

جزوه آموزشی شماره ۲۵

راهنمای رفع خطا در ایپزا

A Guide to Troubleshooting for ELISA

گرد آوری و تنظیم:

محمدعلی حیدری اردکانی

پایگاه منطقه‌ای انتقال خون استان کهگیلویه و بویر احمد

ویرایش: خانم دکتر امینی

مدیر کنترل کیفی

تهیه شده در حوزه معاونت آموزشی و
پژوهشی سازمان انتقال خون ایران

صفحه آرایی و امور رایانه: زهرا مقصودی

شهریور ۱۳۸۲

(راهنمای رفع خطا در الیزا) (A Guide to Troubleshooting for ELISA)

مقدمه

- کیت مورد مصرف باید از کمپانی معتبر دارای تاییدیه از یکی از مراجع بین‌المللی، با بسته‌بندی مناسب و حاوی کنترل مثبت و منفی باشد.
- رعایت زنجیره سرد $^{\circ}C(8-2)$ در حمل و نقل کیت از مبدأ تا مقصد (مصرف کننده) الزامی است.
- آماده سازی محلول کنژوگه و یا سوبسترا بایستی توسط ابزارهای حجمی و سمپلهایی که در فواصل زمانی مناسب کالیبره شده و دارای صحت و دقت قابل قبول باشد صورت گیرد در تهیه محلولها باید از آب مقطر تازه متناسب با درجه توصیه شده در بروشور کیت استفاده گردد.
- آماده سازی بافر یا محلول شستشو هر بار بایستی به حد نیاز مصرفی باشد. تهیه بیش از حد محلول بافر و ماندن بافر در محیط آزمایشگاه منجر به آلودگی قارچی یا باکتریال آن میگردد، مگر آنکه طبق دستورالعمل کیت مدت زمان نگهداری آن در دمای $^{\circ}C(6-2)$ و یا اتاق تعریف شده باشد.
- نوک سمپلرها و لوله آزمایش جهت تستهای الیزا بایستی تمیز و عاری از مواد شوینده باشد که این امر به جهت ممانعت از دخالت مواد شیمیایی در واکنش‌های آنزیمی می‌باشد. بهترین لوله، جهت سوبسترا لوله شیشه‌ای است که با اسید سولفوریک رقیق شسته و با آب مقطر آبکشی شده باشد. سوبسترا باید دور از نور تهیه و نگهداری شود.

آماده سازی کیت:

- محلولهای استاندارد و کنترل موجود در کیت را باید قبل از مصرف به آرامی تکان داد تا کاملاً یکنواخت و هموزن شود. در ضمن لازم است به تعادل دمایی با محیط برسد.
- اجزاء کیت مخصوصاً کنژوگه، سوبسترا و کروموزن بایستی بلافاصله پس از استفاده به یخچال منتقل گردد. این امر منجر به افزایش پایداری کیت می‌گردد. به عبارتی تنها محلولی که تا پایان کار روی میز باقی می‌ماند محلول متوقف کننده واکنش (stopping solution) می‌باشد.

- انتقال باقیمانده استریپها بداخل کیسه مخصوص نگهداری آن جهت جلوگیری از ورود گرد و غبار و رطوبت به محیط عمل استریپها لازم است. باید در کیسه محکم بسته شده و در صورت در دسترس بودن بسته‌های رطوبت گیر از آنها استفاده شود.
- به تعادل دمایی رسیدن اجزای کیت با دمای محیط آزمایشگاه پس از خروج آن از یخچال ضروری است. زیرا دمای پایین می‌تواند باعث تغییر در میزان جذب نوری شود.
- بررسی ماکروسکوپی کلیه اجزاء کیت قبل از مصرف به لحاظ وجود کدورت، آلودگی قارچی و ذرات خارجی الزامی است.
- محلول کروموژن که قبل از مصرف تغییر رنگ داده باشد احتمالاً آلوده و فاسد شده است.
- قبل از هر مرحله مطابق دستورات کیت آماده‌سازی معرفها بایستی با دقت کافی صورت پذیرد.
- جهت کنترل کیفی و اطمینان از سالم بودن سوبسترا و کنژوگه: حجمهای برابر از کنژوگه و سوبسترا را با هم مخلوط کنید. در این حالت رنگ حاصل باید بسرعت ظاهر گردد.
- برخورد نوک سمپلر آلوده با سوبسترا و یا بازماندن طولانی مدت درب ظرف سوبسترا می‌تواند منجر به آلودگی قارچی یا باکتریال سوبسترا گردد.
- محلول سوبسترا باید طبق دستورالعمل کیت تهیه شود و تا زمانی که در دستورالعمل ذکر شده قابل نگهداری در شرایط مطلوب می‌باشد و پس از آن لازم است مجدداً بطور تازه تهیه گردد. در ضمن در هنگام تهیه محلول هرگز محلول کهنه و نو را نباید با هم مخلوط کرد.
- به هنگام ریختن کنترلها در چاهکهای میکروپلیت جهت جلوگیری از آلودگی چاهک به چاهک همیشه بایستی ابتدا کنترل منفی و سپس کنترل مثبت را اضافه نمود.
- اطمینان از صحت کارکرد دستگاهها و تجهیزات مورد مصرف در روش دستی، نیمه اتوماتیک و تمام اتوماتیک. بطور مثال برای اطمینان از صحت طول موج فیلترهای الیزا ریدر می‌توان از میکروپلیت‌های خاص که جهت کالیبراسیون تهیه شده‌اند و از برنامه‌های نرم افزاری مربوط به آن استفاده کرد.
- کنترل کیفی حجمی سمپلرهای نیمه اتوماتیک و ابزارهای حجمی حداقل سه ماه یکبار انجام شود.

