن است دیده شود.

- خطا در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا منحنی کالیبراسیون سازنده: در این حالت باید منحنی کالیبراسیون مجددا رسم شود و یا از کیت با سری ساخت دیگر استفاده گردد.
- ناهمگونی آنتی ژنیک در نمونه ها: برای مثال در بیماران مبتلا به تومور یا افرادی که انواع خالص آنالیت را بصورت تزریقی دریافت کرده اند ناهمگونی آنتی ژنیک در این بیماران می تواند عامل نامناسب بودن تست خطی بودن باشد. اغلب پروتئین ها بویژه گلیکوپروتئین ها، مولکول هایی هتروژن هستند و ممکن است در اشکال غیر معمول در طی دوره ای از بیماریها وجود داشته باشند. سنجش ها و حساسیت آنها نسبت به این انواع متفاوت هستند، بنابراین سابقه پزشکی بیمه از نظر وجود بیماری های خاص و یا تزریق مواد خاص باید ثبت شود.
- اختلاف بین رفتار کیت های مختلف با در نظر گرفتن آنالیت موجود در نمونه بیماران و یک استاندارد بین المللی: با استفاده از یک استاندارد بین المللی که دارای ساختار نسبتا مشابه به آنالیت است و دارای تست بازیافت و خطی بودن مناسبی است نتایج بهتر خواهد شد.
- وجود تداخلات ناشی از عوامل داخلی سرم نظیر همولیز، لیپمی و نحوه جمع آوری نمونه: ظاهر سرم در این حالت باید چک شود.
- استفاده از نمونه های قدیمی و کهنه: نگهداری طولانی مدت نمونه می تواند منجر به تجزیه آنالیت مورد نظر گردد. بسیاری از آنالیت ها ناپایدار هستند و اگر برای دوره طولانی در 20- درجه سانتی گراد نگهداری شوند تجزیه می شوند. آزمایش باید با نمونه تازه تکرار شود.
- تهیه کالیبراتور در یک ماتریکس غیر انسانی: در صورت تهیه ی کالیبراتور در ماتریکس غیر انسانی ممکن است آنالیت در اشکال مختلفی متفاوت از آنچه که در نمونه سرم بیماران یافت می شود وجود داشته باشد. باید آزمایش با نمونه سرم با غلظت بالا تکرار شود.
- دقت درون سنجی ضعیف: باید هماهنگی بین دوپلیکیت ها بویژه در غلظت خای بالا چک شود. آزمایش رقت بر روی بیش از یک نمونه تکرار شود و رقت ها باید شامل رقت های بین نمونه خلاص و رقت 1:2 نیز باشد تا تصویر شفافی از پروفایل رقیق سازی بدست آید.

- اختلاف در پروتکل به کار رفته: به اختلافات بین پروتکل به کار رفته و آنچه که در بروشور ذکر شده است باید توجه شود بویژه در هنگام رقیق سازی باید به رقیق کننده توصیه شده توجه ویژه ای مبذول شود.
- استفاده از رقیق کننده نامناسب: رقیق کننده مناسب باید از سازنده کیت خواسته شود.
- نقص در وسایل: سایر علائم یک سنجش نامناسب نظیر عدم دقتعدم دقت، عدم صحت کنترل یا اتصال ضعیف باید بررسی شوند. این نشانه ها ممکن است سرنخی برای نقص در وسایل و ملزومات مورد استفاده در سنجش باشند. با جایگزین کردن وسایل ( در صورت امکان) و یا سرویس آنها، آزمایش مجددا انجام پذیرد.
- عدم صحت مربوط به خطای فیت کردن منحنی در غلظت های بالا یا پائین: اگر این علت وجود داشته باشد اختلاف بین ارزش کالیبراتور در حالت واقعی و در حالت فیت کردن منعکس کننده عدم صحت می باشد.

### مراحل پیشنهادی برای تعیین مشکل

- آزمایشات رقیق سازی باید با چندین نمونه با غلظت بالای آنالیت و بصورت دوپلیکیت چک شوند و مشخص شود که دقت بین دوپلیکیت ها مناسب است و هرگونه ناهماهنگی در شکل منحنی رقیق سازی مورد بررسی قرار گیرد.
- هرگونه اختلاف در پروتکل انجام آزمایش با آنچه که در بروشور کیت ذکر شده است ثبت شود.
- کیفیت روش رسم منحنی چک شود.

