

شرکت تجهیزات سنجش

دفترچه راه اندازی الیزا ریدر

Strip - 503

فهرست مطالب

۳	مقدمه
۳	انواع تستهای الیزا
۴	دستگاه الیزا ریدر مدل <i>Strip-503</i>
مد ۴	وظایف اصلی الیزا ریدر <i>Strip-503</i>
مد ۵	برنامه وکالیراسیون
۶	قرائت ۶ مد ساعت
۸	صفحه کلید
۱۰	تنظیم غلظت
۱۱	تنظیم ساعت
۱۱	کالیبراسیون
۱۲	تنظیم OD استاندارد از طریق صفحه کلید
۱۲	<i>Blank</i>
۱۲	<i>Duplicate</i>
۱۳	<i>Dual Wavelength</i>
۱۴	لیست نام سی برنامه اول <i>Strip-503</i>
۱۵	راهنمای سریع <i>Strip-503</i>
۲۰	ضمیمه (الیزا ریدر ونکات کاربردی)
۲۰	مقدمه
۲۰	الیزا ریدر
۲۲	<i>Blanking</i>
۲۲	روش <i>Bichromatic Reading</i>
۲۳	نکات کاربردی
۲۵	اصول انتخاب طول موج ۴۰۵ یا ۴۵۰ برای غلظتهای مختلف

مقدمه :

یک تست الیزا به مراحل زیر تقسیم می‌گردد :

الف - آماده سازی **Well** ها که با **Coating** آنتی بادی یا آنتی ژن خاص برای تست مورد نظر در کارخانه سازنده انجام می‌پذیرد .

ب - عملیات آماده سازی یک کیت برای اندازه‌گیری شامل :

ریختن سرم بیمار داخل **Well** ها ، شستشو ، انکوباسیون ، اضافه کردن محلول تثبیت (**Stopping Solution**) و **Shaking** که موارد مذکور در یک تست ممکن است چند بار تکرار شود .

ج - خواندن **OD** نمونه‌ها و مقایسه آنها با نمونه‌های استاندارد و استخراج اطلاعات تحلیلی و کاربردی شامل غلظت و **ABS%** و یا تفسیر نتیجه ابتلا یا عدم ابتلا در بعضی از تستها که به صورت پاسخ مثبت یا منفی گزارش می‌گردد . این عمل توسط دستگاه الیزا ریدر انجام می‌شود .

انواع تستهای الیزا:

الف - تست‌های تعیین غلظت که در مد (**PTP (Point to point)** یا **REG (Regresion)** انجام می‌شود . در این گونه تست‌ها ابتدا نمونه‌های استاندارد با غلظت‌های مشخص به دستگاه معرفی می‌گردد . در این معرفی غلظت استاندارد روی دستگاه تنظیم شده ، سپس **OD** آنها توسط خود دستگاه اندازه گیری می‌شود . به این عمل کالیبراسیون می‌گویند .

تعداد استانداردها در تست‌های گوناگون از یک تا شش عدد متفاوت است . پس از تنظیم غلظت‌های استاندارد و خواندن **OD** ها ، یک سری نقطه زوج (**OD** و **C**) خواهیم داشت . این نقاط روی یک منحنی بنام منحنی کالیبراسیون قرار می‌گیرند.

عمل کالیبراسیون که به مفهوم معرفی همین منحنی به دستگاه است قبل از هرگونه تست تعیین غلظت باید انجام شده باشد . برای تعیین غلظت یک نمونه ابتدا مقدار **OD** توسط دستگاه خوانده می‌شود و سپس از روی منحنی مقدار غلظت محاسبه می‌گردد .

درمد محاسباتی **PTP** یا **Point to Point** منحنی کالیبراسیون شامل تکه پاره خطهایی است که زوج نقاط استاندارد را به هم وصل می‌نماید . در مد محاسباتی **REG** یا **Regresion** منحنی کالیبراسیون شامل تنها یک خط می‌باشد که به بهترین شکل ممکن از نزدیک نقاط کالیبراسیون عبور می‌نماید .

ب - تستهای **Cut off** : در این تست‌ها نمونه سرم بیمار به منظور بررسی ابتلا یا عدم ابتلا به یک بیماری خاص مورد بررسی قرار می‌گیرد . به این منظور چند نمونه بیمار مبتلا و چند نمونه غیرمبتلا تحت عنوان استانداردهای مثبت و منفی به دستگاه معرفی شده و اصطلاحاً دستگاه کالیبره می‌شود . عمل کالیبراسیون در این مورد منحصراً به ثبت **OD** نمونه‌های مثبت و منفی محدود می‌گردد و سپس خط مرزی بین این **OD** ها به عنوان مرز تشخیص بیماری به کار می‌رود

ج - تعیین $\%ABS$: در این تست نسبت OD بیماران مختلف نسبت به یک نمونه استاندارد اندازه‌گیری و به صورت درصد بیان می‌گردد. این استاندارد معمولا اولین $Well$ از $Strip$ می‌باشد.

دستگاه الیزاریدر مدل Strip - 503

این دستگاه یک $Strip Reader$ با ویژگی‌های منحصر به فرد می‌باشد، که در عین کامل بودن از کاربری بسیار ساده‌ای برخوردار است. مهمترین ویژگی $Strip - 503$ که سادگی کار آن را به همراه داشته‌است، تفکیک مد قرائت از مد برنامه و کالیبراسیون می‌باشد. این در حالیست که برای ساعت دستگاه نیز یک مد نمایشی ویژه در نظر گرفته شده است.

وظایف اصلی الیزاریدر مدل Strip - 503

وظایف اصلی یک دستگاه الیزاریدر از این قرارند:

۱- خواندن نمونه OD ها و اعلام آنها.