- اتصال محکم نوک سمپلر به بدنه در حین کار الزامی است. نوک سمپلر حتی الامکان در ظروف در بسته نگهداری شود (جهت ممانعت از آلودگی نوک سمپلر با گرد و غبار)
- استفاده از یک روش ثابت در عمل پیپت نمودن. نمونه‌ها، کنترلها و استانداردها باید در وسط چاهک ریخته شود.
- کلیه مراحل آزمایشات الیزا باید بطور پیوسته و بدون انقطاع انجام پذیرد.

مرحله شستشو (Washing)

- هدف اصلی از شستشو، دفع و تخلیه کامل اتصالها و مولکولهای غیر اختصاصی از محیط واکنش می‌باشد، لذا رعایت دقیق تعداد دفعات و نحوه شستشو الزامی است.
- فشار بالای شستشو در روش دستی ناشی از تخلیه سریع بافر می‌تواند منجر به جداسازی و حذف اتصالات اختصاصی از کف چاهک و کاهش OD کاذب گردد.
- فشار پائین شستشو به علت تخلیه آهسته بافر در روشهای دستی می‌تواند منجر به عدم دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی و افزایش کاذب جذب نوری گردد.
- در نظر گرفتن زمان خیس خوردن چاهک در فواصل شستشو (ریختن بافر و تخلیه) طبق دستورالعمل کیت الزامی می‌باشد و معمولاً بین ۲۰ تا ۴۰ ثانیه است این مرحله به جداسازی و دفع کامل اتصالات غیر اختصاصی کمک می‌نماید.
- برای شستشو به روش دستی (باسمپلر) جهت جلوگیری از آسیب فیزیکی به چاهک الیزا و جداسازی کمپلکس‌های پوشیده شده در کف چاهک سعی کنید تخلیه نمونه به طور مایل صورت گیرد.
- در شستشو به روش دستی در مرحله مکش، چاهک‌ها بایستی بطور کامل تخلیه شوند و هیچ قطره اضافی از مایع بافر در کف چاهک باقی نماند که می‌تواند با برگرداندن یکباره میکروپلیت روی کاغذ جاذب و بدون پرز انجام گیرد.
- میزان حجم بافر جهت شستشو: بهتر است چاهک‌ها تا نزدیک لبه فوقانی چاهک از محلول شستشو پر شوند ولی در صورتیکه میزان حجم بافر در بروشور ذکر شده رعایت آن الزامی است. پر کردن لبالب چاهکها با محلول شستشو احتمال آلودگی چاهک به چاهک را افزایش می‌دهد.

- محلول شستشو PBS (با فرسفات سالین) یکی از مناسبترین محلولهای ایزوتونیک شستشو دهنده می باشد که کمترین اثرات تخریبی را روی کمپلکس Ag-Ab در سیستم های الیزا دارد.
- خشک کردن بیش از حد و طولانی مجاز نمی باشد.