### 9-بازیافت (Recovery) ضعیف سنجش

#### علل احتمالی:

- اشتباه در استاندارد سازی: هرگونه عدم صحت بین کیت و دیگر کیت های موجود برای اندازه گیری یک آنالیت در الگوی ارزیابی کنترل کیفی خارجی باید مورد توجه قرار گیرد.

- عدم کالیبراتورهای یک سری ساخت از کیت: در این گونه موارد ارزش کنترل، زمانی که یک سری ساخت جدید عرضه می شود تغییر می یابد. عدم صحت در رسم منحنی نیز ممکن است مشاهده شود.
- تجزیه و تخریب استانداردهای مرجع سازنده کیت: رانش در سنجش در پروسه کنترل کیفی خارجی مشاهده می شود. ارزش کنترل ممکن است همزمان با عرضه کالیبراتور جدید بطور تدریجی تغییر یابد.
- تجزیه کالیبراتور قبل از استفاده: در میزان کنترل، عدم صحت مشاهده می شود. ارزش کنترل با یک کالیبراتور جدید چک شود.
- خطا یا ناپایداری در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا منحنی کالیبراسیون سازنده کیت: کنترل ها نیز تحت تاثیر این خطا قرار می گیرند. بازیافت سنجش با کالیبراسیون مجدد بهتر می شود مگر اینکه در کالیبراسیون سازنده کیت نقص وجود داشته باشد.
- اشتباه در ساخت محلول غلیظ آنالیت برای اضافه کردن به نمونه جهت تست ریکآوری: ساخت محلول استانداردهای مرجع نیازمند مهارت و دقت خاصی است بویژه استانداردهائی که به صورت لیوفیلیزه در آمپول قرار دارند. روش تهیه استاندارد باید چک شود و بازیافت بین دو نمونه آمپول باید یکسان باشد.
- ناپایداری آنالیت قبل و بعد از ساخت محلول یا استفاده از آنالیت ناخالص: منبع تهیه آنالیت باید مشخص و بررسی گردد. برای تست بازیافت فقط از مواد تازه و تاریخ دار استفاده شود. برای تست بازیافت در صورت موجود بودن باید از استانداردهای مرجع استفاده شود.
- استفاده از ماتریکس های نامناسب برای حل کردن استاندارد و یا رقیق کردن آنالیت: نوع ماتریکس صحیح بر اساس توصیه بروشور کیت برای حل کردن استاندارد باید مشخص شود.
- خطاهای مربوط به توزین یا تعیین حجم: ترازو و وسایل حجمی نظیر پی پت و فلاسک های حجمی از نظر کالیبراسیون چک شوند.
- خطاهای محاسباتی در تعیین بازیافت: تمام مراحل محاسبه ریاضی چک شود.
- عدم دقت در غلظت های بالا: در صورتی که نمونه استفاده شده برای ریکآوری دارای غلظتی نزدیک به بالاترین حد تعیین در کیت باشد در این حالت باید دوپلیکیت ها چک شود و در صورت امکان غلظت پائین تری از آنالیت برای افزودن به نمونه استفاده شود و غلظت آنالیت در نمونه نیز پائین تر باشد.

- استفاده از واحد های مختلف یا استانداردهای بین المللی مختلف برای کیت: در این موارد باید با سازنده کیت تماس گرفته شود و از نوع استاندارد و واحد آن سوال شود.
- استفاده از نمونه های کهنه و مانده، لیمپیک، ایکتریک و دارای همولیز: ظاهر نمونه سرم باید چک شود و در صورتی که نمونه غیر معمول بود باید با نمونه جدید مجدداً آزمایش شوند.
- استفاده از معرف های باکیفیت نامناسب و یا در حال انقضاء: شرایط کیت و تاریخ انقضاء و درجه حرارت نگهداری کیت چک شود.
- مخلوط کردن نامناسب معرف ها و کالیبراتورها: تکنیک استفاده شدا برای مخلوط کردن چک شود در این شرایط ممکن است دوپلیکیت ها نیز دچار عدم دقت شوند.
- نقص در وسایل: دیگر نشانه های یک سنجش بد نظیر عدم دقت، عدم صحت در کنترل باید چک شود. این نشانه ها ممکن است سرنخی برای وجود نقص در وسایل مورد استفاده باشد.
- خطای متناسب کردن منحنی: در این موارد اختلاف بین ارزش کالیبراتور در حالت واقعی و در حالت فیت کردن باید یکسان باشد و به عبارتی ریکواری حدود 100 درصد باشد. دقت داشته باشید که خطای رسم منحنی می تواند بطور واضح غلظت نمونه پایه و نمونه اضافه شده را تحت تاثیر قرار دهد.
- خطای تکنیکی: تست توسط یک تکنسین دیگر انجام شود و هماهنگی نتایج بررسی شود.