۲- پذیرش پارامترهای تست شامل:

الف - طول موج ($405, 450, 500, 630nm$)

ب - کالیبراسیون $Single$ یا $Duplicate$

ج - قرائت $Dual Wavelength$ یا $Single Wavelength$

د - نحوه $Blanking$

ه - تعداد استانداردها ($S \#$)

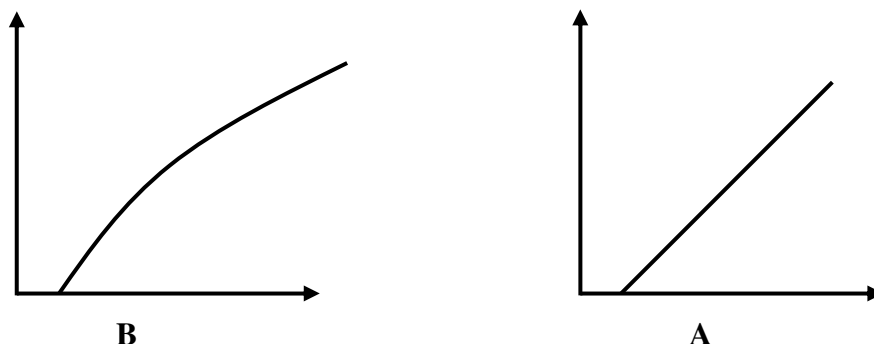
و - مد ریاضی محاسباتی ($UP Take - R, Cut off, \%ABS, REG, PTP : A - mode$)

۳- پذیرش منحنی کالیبراسیون شامل زوج نقاط (OD, C) محلولهای استاندارد

۴- مقایسه OD نمونه‌ها با OD محلول‌های استاندارد (با غلظت معلوم) و محاسبه غلظت این نمونه‌ها.

بر خلاف تستهای بیوشیمی در تستهای الیزا رابطه OD (جذب) با C (غلظت) خطی نیست و به این دلیل معمولا تعداد استانداردها بیش از یکی است.

دو نمونه از منحنی دو بعدی کالیبراسیون را در شکل زیر مشاهده می‌کنید.



منحنی **A** یک منحنی خطی است و به همین دلیل در این موارد برای محاسبه غلظت نمونه‌های ناشناخته استفاده از یک استاندارد و یک **Blank** کفایت می‌کند.

منحنی **B** یک منحنی غیرخطی است. این منحنی از نقاط (**OD, C**) عبور می‌کند. معمول‌ترین روشها برای محاسبه غلظت نمونه‌ها **(PTP) Point to point** و **(REG) Regression** می‌باشد.

در دستگاه الیزاریدر مدل **Strip - 503** می‌بایست ابتدا منحنی کالیبراسیون را به دستگاه معرفی نمائیم. به این منظور غلظت استانداردها طبق کیت به دستگاه معرفی می‌شود. (این عمل با تنظیم غلظت‌های **CI** تا **C6** انجام می‌شود). سپس **Strip** حاوی این استانداردها داخل دستگاه گذاشته شده و با زدن کلید **OD, CAL** استانداردها خوانده شده، به صورت اتوماتیک به حافظه مربوط به منحنی کالیبراسیون سپرده می‌شود.

در روش **PTP** برای تعیین غلظت نمونه‌های مجهول، دستگاه **OD**ها را خوانده بسته به اینکه **OD** خوانده شده بین **OD** های کدام دو استاندارد واقع شده باشد، از رابطه خط واصل آن دو استاندارد مقدار غلظت را محاسبه می‌نماید.

مد برنامه و کالیبراسیون (Programming and Calibration Mode)

در **Strip - 503** پنجاه برنامه کاربردی روی حافظه ماندگار دستگاه قابل ذخیره و بازیابی می‌باشد. هر برنامه کلیه اطلاعات و پارامترهای کالیبراسیون را شامل می‌گردد. این مد دارای قابلیت‌های زیر می‌باشد: الف - تنظیم پارامترهای تست شامل:

- تنظیم طول موج (**405, 450, 500, 630nm**)
- تعداد استانداردها (از صفر تا شش عدد)
- مد محاسباتی (**UP Take - R, Cut off, %ABS, REG, PTP**)
- نوع **Blanking**
- کالیبراسیون تک نسخه‌ای یا دونسخه‌ای (**Single** یا **Duplicate**)
- قرائت در یک طول موج یا دو طول موج
- (**Bichromatic** یا **Dual Wavelength**) (**Monochromatic** یا **Single Wavelength**)

ب - تنظیم غلظت‌های استاندارد که در کالیبراسیون مدهای **PTP** و **REG** بکار می‌رود.

ج - در صورت نیاز تنظیم **OD** های استانداردها از طریق صفحه کلید.

د - **Load** و **Save** ذخیره و بازیابی اطلاعات برنامه روی حافظه ماندگار دستگاه.

ه - کالیبراسیون

ی - پرینت اطلاعات برنامه

مد قرائت (Reading Mode)

- در این مد **OD** تک تک **Well** های یک **Strip** خوانده و اعلام می شود و پارامترهای غلظت در مد **REG** یا **PTP** ، **%ABS** در مد **ABS** و تفسیر مثبت و منفی در مد **Cut Off** اعلام می گردد . این مد دارای قابلیت های زیر می باشد :
- تنظیم شماره اولین و آخرین **Well** مورد نظر در **Strip** که باید توسط دستگاه خوانده شود .
 - قرائت **Well** ها .
 - پرینت اطلاعات .
 - بازیابی اطلاعات از روی حافظه ماندگار .
 - در مد قرائت (**RD**) برنامه های یک تا سی دارای اسامی اختصاری ۳۰ تست الایزا می باشد . این اسامی قابل تغییر و اضافه کردن نیست و برنامه های ۳۱ الی ۵۰ بدون نام در نظر گرفته شده است .

مد ساعت Clock Mode

در این مد ساعت و تاریخ جاری را می توان مشاهده و تنظیم نمود . این ساعت و تاریخ در ابتدای نتایج چاپی تستها و کالیبراسیون ها همواره چاپ می گردد .