□ مرحله انکوباسیون و توقف واکنش Incubation & stop reaction

- دمای محیط آزمایشگاه (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) باید با دماسنج کالیبره کنترل و تنظیم گردد. حرارت های بالای ۲۵ درجه باعث افزایش سرعت واکنش و افزایش کاذب OD، حرارت های پایین تر از ۲۰ درجه سانتیگراد موجب کاهش سرعت واکنش و کاهش OD میگردد.

- واکنش آنزیم و سوبسترا باید در شرایط تاریکی انجام پذیرد. لذا پس از اضافه نمودن سوبسترا، پلیت در محیط تاریک نگهداری شود.

- محدوده دمایی مجاز انکوباتور طبق بروشور همراه کیت تعریف می شود و تغییرات بیش از حد مجاز منجر به کاهش یا افزایش کاذب OD میگردد، لذا کنترل کیفی انکوباتور بطور ماهانه الزامی است.

- Edge-Effect یا اثر حاشیه ای انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد بواسطه شوک حرارتی و اختلاف حرارت محیط کار و محیط داخلی انکوباتور حاصل میگردد و عمدتاً در سطح استریپ هایی که مجاور درب خارجی انکوباتور قرار دارند ایجاد میگردد و جذب نوری غیر یکنواخت خصوصاً در استریپ های مجاور درب خارجی حاصل می شود. این امر بواسطه ورود ناگهانی سرمای محیط به داخل انکوباتور می باشد لذا از انکوباسیون پلیت های الیزا در مکان هایی که شرایط محیطی متغیر دارند باید پرهیز نمود.

- پوشاندن سطح استریپ ها با پوشش پارا فیلم یا برچسب های مخصوص در هر مرحله انکوباسیون ضروری است. این امر مانع تبخیر محلولها از محیط واکنش و از طرفی مانع ورود گرد و غبار به محیط عمل آنزیم میگردد.

- توقف کامل واکنش آنزیمی و جلوگیری از افزایش رنگ محیط آنزیمی بواسطه افزودن محلول اسیدی (Stopping Solution) به هر چاهک است. لزوم shaking و یا عدم آن در بروشور مشخص شده است در صورت لزوم shaking، تکان شدید باعث آلودگی چاهک شده و تکان آهسته یا بکارگیری روتاتور معمولی با قطر چرخش زیاد و تعداد دور

کم باعث عدم اختلاط خوب معرفها و منجر به پیشرفت جزئی واکنش در طی زمان و در نتیجه تغییر OD و بروز خطا میگردد.

□ خواندن میزان جذب محتوی چاهک توسط الیزاریدر الزاماً بایستی در زمان تعیین شده انجام پذیرد.

مشکلات احتمالی در تستهای الیزا:

- مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد زمینه در میکروپلیت
- مقادیر پائین کنترل مثبت یا جذب نوری پائین
- تمام پلیت مثبت تفسیر شود (در تمام چاهکها محلول دارای رنگ است).
- واکنشهای مثبت کاذب
- قدرت تکرار پذیری ضعیف یا عدم هماهنگی در جذب نوری دوچاهک دارای نمونه یکسان
- حساسیت ضعیف
- جذب نوری بالای کالیبراتورها (استانداردها) و یا کنترلهای منفی
- نمونه با جذب نوری خارج از محدوده کالیبراتورها یا استانداردها (در صورتیکه آزمایش کمی باشد)
- جذب نوری پائین نمونهها، کنترلها و استانداردها
- کنترل مثبت یا منفی خارج از محدوده تعیین شده توسط بروشور کیت
- خروج استریپها از قاب نگهدارنده آنها
- تغییر رنگ کروموژن
- تغییر رنگ مخلوط کروموژن و سوبسترا قبل از افزودن به محیط واکنش
- تغییر رنگ محلول متوقف کننده واکنش
- عدم بروز واکنش رنگی در میکروپلیت پس از افزودن سوبسترا وانکو باسیون آن
- رنگزایی با سرعت زیادی حادث شود
- رنگزایی با تأخیر و با سرعت کم حادث شود.