## 10- حساسیت ضعیف سنجش

حساسیت سنجش، دقت اندازه گیری در غلظت صفر است. اما از نظر بالینی دقت میان سنجی یک کنترل با غلظت بسیار کم آنالیت (اما قابل تعیین) حساسیت نامیده می شود. حساسیت سنجش نباید با حساسیت تشخیص اشتباه شود، حساسیت تشخیصی (Diagnostic sensitivity) عبارت است از توانایی یک سنجش برای تعیین شرایط بالینی.

علل احتمالی:

- نقص در سری ساخت: در این گونه موارد حساسیت سنجش باید باکیت هایی با سری ساخت های متفاوت چک شود. میزان سیگنال، ارزش کنترل ها و شکل منحنی بررسی شده و با سنجش های قبلی و ادعای سازنده مقایسه گردد. حساسیت سنجش باید بر روی بیش از یک سری ساخت بررسی شود. روش آماری F-Test می تواند برای تعیین اختلاف بین سری ساخت های مختلف زمانی که این اختلافات از نظر آماری قابل توجه هستند استفاده شود.
- نقص در بهینه سازی و طراحی کیت: حساسیت اندازه گیری شده با ادعای سازنده بروشور مقایسه شود و به سازنده اطلاع داده شود.
- ناهمگونی در چاهک ها: این مشکل باید از سایر علل احتمالی افتراق داده شود که کار دشواری است. مقایسه همزمان حساسیت سنجش با سری ساخت مناسب از نظر دقت، تنها راه متمایز آن است. وسایل مورد استفاده نظیر سمپلر ابتدا باید چک شود.
- نامناسب بودن شیب منحنی در غلظت های خیلی پائین: اگر شکل منحنی در غلظت های پائین تخت است با سازنده کیت تماس حاصل نمائید. تین امر ممکن است که مربوط به خطا در فیت کردن منحنی باشد.
- مخلوط نشدن کامل کالیبراتور صفر: قبل از اضافه کردن کالیبراتور صفر حتما آنرا مخلوط نمائید.
- عدم آماده بودن معرف های کیت از نظر درجه حرارت سنجش قبل از استفاده: در این حالت باید مطمئن شد که تمام معرف ها به درجه حرارت اتاق رسیده اند. معرف های با حجم زیادتر ممکن است نیازمند زمان طولانی تری باشند.
- نقص در وسایل نظیر پی پت ها و سمپلر اتوماتیک: آلودگی نوک سمپلر، اتصال ضعیف نوک سمپلر به سمپلر، نشستی در نوک سمپلر و یا ترشح مواد از نوک سمپلر از علل کاهش حساسیت سنجش هستند. این عامل اغلب بوسیله دقت ضعیف در چند دوپلیکیت اول کالیبراتور صفر در طی تست تعیین حساسیت مشخص می شود.
- استفاده از انکوباتور خشک به جای انکوباتور مرطوب: انکوباتورهای خشک برای اغلب سنجش های ایمنی نامناسب هستند مگر اینکه توصیه شده باشند.
- نقص محلول و دستگاه شستشو: محلول و دستگاه شستشو باید چک شود. نحوه تهیه محلول شستشو با بروشور کیت مقایسه شود.