DATE = 02 - 03 - 17

TIME = 13: 25

نشان دهنده در مد نمایشی ساعت

با زدن کلید **ENTER** ، **Cursur** جابجا می شود .
با زدن کلید **SET** ، **Item** انتخاب شده با **Cursur** تنظیم می گردد و پس از تکمیل تنظیمات با زدن کلید **SAVE** ساعت و تاریخ تنظیم شده به حافظه **NVM** سپرده می شود .

P08 ABS F1 SO D DW I

C1 = 32500 0D = 0.001 B

نشان دهنده در مد نمایشی برنامه

P08 : معرف شماره برنامه است که با کلیدهای **PROG+** ، **PROG-** ، **UP** و **DOWN** قابل تنظیم می باشد .
ABS : معرف مد محاسباتی است که با زدن کلید **A - MODE** تنظیم می گردد .
F1 : شماره فیلتر را نشان می دهد که با زدن کلید **FILTER** تنظیم می گردد .
S # : تعداد استانداردها را نشان می دهد که در این نشان دهنده روی صفر تنظیم شده است . با زدن کلید **STD #** تعداد استانداردها تنظیم می گردد .

D: معرف *Duplicate* است که با زدن کلید *Dup* به حالت *Single* تغییر وضعیت می دهد. (*S* یا *D*)
DW: معرف *Dual Wavelength* می باشد که با زدن کلید *DW* تغییر وضعیت می دهد. (*SW* یا *DW*)
B: معرف *Blank* است. در صورت وجود این نماد روی نشان دهنده اولین *Well* به عنوان *Blank* در نظر گرفته می شود. با زدن کلید *BL* این نماد پاک شده و *Blanking* با هوا انجام می گردد.
C1: غلظت اولین استاندارد و *OD* مقابل آن نیز *OD* اولین استاندارد را نشان می دهد با زدن کلید *C#* می توان زوج نقاط منحنی کالیبراسیون را یک به یک مشاهده نمود.

RD08	FSH	1-5	DF1
1 : %ABS = 428		OD = 0.003	

نشان دهنده در مد نمایشی *Reading* و مد محاسباتی *%ABS*

RD09	LH	1-8	DF2
1:C = 003.65		OD = 0.236	

نشان دهنده در مد نمایشی *Reading* و مد محاسباتی *PTP* یا *REG*

RD22	RUB	1-6	B	SF3
1:POS:08			OD = 2.25	

نشان دهنده در مد نمایشی *Reading* و مد محاسباتی *Cut off*

بر روی سطر بالای *LCD* عددی که بعد از حروف *RD* مشاهده می شود، شماره برنامه بوده و از *01* تا *50* قابل تغییر است. پس از آن نام اختصاری برای تست های مختلف الایزا مشاهده می شود که بر روی برنامه های *I* الی *30* بصورت ثابت در نظر گرفته شده و برنامه های *31* الی *50* فاقد نام می باشد. اعدادی که بعد از نام تست آمده و با یک خط تیره از هم جدا شده اند به ترتیب شماره اولین و آخرین *Well* مورد نظر برای خواندن را به دستگاه معرفی می کند. شماره اولین *Well* با کلید *FIRST* و آخرین *Well* با کلید *LAST* از یک تا هشت قابل تنظیم می باشند. بر روی *LCD* بعد از این اعداد در صورتی که در برنامه برای این تست بلانک در نظر گرفته شده باشد حرف *B* بر روی

LCD نمایان بوده و در غیر اینصورت حرف **B** بر روی **LCD** مشاهده نمی شود. آخرین نماد مشخص شده در سطر بالای **LCD** به عنوان مثال **DF1** می باشد که **D** به مفهوم **Dual Wavelength** و **F1** به معنی انتخاب فیلتر یک به عنوان فیلتر اصلی می باشد. این نماد می تواند **DF2**، **SF1**، **SF2**، **SF3** و یا **SF3** باشد. (هر گاه خوانش **Dual Wavelength** یا **Bichromatic** را انتخاب کنیم سیستم فیلتر چهارم یعنی **630nm** را به عنوان فیلتر رفرانس بکار می گیرد). سطر دوم **LCD** نتیجه خوانش دستگاه را اعلام می کند.

صفحه کلید Strip - 503



صفحه کلید **Strip - 503** از شانزده کلید تشکیل شده است. که اغلب این کلیدها دارای سه وضعیت کاری هستند با زدن کلید **NUM LOCK** صفحه کلید از وضعیت عادی به وضعیت عددی و برعکس تغییر حالت می دهد. وضعیت عددی در تنظیم غلظت های استاندارد بکار می رود و در این وضعیت ارقام صفر تا نه توسط کلید های مربوطه وارد می گردد. در این وضعیت گوشه سمت راست نشان دهنده حرف **N** به چشم می خورد. اگر کلید **NUM LOCK** را دو بار فشار دهیم می توانیم **OD** های استاندارد را از طریق صفحه کلید وارد برنامه کنیم. با زدن کلید **INV** صفحه کلید از وضعیت عادی به وضعیت **INV** می رود، در حالت عادی کلیدهای مشکی و در وضعیت **INV** کلیدهای سفید فعال می باشند. طراحی صفحه کلید به گونه ای است که اغلب کلیدهای لازم روی مد **Prog** در وضعیت **INV** و اغلب کلیدهای مد **Read** در وضعیت عادی می باشند. به همین دلیل هنگامی که با کلید **MODE** به مد برنامه می رویم به صورت اتوماتیک صفحه کلید در حالت **INV** قرار می گیرد. این مطلب در مد **Read** برعکس می باشد. در اینجا عملکرد تک تک کلید ها توضیح داده می شود. (در داخل پراوتز مدی که کلید فعال می باشد مشخص گردیده است)

PROG + : (برنامه - قرائت) باززدن این کلید هر بار یک رقم شماره برنامه افزایش می یابد.

PROG - : (برنامه - قرائت) باززدن این کلید هر بار یک رقم شماره برنامه کاهش می یابد.

UP : (برنامه - قرائت) با زدن این کلید هر بار ده رقم شماره برنامه افزایش می یابد.

DOWN : (برنامه - قرائت) با زدن این کلید هر بار ده رقم شماره برنامه کاهش می یابد.