مقادیر بالای کنترل منفی و یا ایجاد زمینه در میکروپلیت

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> در هنگام افزودن کنترل مثبت یا نمونه ها مراقبت نمایید که چاهکهای کنترل منفی آلوده نشوند. <input type="checkbox"/> در هنگام عملیات شستشو از سرریز شدن محلول شستشو از چاهکها به یکدیگر اجتناب ورزید.	<input type="checkbox"/> آلوده شدن چاهکهای کنترل منفی با کنترل مثبت
<input type="checkbox"/> پیپت و یا لوله‌های سمپلر و نوک سمپلرها را چک کنید و در صورت وجود قطرات باقی مانده از قبل و یا مواد خشک شده در آنها باید تعویض شوند. <input type="checkbox"/> همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهکها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید. <input type="checkbox"/> برای هر نمونه برداری از نوک سمپلر جدید استفاده کنید. <input type="checkbox"/> توجه داشته باشید که نوک سمپلر به اندازه کافی بلند باشد تا نمونه‌ها با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکنند. <input type="checkbox"/> تست را با کیت جدید تکرار کنید.	<input type="checkbox"/> آلوده شدن ویال کنترل منفی
<input type="checkbox"/> هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده‌های کنژوگه از چاهکها خارج شده‌اند.	<input type="checkbox"/> شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کنترل منفی با کنژوگه
<input type="checkbox"/> این مورد مربوط به تولید کننده کیت می‌باشد و ممکن است عملیات حذف واکنشهای غیر اختصاصی فرآیندهای جلوگیری کننده از مداخله آنتی‌بادیهای غیر اختصاصی خوب صورت نگرفته باشد.	<input type="checkbox"/> اتصالات غیر اختصاصی آنتی‌بادیها
<input type="checkbox"/> این مورد نیز مربوط به تولید کننده میباشد و باید با تولید کننده تماس حاصل شود.	<input type="checkbox"/> واکنش مستقیم کنژوگه با مواد کف چاهکها

مقادیر پائین کنترل مثبت یا جذب نوری پائین

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> مطمئن شوید که دمای تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده است. (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد)	<input type="checkbox"/> در زمان انجام آزمایش دمای مواد داخل کیت به دمای اتاق نرسیده است.
<input type="checkbox"/> مطمئن شوید که نوک سمپلرها خوب و محکم فیکس شده‌اند. <input type="checkbox"/> لوله سمپلر را چک کنید تا گرفته نشده باشد. <input type="checkbox"/> در صورت عدم کالیبره بودن سمپلرها باید کالیبره شوند. <input type="checkbox"/> سمپلرها را حداقل هر ۶ ماه یکبار کالیبره کنید.	<input type="checkbox"/> مقدار نمونه برداری کمتر از مقدار لازم است.
<input type="checkbox"/> سوبسترا را درست قبل از استفاده آماده محلول کروموژن کنید. طرز تهیه محلول کروموژن سوبسترا را در بروشور کیت بدقت مطالعه کرده و به آن عمل کنید.	<input type="checkbox"/> محلول کروموژن-سوبسترا بدرستی تهیه نشده است.
<input type="checkbox"/> مجدداً تست را با اجزاء یک کیت جدید تکرار کنید. <input type="checkbox"/> در صورت هرگونه کدورت یا تغییر رنگ محلولهای موجود در کیت آنها را مصرف نکنید.	<input type="checkbox"/> آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی کنترل مثبت به باکتری