## مراحل پیشنهادی برای تعیین مشکل

- ابتدا باید مطمئن شد که حساسیت سنجش درست محاسبه شده است. دقت درون سنجی برای کنترل های با غلظت پائین محاسبه شود. اگر حساسیت با دقت درون سنجی مختل است باید زمان شروع مشکل مشخص شود. معلوم شود که آیا بروز مشکل در بین پرسنل متفاوت است یا خیر؟
- کالیبراتور صفر را در نواحی مختلف پلیت تحت سنجش قرار دهید. رپلیکت ضعیف در که رپلیکت ضعیف در چاهک های ابتدایی پلیت می تواند دال بر پی پت کردن نامناسب باشد.
- تخلیه نامناسب چاهک ها، آلودگی با ماده نشاندار و شکل منحنی مورد بررسی قرار گیرد. در روش های ایمونومتریک کیفیت روش شستشو چک شود.
- میزان سیگنال و شکل منحنی را چک کنید اگر این دو عامل نرمال بود تاریخ انقضاء کیت و معرف ها، ظاهر و بوی معرف ها را بررسی نمائید.
- کلیه وسایل و دستگاههای مورد استفاده رو مورد بازبینی قرار دهید.

## 11- همبستگی ضعیف بین دو کیت

### علل احتمالی:

- عدم استاندارد کردن مناسب کیت در زمان طراحی: با سازنده کیت مشورت نمائید. نمای کنترل کیفی یک راه مفید برای بررسی عدم صحت روش است.
- ناپایداری در استانداردهای مرجع سازنده کیت: در این گونه موارد یک شیفت ندریجی در مقادیر استانداردهای کیت مشاهده می شود که با معرفی کالیبراتورهای جدید مشخص می شود.
- خطا در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا در منحنی کالیبراسیون سازنده کیت: همبستگی ضعیف بین دو کیت با کالیبراسیون مجدد و رسم منحنی جدید برطرف می شود و یا با استفاده از کیت با سری ساخت دیگر این مشکل حل خواهد شد.

- استفاده از آنتی بادی هائی با ویژگی متفاوت در هر سری ساخت: با سازنده کیت مشورت شود. این مشکل بویژه باید زمانی مورد توجه باشد که تعدادی از روش های ایمونومتریک در مقابل استانداردهای بین المللی کالیبره می شوند.
- استفاده از نمونه های کهنه و مانده: تست همبستگی را با نمونه تازه تکرار نمائید.
- انتخاب محدوده کوچکی از غلظت برای تست همبستگی: این عامل موجب خطای آماری در همبستگی می شود. حدود اطمینان برای شیب (slope) و عرض از مبدا (intercept) را چک کنید و تست را مجدداً با نمونه هائی با غلظت های وسیع تر تکرار نمائید.
- استفاده از تعداد معدود نمونه: اگر تعداد زیادی نمونه در اختیار نیست ولی همان تعداد نمونه اگر دارای محدوده وسیعی از غلظت است مجدداً تکرار شود تا از نظر آماری ضریب اطمینان نتایج افزایش یابد.
- انجام فقط یک یا دو سنجش: به دلیل اینکه ناهمگونی بین سنجش ها وجود دارد و این ناهمگونی در نتایج دخالت دارند بطور ایده آل مطالعی همبستگی نیازمند تعداد زیادی سنجش است.
- نقص در وسایل نظیر سمپلر: ارزش کنترل ها و دقت درون سنجی نیز ممکن است دستخوش این نقص شود بنابراین در صورتی که ایندو نیز متاثر شده باشند باید با وسایل جایگزین تست تکرار شود.

## 12-عدم صحت در کنترل: تغییرات ثابت در ارزش کنترل از یک دوره زمانی به دوره زمان دیگر و یا از یک سری ساخت به سری ساخت دیگر

### علل احتمالی:

- نقص در معرف های یک سری ساخت کیت: تغییر در ارزش کنترل باید بطور واضح در همزمانی با تغییر در شماره ساخت معرف ها رخ دهد تا به این مشکل شک نمائیم. زمانی که انواع خاصی از وسایل یا برنامه فیت کردن منحنی استفاده می شود ممکن است تغییرات در کالیبراتورها یا معرف ها عامل عدم صحت باشد.