MODE : (برنامه - قرائت - ساعت) تغییر مد دستگاه.

FIRST : (قرائت) تنظیم شماره اولین **Well** مورد نظر. در مد قرائت با فشار دادن این کلید روی **LCD** عدد اولین حفره خوانش از یک تا هشت تغییر می کند.

LAST : (قرائت) تنظیم شماره آخرین **Well** مورد نظر. در مد قرائت با فشار دادن این کلید روی **LCD** عدد آخرین حفره خوانش از یک تا هشت تغییر می کند.

A - MODE : (برنامه) تنظیم مد محاسباتی **REG**، **PTP**، **Cut off**، **%ABS** و **UP take**

FILTER : (برنامه) تنظیم شماره فیلتر مورد نظر برای تست. با زدن این کلید روی **LCD** برای طول موجهای **405nm - 450 - 500 - 630** به ترتیب **F1**، **F2**، **F3** و **F4** ظاهر می گردد.

STD # : (برنامه) تنظیم تعداد استانداردهای موجود در کیت. هنگام کالیبراسیون به همین تعداد استاندارد داخل **Well** ها ریخته می شود.

SAMPLE : (قرائت) این کلید حافظه ماندگار دستگاه را مرور می کند. این حافظه پس از هر بار قرائت با اطلاعات جدید پر می گردد و با زدن کلید **SAMPLE** می توان **OD** قرائت شده تک تک **Well** ها را مشاهده نمود.

C # : (برنامه) شماره غلظت استاندارد در مد برنامه با این کلید تنظیم می گردد.

READ : (قرائت) با زدن این کلید عمل قرائت **Well** ها انجام می شود.

CAL : (برنامه) باززدن این کلید عمل کالیبراسیون انجام می شود. (کالیبراسیون به مفهوم خواندن **OD** ها، به حافظه سپردن آنها و رسم منحنی مربوطه می باشد)

POINT : (برنامه) تنظیم محل نقطه ممیز غلظت.

DUP: (برنامه) با زدن این کلید حرف **S (Single)** یا **D (Duplicate)** که روی **LCD** در مد برنامه مشاهده می شود تغییر می کند. در حالت **Single**، **OD** های خوانده شده در هنگام کالیبراسیون مستقیماً به حافظه سپرده می شود و در حالت **Duplicate** مقادیر خوانده شده با مقادیر قبلی حافظه متوسط گیری می شود.

PRN: (برنامه - قرائت) با زدن این کلید عمل پرینت اطلاعات در صورت اتصال به پرینتر انجام می شود و در مد برنامه اطلاعات کالیبراسیون و منحنی مربوطه و در مد قرائت اطلاعات آخرین **Reading** پرینت می گردد.

D.W. (Dual Wave Length یا Bichromatic): (برنامه) با این کلید قرائت دو رنگ یا تک رنگ در هنگام کالیبراسیون و **Reading** تعیین می گردد.

BL: (برنامه) این کلید نحوه **Blanking** را هنگام کالیبراسیون یا قرائت تنظیم می کند.

ESC: (برنامه - قرائت) با این کلید در شرایط لازم از انجام یک فانکشن انصراف می دهیم.

SAVE: (برنامه - ساعت) با این کلید اطلاعات غلطها و پارامترها (در مد برنامه) و ساعت و تاریخ (تنظیم شده در مد ساعت) به حافظه ماندگار دستگاه سپرده می شود.

LOAD: (برنامه - قرائت - ساعت) با این کلید اطلاعات غلطها و پارامترها (در مد قرائت یا برنامه) و ساعت (در مد ساعت) از حافظه ماندگار به حافظه اصلی منتقل می گردد.

ENTER: (برنامه - ساعت) این کلید در تنظیمات مختلف برای تأیید اطلاعات یا ذخیره سازی آن روی حافظه ماندگار بکار می رود و در مد ساعت برای تعیین محل **Cursur** کاربرد دارد.

NUM LOCK: (برنامه) با این کلید، صفحه کلید از حالت عادی به حالت عددی و برعکس تغییر وضعیت می دهد.

INV: (برنامه - ساعت - قرائت) با این کلید صفحه کلید از حالت عادی به حالت **INV** و برعکس تغییر وضعیت می دهد.

تنظیم غلطت :

تنظیم غلطت های استاندارد در مد برنامه انجام می شود. به این منظور با کلید **# C** شماره غلطت استاندارد مشخص شده و برای تنظیم غلطت با زدن کلید **NUM LOCK** غلطت روی **LCD** صفر می شود و علامت مساوی مقابل آن شروع به چشمک زدن می کند و در این حالت صفحه کلید به وضعیت عددی منتقل شده و می توان غلطت مورد نظر را وارد نمود. پس از تنظیم غلطت با فشار دادن کلید **ENTER** عدد وارد شده به حافظه دستگاه منتقل شده و شماره استاندارد اضافه می گردد و به همین ترتیب پس از تنظیم همه غلطت ها با فشار دادن کلید **SAVE** می توان اطلاعات وارد شده را به حافظه ماندگار دستگاه منتقل نمود.

برای تنظیم محل ممیز غلطت از کلید **POINT** استفاده می شود. برای غلطت حداکثر دو رقم پس از اعشار در نظر گرفته شده است.

تنظیم ساعت :

با زدن کلید **ENTER** مکان نمای نشان دهنده روی روز - ماه - سال و ساعت و دقیقه جابجا می‌گردد. با زدن کلید **SET** می‌توان آن مورد را تغییر داد و نهایتاً با زدن کلید **SAVE** اطلاعات تنظیم شده به حافظه **NVM** منتقل می‌گردد. نکته حائز اهمیت آن است که تغییرات زمان تنها در هنگام وارد شدن به وضعیت ساعت قابل مشاهده است.