راهنمای رفع خطا در الیزا

<input type="checkbox"/> زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است. <input type="checkbox"/> ساعت آزمایشگاهی را چک کنید. <input type="checkbox"/> زمان انکوباسیون را ثبت کنید.	<input type="checkbox"/> ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت <input type="checkbox"/> عملکرد صحیح نم‌گیر داخل کیسه پلیت را بررسی کنید. <input type="checkbox"/> استریپهایی که مصرف نمی‌شوند را در کیسه پلیت قرار داده و درب آن را محکم ببندید. <input type="checkbox"/> زمان باز کردن درب کیسه پلیت را در نوبت اول مصرف بر روی کیسه پلیت ثبت کنید.
<input type="checkbox"/> دمای انکوباتور و یا اتاق را بررسی کنید. <input type="checkbox"/> دمای محیط کار را بررسی کنید.	<input type="checkbox"/> دمای انکوباسیون مناسب نیست. <input type="checkbox"/> دمای اتاق برای انکوباسیون سوبسترا خیلی پائین است.
<input type="checkbox"/> فشار شستشو را کاهش دهید. <input type="checkbox"/> مواد را قبل از استفاده خوب مخلوط کنید.	<input type="checkbox"/> شدت شستشو زیاد است. <input type="checkbox"/> مواد کیت قبل از استفاده خوب مخلوط نشده‌اند.
<input type="checkbox"/> تمام مراحل انجام تست را بدون وقفه انجام دهید. <input type="checkbox"/> افزودن محلول متوقف کننده سالم شدت رنگ را افزایش داده و باعث تثبیت رنگ میشود.	<input type="checkbox"/> در خلال انجام تست چاهکها خشک شده‌اند. <input type="checkbox"/> ضعف یا خرابی محلول متوقف کننده واکنش
<input type="checkbox"/> کنژوگه را دوباره با صحت کامل تهیه کنید. (به طرز تهیه صحیح در بروشور کیت مراجعه کنید)	<input type="checkbox"/> عدم رعایت نسبت کنژوگه و محلول رقیق کننده آن
در تمام چاهکهای پلیت رنگ ظاهر شده است	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> در هنگام شستشو چاهکها را تا نزدیک به انتها پر کنید. (حجم محلول برای هر چاهک باید طبق دستورالعمل کیت باشد). <input type="checkbox"/> محلول متوقف کننده را تعویض کرده و تست را تکرار کنید. <input type="checkbox"/> محلول رقیق کننده کنژوگه و طرز تهیه کنژوگه را بررسی کنید.	<input type="checkbox"/> حجم غیر کافی محلول شستشو برای هر چاهک <input type="checkbox"/> محلول متوقف کننده واکنش آلوده است. <input type="checkbox"/> استفاده از آنزیم کنژوگه بدون رقیق نمودن یا عدم تهیه رقت مناسب طبق دستورالعمل کیت
<input type="checkbox"/> سرم را حرارت ندهید. <input type="checkbox"/> لوله سمپلر را برای وجود ذرات مایع یا خشک شده بررسی کنید. <input type="checkbox"/> نوک سمپلر به حد کافی بلند باشد که مایع با انتهای لوله سمپلر تماس پیدا نکند.	<input type="checkbox"/> تغییرات در برخی فاکتورهای سرمی در سرم پس از حرارت <input type="checkbox"/> محلول سوبسترا یا کنژوگه آلوده است.
<input type="checkbox"/> محلول سوبسترا را پس از انقضاء تاریخ مصرف استفاده نکنید. <input type="checkbox"/> بعد از افزودن محلول متوقف کننده واکنش طبق دستورالعمل کیت در مدت تعیین شده جذب‌های نوری را بخوانید.	<input type="checkbox"/> محلول سوبسترا تازه نیست. <input type="checkbox"/> پلیت قبل از خواندن جذب نوری مدت زیادی مانده است.
<input type="checkbox"/> ظروف را قبل از استفاده چک کنید تا فاقد هرگونه آلودگی باشد.	<input type="checkbox"/> ظرف محتوی سوبسترا آلوده و کثیف است.
<input type="checkbox"/> پس از ریختن محلول سوبسترا پلیت را در یک محل تاریک قرار دهید.	<input type="checkbox"/> در خلال انکوباسیون سوبسترا پلیت در مقابل نور قرار گرفته است.

واکنشهای مثبت کاذب

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> قبل از استفاده از دستگاه واشر آنرا خوب چک کنید تا مطمئن شوید درست کار می کند. <input type="checkbox"/> کالیبراسیون و سرویس روتین را مبذول دارید.	<input type="checkbox"/> شستشوی غیر کافی یا مسدود شدن کانالهای واشر الیزا.
<input type="checkbox"/> کنژوگه را با دقت در مرکز چاهکها اضافه نموده و از تماس نوک سمپلر با کف، دیواره و لبه های چاهکها بپرهیزید. <input type="checkbox"/> در موارد استفاده از سیستمهای اتوماتیک باید در فواصل زمانی منظم کالیبره شوند. <input type="checkbox"/> لوله سمپلر را جهت عدم وجود ذرات مایع و یا خشک شده خارجی بررسی کنید و مایع نوک لوله سمپلر را آلوده نسازد.	<input type="checkbox"/> آلوده شدن چاهکها با کنژوگه <input type="checkbox"/> پاشیده شدن کنژوگه به لبه چاهکهای دیگر در هنگام ریختن کنژوگه <input type="checkbox"/> آلوده شدن سوبسترا به کنژوگه
<input type="checkbox"/> محلول متوقف کننده را تعویض کرده و تست را تکرار کنید.	<input type="checkbox"/> محلول متوقف کننده آلوده است.
<input type="checkbox"/> نمونه را قبل از استفاده سانتریفوژ نمائید.	<input type="checkbox"/> وجود گلبولهای قرمز در نمونه