- خطا در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا منحنی کالیبراسیون سازنده کیت: گاهی ممکن است با معرفی یک منحنی کالیبراسیون جدید تغییر در ارزش کنترل رخ دهد که با رسم منحنی جدید مشکل برطرف می شود.
- تغییر در برنامه فیت کردن منحنی: اختلاف بین ارزش های کالیبراتور در حالت فیت کردن و مقادیر واقعی باید بررسی شود.
- محلول سازی نامناسب کنترل های لیوفیلیزه یا فریز شده: در صورتی که عدم صحت با ساخت کنترل جدید همزمان شود باید به این مشکل شک کرد.
- ناهمگونی بین ویالهای کنترل: تغییر در ارزش کنترل همزمان با استفاده از کنترل جدید مشاهده می شود.
- تغییر غیر عمدی در کنترل مورد استفاده: پرسنل ممکن است بدون آگاهی کنترل را از یک سری ساخت به سری ساخت دیگر جا به جا نماید. اگر تغییر در ارزش کنترل بطور کامل ثابت باشد اما زمان وقوع آن با تغییر در شماره ساخت کیت همزمان باشد باید به جا به جایی در کنترل ها شک کرد.
- تغییر در درجه حرارت آزمایشگاه در زمان انکوباسیون در حرارت اتاق: در صورت در سایر علل بوجود آورنده عدم صحت ثابت در کنترل باید به تغییرات درجه حرارت توجه شود. تغییرات درجه حرارت در فصول سال باید همزمان با تغییر در ارزش کنترل رخ دهد تا به این مشکل شک کنیم. اثرات سرمائی با گرمائی بر سنجش بیشتر در ابتدای صبح قبل از راه اندازی وسایل گرمایش یا سرمایش اتفاق می افتد.
- تغییر پرسنل: در این مورد تغییر پرسنل ممکن است با دیگر تغییرات نظیر دقت میان سنجی بطور همزمان رخ دهد.
- نقص در حمام آب گرم یا انکوباتور: ممکن است با تغییر در ارزش کنترل، تغییراتی در میزان سیگنال و یا شکل منحنی نیز رخ دهد.
- نقص در پی پت یا سمپلر: در این حالت تغییر در ارزش کنترل ممکن است با تغییر در شکل منحنی یا عدم دقت درون سنجی همراه شود.

تذکر: شماره ساخت کیت و معرف ها باید بطور مداوم ثبت شوند و چارت کنترل کیفی برای کنترل ها باید بطور منظم رسم شده باشد و ممکن است حتی به اطلاعات مربوط 10 سنجش قبلی نیز نیاز باشد.

### 13-عدم صحت در کنترل: تغییر در ارزش تدریجی کنترل (تغییرات غیر ثابت در یک زمان یا با تغییر در سری ساخت کیت)

#### علل احتمالی:

- تغییر تدریجی در سری ساخت کیت: گاهی در طول زمان تمایل تدریجی در ارزش کنترل در سری ساخت های متوالی دیده می شود. این مشکل با تغییر در سری ساخت کیت مشخص می شود.
- ناپایداری معرف ها یا نگهداری غیر صحیح آنها: تغییر تدریجی در ارزش های کنترل از ابتدای استفاده از کین تا پایان کیت دیده می شود که با استفاده از معرف جدید به میزان اولیه باز می گردد.
- ناپایداری کنترل ها: این مشکل از مهمترین علل تغییر در کنترل است. این تغییرات تدریجی و در طی چند ماه ملاحظه می شود و مستقل از سری ساخت کیت رخ می دهد و اگر چه کنترل های تحت تاثیر قرار گرفته ممکن است تغییر ارزش داشته باشند اما ممکن است این تغییرات در محدوده مرجع دیده نشود.
- عدم صحت درجه حرارت فریزر یا یخچال: این نیز یک علت شایع بوده چرا که گاهی درجه حرارت یخچال ممکن است به +15 درجه برسد و درجه حرارت فریزر در بسیاری از موارد فقط در شب به -20 درجه می رسد که نتیجه این امر می تواند تخریب کالیبراتور، کنترل و معرف های کیت قبل از زمان مورد انتظار باشد.
- تغییر در درجه حرارت آزمایشگاه: در مواردی که درجه حرارت بطور وسیعی سرد یا گرم می شود بر میزان ارزش کنترل تاثیر خواهد گذاشت.