کالیبراسیون :

مدهای **PTP**، **REG** و **Cut off** نیاز به کالیبراسیون دارند. کالیبراسیون به مفهوم معرفی نمونه های استاندارد کیت به دستگاه می‌باشد. غلظت‌های این استانداردها قبل یا بعد از کالیبراسیون روی دستگاه تنظیم می‌گردد. با این وجود بهتر آن است که قبل از کالیبراسیون تمامی پارامترها و غلظت‌ها روی دستگاه تنظیم شده باشند. این پارامترها شامل موارد زیر می‌باشد:

- ۱ - شماره فیلتر
- ۲ - تعداد استانداردها
- ۳ - مد محاسباتی
- ۴ - خواندن به صورت **Dual Wavelength** یا **Single Wavelength** (**DW** یا **SW**)
- ۵ - **Duplicate** شدن یا نشدن **OD** ها
- ۶ - وضعیت **Blank** (با هوا یا اولین **Well**)

پس از تنظیم این پارامترها به شیوه مطرح شده در قبل، برای کالیبراسیون مراحل زیر دنبال می‌شود. برای کالیبراسیون **Strip** حاوی نمونه‌های استاندارد را داخل **Carrier** قرار داده و کلید **CAL** را فشار می‌دهیم. هنگام پر کردن **Well** ها باید دقت کنیم استانداردها به ترتیب غلظت از کمترین مقدار داخل **Well** ها ریخته شود. نخستین **Well** می‌بایست حاوی رقیق‌ترین استاندارد باشد (این در صورتی است که **Blank** با هوا تنظیم شده باشد در غیر این صورت دومین **Well** می‌بایست حاوی رقیق‌ترین استاندارد باشد) با زدن کلید **CAL**، **Strip** به داخل دستگاه کشیده شده، **OD** ها خوانده و به حافظه سپرده می‌شود. پس از تکمیل عمل کالیبراسیون در صورت وجود خطا، نوع آن همراه با آلام ممتد اعلام می‌گردد.

کالیبراسیون در مد **Cut off** به منظور معرفی نمونه‌های مثبت و منفی انجام می‌گیرد. در این حالت حتماً می‌بایست استانداردهای منفی (از یک تا سه عدد) قبل از استانداردهای مثبت ریخته شود. در هنگام کالیبراسیون اولین **Well** های **Strip** (به تعداد استانداردهای تنظیم شده) به عنوان استانداردهای منفی و بقیه به عنوان مثبت تلقی می‌گردند. به عنوان مثال هنگام کالیبراسیون در مد **Cut off** و با یک نمونه منفی و یک نمونه مثبت باید اولین **Well** حاوی نمونه منفی و دومین **Well** حاوی نمونه مثبت باشد.

تنظیم OD استاندارد از طریق صفحه کلید :

اگر یک یا چند استاندارد گذاشته شده ، **OD** مناسبی نداشت و در نتیجه کالیبراسیون با مشکل مواجه شد ، می توانیم **OD** مورد نظر را به صورت دستی تغییر داده و مشکل کالیبراسیون را بر طرف کنیم . بدین منظور در حالیکه در مد برنامه هستیم با فشار کلید **# C** ، شماره استاندارد **OD** نامناسب داشته را بر روی **LCD** نمایان می کنیم. حال کلید **NUM LOCK** را دو بار فشار می دهیم ، بدین ترتیب **OD** روی **LCD** صفر شده و مساوی مقابل آن شروع به چشمک زدن می کند . صفحه کلید در این حالت رقمی بوده و ما عدد مورد نظر برای این **OD** را وارد کرده و کلید **SAVE** را فشار می دهیم . اگر **OD** دو یا چند استاندارد پشت سر هم را بخواهیم وارد کنیم ، می توانیم پس از دادن عدد **OD** بجای فشار کلید **SAVE** کلید **ENTER** را فشار دهیم . با این کار عدد وارد شده به حافظه رفته و **OD** بعدی بر روی **LCD** نمایان می شود آنرا نیز وارد کرده و **ENTER** را می زنیم ، به همین ترتیب تا اینکه آخرین **OD** را وارد کنیم . پس از وارد کردن آخرین **OD** باید کلید **SAVE** را فشار دهیم تا اطلاعات وارد شده همگی به حافظه اصلی دستگاه منتقل شود .

بدین ترتیب ما می توانیم **OD** های صحیح یک کالیبراسیون مطلوب را به سیستم بدهیم که پس از فشار کلید **SAVE** کالیبراسیون جدید با **OD** های وارد شده در برنامه خواهد بود و می توانیم به مد قرائت رفته و تست ها را بخوانیم .

:Blank

در **Strip - 503** برای **Blanking** دو امکان پیش بینی شده : امکان نخست **Blanking** با هوا و امکان دوم **Blanking** با اولین **Well** از **Strip** می باشد .
با زدن کلید **BL** در مد برنامه نوع **Blanking** تنظیم می گردد ، در صورتی که در گوشه سمت راست **LCD** خط پایین حرف **B** نمایش داده شود به مفهوم **Blank** با اولین **Well** و در صورت عدم مشاهده آن به مفهوم **Blank** با هوا خواهد بود.

Blanking با **Well** خالی در حذف اثرات جذبی **Well** موثر می باشد و در صورتی که اولین **Well** حاوی **Blank** باشد اثرات جذبی حلال های مربوطه نیز حذف می گردد و این در دقت آزمایشات تأثیر بسزایی دارد. با این همه در بعضی از آزمایشات نوع **Blanking** تأثیر چندانی ندارد . به عنوان مثال **Cut off** یکی از این تست ها می باشد .

:Duplicate

فعال بودن **Duplicate** با حرف **D** روی **LCD** و غیر فعال بودن آن با **(Single) S** مشخص می گردد .
Duplicate یکی از امکانات **Strip - 503** برای دقت بیشتر کالیبراسیون ها است و با استفاده از آن **OD** بکار رفته برای کالیبراسیون متوسط گیری می شود . برای استفاده از این امکان دو **Strip** حاوی استانداردهای یکسان آماده می شود . دستگاه را در حالت **Single** با اولین **Strip** کالیبر می نماییم و سپس دستگاه را به حالت **Duplicate** برده آنرا با

Strip دوم کالیبر می‌کنیم. ویژگی خاص **Strip - 503** آن است که این عمل می‌تواند به تعداد دلخواه و حتی با یک **Strip** تکرار شود.