راهنمای رفع خطا در الیزا

<input type="checkbox"/> پلیت را با چسب یا کاور مخصوص پلیت پوشانیده و در انکوباتور ۳۷ درجه و یا درجه حرارت مطلوب طبق دستورالعمل کیت قرار دهید تا از تبخیر مواد درون چاهکها جلوگیری شود.	<input type="checkbox"/> تبخیر نمونه یا آنزیم کنزوگه در خلال انکوباسیون ۳۷ درجه یا بالاتر.
<input type="checkbox"/> قبل از استفاده از کیت تمام محلولها و اجزای کیت را به صورت ماکروسکوپی از نظر وجود کدورت غیر معمول و یا مواد زاید دیگر بررسی کنید. <input type="checkbox"/> ظروف تهیه محلولها باید تمیز باشند و همینطور از نظر وجود بقایای پاک کنندهها بر روی آنها بررسی شوند تا عاری از آنها باشد.	<input type="checkbox"/> وجود قارچ یا آلودگی با مواد دیگر در محلولهایی نظیر محلول شستشو و یا سایر اجزای کیت
<input type="checkbox"/> از روی دستور کار کیت یک محلول کنزوگه آماده کار تازه بسازید.	<input type="checkbox"/> عدم نسبت درست محلول کنزوگه به محلول رقیق کننده
<input type="checkbox"/> دمای اتاق یا انکوباتور را چک کرده و در محدوده مجاز کالیبره کنید.	<input type="checkbox"/> دمای انکوباسیون بالا

قدرت تکرار پذیری ضعیف و عدم هماهنگی در جذب نوری دو چاهک دارای نمونه یکسان

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> برای از بین بردن حبابها از سوزن یا شی نوک تیز استفاده کنید. (برای هر یک چاهک از یک سوزن جدا استفاده کنید)	<input type="checkbox"/> حباب در چاهکها
<input type="checkbox"/> دستگاه دیسپنسر و سمپلر را چک نمایید.	<input type="checkbox"/> اشتباه در ریختن حجم محلولها و نمونهها
<input type="checkbox"/> با محلول شستشو اثر انگشت را پاک کرده و سپس پلیت را خشک کنید.	<input type="checkbox"/> اثر انگشت بر روی پلیت
<input type="checkbox"/> هر چاهک را تا نزدیک لبه بالا با محلول شستشو پر کنید، اجازه ندهید که محلول شستشو سرریز شده و وارد چاهکهای دیگر شود پس از خالی کردن محلول شستشو، پلیت را خوب خشک کنید.	<input type="checkbox"/> تکنیک شستشوی ضعیف یا غلط

حساسیت ضعیف

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> با استفاده از بروشور کیت یک محلول آماده کار کنزوگه تازه درست کنید.	<input type="checkbox"/> در تهیه کنزوگه آماده کار از مقدار مناسب و کافی کنزوگه غلیظ در محلول رقیق کننده آن استفاده نشده است.
<input type="checkbox"/> سمپلر را چک کنید.	<input type="checkbox"/> اشتباه در افزودن حجم کنزوگه آماده
<input type="checkbox"/> تست را دوباره با زمان انکوباسیون مناسب تکرار کنید.	<input type="checkbox"/> زمان انکوباسیون ناکافی
<input type="checkbox"/> دمای اتاق و انکوباتور را در محدوده مجاز تنظیم نمایید.	<input type="checkbox"/> دما در حدی نیست که سازنده کیت پیشنهاد کرده است.
<input type="checkbox"/> تست را طبق دستور بروشور و بدون وقفه‌های اضافی انجام دهید.	<input type="checkbox"/> بعد از انکوباسیون اول پلیت مدت زیادی باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد.

جذب نوری کالیبراتورها (استانداردها) بالاست

تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> تست را طبق دستور بروشور و بدون وقفه‌های اضافی انجام	<input type="checkbox"/> پلیت بعد از انکوباسیون اول مدت زیادی در دمای بالاتر از