## خلاصه

بطور خلاصه راهنمای زیر جهت حل مشکلات در الیزا توسط مصرف کنندگان می تواند مورد استفاده قرار گیرد:

### 1- عدم تولید سیگنال و یا تولید سیگنال ضعیف

- حذف یا فراموش شدن انجام یک مرحله از الیزا مثلا اضافه نکردن کنژوگه آنزیمی یا سوبسترا
- عدم تهیه مناسب سوبسترا بویژه در مواردی که سوبستراها بصورت دو محلولی هستند.
- محلول شستشو غلیظ تهیه شده است.
- کنژوگه آنزیمی یا سوبسترا غیر فعال شده است.
- درجه حرارت انکوباسیون مناسب نمی باشد و حرارت انکوباسیون کمتر از حد لازم است.
- حجم سوبسترای اضافه شده به چاهک ها کافی نمی باشد.
- استفاده از فیلتر نامناسب برای قرائت نتایج (استفاده از فیلتر 405 به جای 450 نانومتر باعث کاهش جذب نوری قرائت شده میشود)
- معرف ها به درجه حرارت اتاق نرسیده اند و هنوز برای انجام آزمایش سرد هستند.
- خراشیده شدن ته چاهک با نوک سمپلر
- معرف های کیت منقضی شده اند.
- معرف ها به دلیل نگهداری غیر صحیح با کاهش فعالیت مواجه شده اند.

### 2- جذب زمینه ای بالا – افزایش جذب نوری استانداردها یا نمونه ها

- غلظت کنژوگه آنزیمی زیاد است و رقت کنژوگه طبق بروشور تهیه نشده است.
- درجه حرارت انکوباسیون نامناسب است و درجه حرارت، بالاتر از حد تعیین شده برای سنجش می باشد.
- فرآیند شستشو کافی نبوده است و یا محلول شستشو بصورت رقیق تهیه شده است.
- آلودگی آنزیمی با دیگر نمونه های سرمی وجود دارد.
- آلودگی متقاطع با دیگر نمونه ها و یا کنترل مثبت اتفاق افتاده است.

- برای قرائت جذب نوری از فیلتر صحیح استفاده نشده است. در صورتی که توصیه شده باشد از فیلتر فرانس استفاده شود و این امر انجام نشود یک جذب زمینه ای بالا مشاهده می شود.
- سوبسترا قبل از مصرف با نور در تماس بوده است.
- محتویات چاهک ها در طی انکوباسیون تبخیر شده اند.
- پی پت، نوک سمپلر با سوبسترا یا کنژوگه آنزیمی آلوده شده است.
- سوبسترا با یونهای فلزی یا عوامل اکسید کننده آلوده شده است.

### 3- شکل منحنی استاندارد نامناسب است.

- شستشو به خوبی انجام نشده است.
- رقیق سازی محلول ها به خوبی انجام نشده است و یا خطا در پی پت کردن معرف ها وجود دارد
- معرف ها به خوبی مخلوط نشده اند.
- ته چاهک ها از طرف خارج آلوده شده است و کثیف می باشد.
- از معرف هائی با سری ساخت متفاوت استفاده شده است.

### 4- دقت ضعیف یا دوپلیکیت های ضعیف

- خطا در پی پت کردن معرف ها
- خراش دادن سطح چاهک ها با نوک سمپلر
- انتقال محلول ها از چاهک های کناری
- استفاده از حجم نامناسب محلول ها
- وجود رسوب یا پارتيكل در نمونه و کنترل ها
- کثیف بودن سطح خارجی چاهک ها
- وجود اثر حاشیه ای (edge effect)

## 5- تمام چاهک ها دارای رنگ هستند.

- سوپسترا آلوده شده است.
- محلول شستشو آلوده شده است.
- رقیق سازی به خوبی انجام نشده است.
- شستشو به خوبی انجام نشده است.

## 6- تمام چاهک ها بدون تولید سیگنال هستند و فاقد رنگ می باشند.

- یکی از مراحل الیزای فراموش شده است.
- کنژوگه آنزیمی غیر فعال شده است. (با مخلوط کردن کنژوگه و سوپسترا از فعالیت ایندو معرف اطمینان حاصل می شود)
- شرایط نگهداری کیت مناسب نبوده است.
- شستشوی زیاد چاهک ها و یا غلیظ بودن زیاد محلول شستشو.

1. Crowther J R. 1001.The ELISA Guide book . human press, NewJersey.
1. Deshpande SS. 1991. Enzyme Immunoassay From Concept to Product Development. Chapman and Hall. New York
3. Burtis C A, Ashwood E R. 1001 Tietz Fundamental of Clinical Chemistry. Saunders Company. Pennsylvania.
- 4.Rowell V. 1999. Nunc Guide to Solid Phase.D