در هنگام کالیبراسیون در مد **Single**، **OD** های خوانده شده مستقیماً به حافظه سپرده می‌شود و در مد **Duplicate** **OD** های خوانده شده با **OD** های موجود در حافظه متوسط گیری شده و سپس به حافظه منتقل می‌گردد.

:Dual WaveLength

در الیزا ریدر چه در هنگام کالیبراسیون و چه در قرائت، **OD** نمونه‌ها در یک طول موج مشخص، تعیین کننده غلظت می‌باشد. طبیعتاً دستگاه می‌بایست در این طول موج **OD** را خوانده ثبت یا اعلام کند.

در عمل برای دقت بیشتر در **Dual Wavelength** با اندازه گیری **OD** نمونه در دو طول موج (اصلی و فرعی) و سپس تفریق این دو با دقت بیشتری غلظت نمونه تعیین می‌گردد.

در صورتی که دستگاه روی مد **Dual Wavelength** باشد نماد **DW** روی **LCD** مشاهده می‌شود.

در این مد طول موج انتخاب شده روی دستگاه به عنوان طول موج اصلی و **630 nm** به عنوان طول موج فرعی در نظر گرفته می‌شود و **OD** نهایی از رابطه زیر محاسبه و اعلام می‌گردد.

در صورتی که فیلتر **405** انتخاب شده باشد: $OD = OD(405) - OD(630)$

در صورتی که فیلتر **450** انتخاب شده باشد: $OD = OD(450) - OD(630)$

در ضمیمه این دفترچه راهنما توضیحات تکمیلی در خصوص مد **Dual Wavelength** آمده است.

لیست نام سی برنامه اول در Strip - 503

نام مخفف	شماره
HCG	1
T4	2
T3	3
TSH	4
T3U	5
FT4	6
FT3	7
FSH	8
LH	9
PRL	10
EST	11
PRG	12
TST	13
DHE	14
GH	15
HEL	16
HBS	17
HBC	18
HBE	19
HIV	20
TOX	21
RUB	22
CMV	23
HSV	24
HAV	25
HCV	26
CEA	27
AFP	28
FER	29
PSA	30

راهنمای سریع Strip - 503

- می‌خواهیم یک کیت **BHCG** فرضی با مشخصات ذیل را بر روی برنامه شماره یک تنظیم کنیم:

❖ طول موج **450** نانومتر

❖ غلظت‌های استاندارد ← **10 - 50 - 100 - 500 - 1000 - 2000**

۱- با استفاده از کلیدهای **UP**، **PROG** و یا **DOWN** به برنامه شماره یک بروید. اگر در مد **Reading** هستید با دوبار فشار کلید **MODE** به مد **Program** خواهید رفت.

PO1	ABS	F1	SO	D	SW	
C3 =				OD =		I B

شکل شماره ۱

شکل شماره یک، **LCD** دستگاه را در برنامه یک نشان می‌دهد. اطلاعات فوق بصورت فرضی بوده و ممکن است شما بر روی **LCD** دستگاه خود اطلاعات دیگری را مشاهده نمایید. در هر صورت تمامی این پارامترها باید برای کیت مورد استفاده شما تنظیم گردد.

کلیدهایی که جهت تنظیمات مختلف برنامه استفاده می‌شوند، کلیدهایی هستند که با فشار کلید **INV** فعال می‌گردند. با فشار کلید **INV** حرف **I** در سمت راست **LCD** نمایان می‌شود. در ابتدای ورود به مد **Program** بصورت اتوماتیک کلید **INV** فعال شده و حرف **I** در کنار **LCD** دیده می‌شود. پس تنظیمات را شروع کنید.

۲- بر روی **LCD** در کنار شماره برنامه، مد محاسباتی تست قرار دارد که در مورد تستهای دارای چند استاندارد معمولاً از مد محاسباتی **Point to Point (PTP)** استفاده می‌شود. لذا با فشار مکرر کلید **MODE - A** این قسمت را بر روی **PTP** ثابت نمایید. (شکل شماره ۲)

PO1	PTP	F1	SO	D	SW	
C3 =				OD =		I B

شکل شماره ۲

۳- فیلتر کیت فرضی ما **450** نانومتر است پس کلید **FILTER** را چند بار فشار دهید تا **F2** را بر روی **LCD** ببینید. (شکل شماره ۳)

PO1	PTP	F2	SO	D	SW	
						I
C3 =			OD =			B

شکل شماره ۳

۴- پارامتر بعدی بر روی **LCD** مشخص کننده تعداد استاندارد کیت است. شما می‌توانید تا شش استاندارد برای هر برنامه **Strip - 503** تعریف نمایید. پس کلید **STD#** را چند بار فشار دهید تا **S6** را بر روی **LCD** مشاهده نمایید. (شکل شماره ۴)

PO1	PTP	F2	S6	D	SW	
						I
C3 =			OD =			B

شکل شماره ۴

۵- بعد از تعداد استانداردها بر روی **LCD** حرف **D** یا **S** دیده می‌شود که **D** یا **Duplicate** زمانی بکار می‌رود که برای دقت بیشتر دو سری استاندارد گذاشته شود و **S** یا **Single** که معمولا این حالت بکار می‌رود زمانی است که فقط یک سری استاندارد گذاشته می‌شود. (تنظیم برنامه باید همیشه در حالت **S** باشد و اگر دو سری استاندارد گذاشته شده پس از خواندن استریپ اول، برنامه را در حالت **D** قرار داده و استریپ دوم استانداردها را بخوانید) فشار کلید **DUP** بین دو حالت **D** و **S**، **LCD** را تغییر می‌دهد. (شکل شماره ۵)