راهنمای رفع خطا در الیزا

آنچه سازنده کیت سفارش کرده باقی مانده تا عملیات بعد روی آن صورت گیرد.	دهدید. <input type="checkbox"/> دمای محیط اتاق و انکوباتور را تنظیم نمایید.
<input type="checkbox"/> مقادیر مناسب از نمونه ها در چاهک ریخته نشده است.	<input type="checkbox"/> سمپلر را کالیبره کنید.
نمونه جذب نوری خارج از محدوده کالیبراتورها	
(استانداردها) دارد	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> غلظت در نمونه بسیار بالاست.	<input type="checkbox"/> در صورت لزوم بعد از تهیه رقت تکرار شود.
جذب نوری پائین کنترلهای مثبت، منفی و استانداردها	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> دمای اتاق زیر ۲۰ درجه سانتی گراد است.	<input type="checkbox"/> پیشنهاد میشود دمای آزمایشگاه را بین ۲۰ تا ۲۵ درجه حفظ کنید.
کنترل مثبت یا منفی خارج از محدوده تعیین شده توسط بروشور کیت	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> آلودگی کنترل	<input type="checkbox"/> تست را با یک کنترل جدید تکرار کنید.
<input type="checkbox"/> آلودگی کالیبراتورها	<input type="checkbox"/> تست را با کالیبراتورهای جدید تکرار کنید.
خروج استریپها از قاب نگهدارنده آنها	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> تجربه ناکافی تکنسین	<input type="checkbox"/> در هنگام خشک کردن پلیت باید آنرا محکم در دست گرفت و بر دو طرف آن فشار آورد تا استریپها از قاب نگهدارنده خود خارج نشوند.
عدم قرارگیری استریپها در قاب نگهدارنده	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> جهت قرار گرفتن استریپها در قاب نگهدارنده	<input type="checkbox"/> جهت استفاده را ۱۸۰ درجه تغییر دهید.
<input type="checkbox"/> قاب نگهدارنده نامناسب است.	<input type="checkbox"/> از نوع مناسب آن استفاده نمایید.
تغییر رنگ کروموژن	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> کروموژن آلوده شده است.	<input type="checkbox"/> از کروموژن تازه استفاده کنید.
تغییر رنگ مخلوط کروموژن و سوبسترا قبل از افزودن به محیط واکنش	
دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
<input type="checkbox"/> کروموژن یا سوبسترا آلوده شده‌اند.	<input type="checkbox"/> از کروموژن و سوبسترای تازه استفاده کنید.

تغییر رنگ محلول متوقف کننده واکنش (Stopping Solution)	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> از محلول متوقف کننده تازه استفاده کنید.	<input type="checkbox"/> محلول متوقف کننده آلوده شده است.
عدم بروز واکنش رنگی در میکروپلیت پس از افزودن سوبسترا و انکوباسیون آن	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> محلول تازه با نسبتهای صحیح درست کنید.	<input type="checkbox"/> نسبتهای نامناسب از کروموژن و سوبسترا ترکیب شده‌اند.
<input type="checkbox"/> با تولید کننده تماس بگیرید.	<input type="checkbox"/> سوبسترا خراب شده است.
رنگزایی با سرعت زیادی حادث می شود	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> مجدداً طبق دستورالعمل آن را تهیه کنید.	<input type="checkbox"/> کنژوگه به درستی تهیه نشده است.
<input type="checkbox"/> مطمئن شوید که ظروف و وسایل مورد استفاده آلوده نبوده اند.	<input type="checkbox"/> آنزیم کنژوگه آلوده است.
رنگزایی با تاخیر و با سرعت کم حادث می شود	
تصحیح ایراد	دلایل احتمالی
<input type="checkbox"/> قبل از انجام تست نمونه‌ها را به دمای اتاق برسانید.	<input type="checkbox"/> نمونه‌ها به دمای اتاق نرسیده اند.
<input type="checkbox"/> طرز تهیه آنرا دوباره چک کنید تست را با محلول کنژوگه دوباره آماده شده تکرار کنید.	<input type="checkbox"/> کنژوگه ضعیف است.
<input type="checkbox"/> از نگهدارنده مناسب استفاده کنید.	<input type="checkbox"/> برخی نگهدارنده‌ها اثر منفی در فعالیت آنزیم دارند. (مانند اثر بازدارنده سدیم آزاید بر آنزیم پر اکسیداز)
<input type="checkbox"/> دمای آزمایشگاه و سوبسترا را چک کنید. (دما باید بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد باشد)	<input type="checkbox"/> دمای پائین آزمایشگاه و یا دمای پائین سوبسترا

رفرانس:

- طبقه بندی الیزا انتشارات شرکت پیشواز طب
- منابع خطا در الیزا انتشارات شرکت فردوس رای
- جزوات مربوط به الیزا - دانشگاه علوم پزشکی شیراز