PO1	PTP	F2	S6	S	SW	
						I
C3 =			OD =			B

شکل شماره ۵

۶- پارامتر آخر تنظیمی در سطر اول **LCD**، خوانش تک فیلتره یا دو فیلتره است (**SW** تک فیلتره و **DW** دو فیلتره). فیلتر اصلی در برنامه انتخاب می‌شود و فیلتر دوم را خود سیستم همیشه **630** نانومتر انتخاب می‌نماید) توصیه می‌کنیم همیشه با دو فیلتر خوانشها را انجام دهید چرا که دقت بسیار بیشتری داشته و احتیاج به گذاشتن **Blank** نیز نخواهید داشت. (رجوع شود به توضیحات مربوطه در بخش ضمیمه الایزایدر و نکات کاربردی) (شکل شماره ۶)

PO1	PTP	F2	S6	S	DW	
C3 =		OD =				I B

شکل شماره ۶

۷- نمایان بودن حرف **B** در قسمت پایین و سمت راست **LCD** وقتیست که می‌خواهیم برای آن تست بلانک بگذاریم که در این حالت حتما باید حفره اول هر استریپ نمونه بلانک باشد. البته با توجه به آنچه در شماره ۶ توضیح داده شد، می‌توانیم از بلانک صرف نظر کنیم و برای اینکار با فشار کلید **BL** حرف **B** از روی **LCD** محو خواهد شد. (شکل شماره ۷)

PO1	PTP	F2	S6	S	DW	
C3 =		OD =				I

شکل شماره ۷

۸- تا این مرحله تمامی اطلاعات برنامه غیر از تنظیم غلظت استانداردها انجام شد. برای تنظیم غلظتها ابتدا با فشار مکرر کلید **C#**، در سطر دوم **LCD** سمت چپ **C1** را مشاهده نمایید. (شکل شماره ۸)

PO1	PTP	F2	S6	S	DW	
C1 =		OD =				I

شکل شماره ۸

کلید **NUM LOCK** را فشار دهید. با این عمل، عدد برابر **C1** صفر شده و مساوی مقابل آن شروع به چشمک زدن می‌کند و حرف **N** در گوشه سمت راست **LCD** نمایان شده، صفحه کلید دستگاه رقمی می‌شود. به عنوان اولین استاندارد (کمترین غلظت) عدد **10** را وارد کرده و کلید **ENTER** را فشار دهید، با فشار این کلید **C2** را بر روی **LCD** می‌بینید، عدد **50** را وارد نموده و کلید **ENTER** را فشار دهید، بر روی **LCD**، **C3** را خواهید دید. عدد **100** را وارد کرده و باز کلید **ENTER** را فشار دهید، به همین ترتیب اعداد **C4=500**، **C5=1000**، **C6=2000** را وارد نمایید. پس از **C4** و **C5** نیز کلید **ENTER** ولی پس از وارد کردن آخرین استاندارد کلید **SAVE** را فشار دهید. (شکل شماره ۹)

PO1	PTP	F2	S6	S	DW
C6 = 02000			OD =		

شکل شماره ۹

حال می‌توانید با فشار کلید **C#** بین استانداردهای ۱ تا ۶ جابجا شده و غلطی‌های وارد شده را چک نمایید .
 ۹- اطلاعات برنامه کامل شد . برای کالیبر کردن تست کالیبر استریپ استانداردها را در **Carrier** دستگاه گذاشته به شکلی که اولین استاندارد در اولین جایگاه به سمت داخل باشد و کلید **CAL** را فشار دهید . **Carrier** دستگاه به داخل کشیده شده و خوانشها انجام می‌گیرد . زمانیکه **Carrier** بیرون آمده و ثابت شود ، بدین معنی است که کالیبراسیون انجام گرفته است . اگر مایلید پرینت منحنی کالیبراسیون را داشته باشید در این قسمت می‌توانید در حالیکه دستگاه به پرینتر وصل است با فشار کلید **PRN** پرینت منحنی کالیبراسیون و اطلاعات برنامه را بگیرید . پس از آن برای خوانش تستها باید کلید **MODE** را فشار داده به مد **Reading** تست یک بروید . (شکل شماره ۱۰)

RD01	HCG	1-8	DF2
1:C =		OD =	

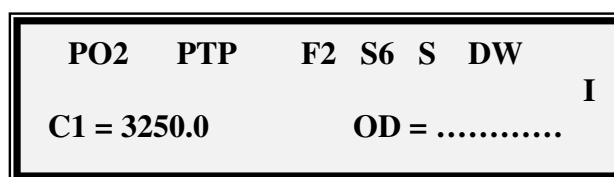
شکل شماره ۱۰

۱۰- در مد **Reading** تنها مورد قابل تنظیم ، اولین و آخرین حفره ایست که می‌خواهیم دستگاه برای ما بخواند . در **LCD** شکل ۱۰ در سطر اول پس از **HCG** عدد **1** نشاندهنده اولین حفره و عدد **8** نشاندهنده آخرین حفره مورد درخواست خوانش است که پیشنهاد نرم افزار در ابتدای کار همین حالت **8 - 1** می‌باشد . شما می‌توانید با فشار کلید **FIRST** عدد اولین حفره را بین **1** تا **8** و با فشار کلید **LAST** عدد آخرین حفره را باز هم بین اعداد **1** تا **8** انتخاب نمایید .

اولین استریپ تستها را در محل خوانش قرار داده و کلید **READ** را فشار دهید . **Carrier** به سمت داخل دستگاه حرکت کرده تستها را تک تک می‌خواند و جوابها بر روی **LCD** نمایان می‌گردد . پس از تمام شدن خوانش حفره‌ها و بیرون آمدن **Carrier** می‌توانید با فشار کلید **SAMPLE** ، **OD** و غلطی‌های حفره‌های **1** تا **8** را دیده ، یادداشت نمایید و یا با فشار کلید **PRN** ، پرینت جوابها را بگیرید . سپس اگر استریپ دیگری هم دارید آنرا در **Carrier** گذاشته و کلید **READ** را فشار دهید .

❖ تمامی تستهای دارای استاندارد به همین شکل برنامه‌ریزی شده و باید هر تست را بر روی یکی از برنامه‌های دستگاه تنظیم نمایید. تنها در مورد بند 1 توضیحات فوق یعنی تنظیم غلظت استانداردها بیان مطلبی لازم می‌باشد و آن در مورد تنظیم تستهایی است که غلظت استانداردها رنج پایینی دارد. به عنوان مثال یک کیت **T4** را در نظر بگیرید با غلظتهای **0.5 - 1 - 2.5 - 5.0 - 12 - 20**. همانطور که مشخص است برای تنظیم این غلظتها احتیاج به ممیز خواهید داشت.

برای تنظیم غلظتهای فوق با فشار کلید **C#** اولین استاندارد **CI** را بر روی **LCD** بیاورید. سپس کلید **POINT** را چند بار فشار دهید تا زمانیکه در مقابل **CI**، عدد شما دارای یک ممیز باشد (تنها یک عدد سمت راست ممیز قرار گیرد) (شکل شماره 11)



شکل شماره 11

حال کلید **NUM LOCK** را فشار دهید. حرف **N** در کنار **LCD** ظاهر شده و صفحه کلید عددی می‌شود، عدد **5** را وارد کنید. بر روی **LCD** غلظت **CI = 0000.5** مشاهده می‌شود، کلید **ENTER** را فشار دهید، عدد **10** را وارد نمایید، (**C2 = 0001.0**)، کلید **ENTER** را فشار دهید، عدد **25** را وارد نمایید (**C3 = 0002.5**)، باز **ENTER** را بزنید و عدد **50** را وارد نمایید (**C4 = 0005.0**) پس از فشار کلید **ENTER** عدد **120** را وارد نمایید (**C5 = 0012.0**) باز هم **ENTER** و عدد **200** را وارد نمایید (**C6 = 0020.0**) حال کلید **SAVE** را فشار دهید. با فشار کلید **C#** غلظتهای وارد شده را کنترل نمایید. در چنین برنامه‌ای، غلظت تستها نیز با دقت یک ممیز اعلام خواهد شد.

❖ در مورد تستهای **Cut off** تنظیم غلظت استاندارد برای برنامه نخواهیم داشت. در چنین تستهایی به جای نمونه استاندارد تنها نمونه‌های مثبت و منفی در کیت موجود است. پس تنظیمات برنامه مشابه موارد قبلی است با دو تفاوت:

- ۱- تنظیم غلظت برای استانداردها را نخواهیم داشت.
- ۲- در قسمتی که تعداد استانداردها را تنظیم می‌کنیم (بند ۴ توضیحات فوق) در تستهای **Cut off** بر اساس تعداد نمونه‌های مثبت و منفی این تنظیم انجام می‌شود. بدین صورت که اگر یک نمونه منفی و یک نمونه مثبت دارید، **S1**، اگر دو نمونه منفی و دو نمونه مثبت **S2**، و اگر سه نمونه منفی و سه نمونه مثبت **S3** باید تنظیم گردد. دقت کنید که در تستهای **Cut off** هنگام کالیبراسیون نمونه‌های منفی حتما در حفرات اول بوده و به دنبال آنها نمونه‌های مثبت قرار گیرد. البته اکثرا یک نمونه منفی و یک نمونه مثبت خواهیم داشت که باید حفره اول نمونه منفی و حفره دوم نمونه مثبت باشد.

ابتدا در مد **Program** نمونه‌های مثبت و منفی را در **Carrier** گذاشته و کلید **CAL** را فشار دهید. دستگاه نمونه‌ها را می‌خواند و کالیبراسیون انجام می‌گیرد. سپس به مد **Reading** رفته و تستها را با فشار کلید **READ**

بخوانید. بر روی LCD، علاوه بر OD مربوط به هر تست، نتیجه به صورت *Positive* و *Negative* اعلام می‌گردد.

ضمیمه

الیزاریدر و نکات کاربردی

مقدمه:

در تکنیک الیزا ریدر از *Strip* های هشت تایی که معمولا در بسته های ۱۲ تایی کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند استفاده می‌شود. هر *Strip* از هشت *Well* کوچک به هم پیوسته تشکیل می‌گردد. جداره هر *Well* بسته به نوع آزمایش توسط کارخانه سازنده از آنتی ژن (یا آنتی بادی) خاصی پوشیده است. پس از اضافه کردن نمونه سرم بیمار به *Well*، آنتی بادی (یا آنتی ژن) مورد آزمایش به آنتی ژن (یا آنتی بادی) جداره می‌چسبد به این ترتیب پس از گذشت زمان مشخص میزان آنتی بادی چسبیده به دیواره متناسب با غلظت آن در سرم بیمار خواهد بود. پس از تخلیه و شستشوی *Well* محلول حاوی پیوند آنتی ژن - آنزیم به *Well* اضافه می‌گردد. با گذشت زمان آنتی ژن - آنزیم به پیوند آنتی بادی - آنتی ژن دیواره متصل می‌شود. با تخلیه و شستشوی *Well* میزان آنزیم باقیمانده در جداره با آنتی بادی مورد آزمایش متناسب خواهد بود. در این مرحله با اضافه کردن محلول سوبسترا یک واکنش رنگ زا داخل *Well* شروع می‌شود که سرعت آن با تعداد آنزیم‌های دیواره متناسب خواهد بود. به این ترتیب با اندازه گیری سرعت واکنش در روش *Kinetic* و یا شدت رنگ (پس از زمان مشخص و توقف واکنش) در روش *End Point* و در مقایسه با نمونه استاندارد می‌توان غلظت آنتی بادی سرم را تعیین نمود.

الیزا ریدر:

یک دستگاه الیزا ریدر جزء لاینفک تکنیک الیزا می‌باشد. این دستگاه میزان جذب *Well* های یک *Strip* را خوانده و در مقایسه با نمونه‌های استاندارد غلظت را اعلام می‌کند.

دستگاه‌های الیزا ریدر در سه نوع متداول زیر ساخته می‌شود:

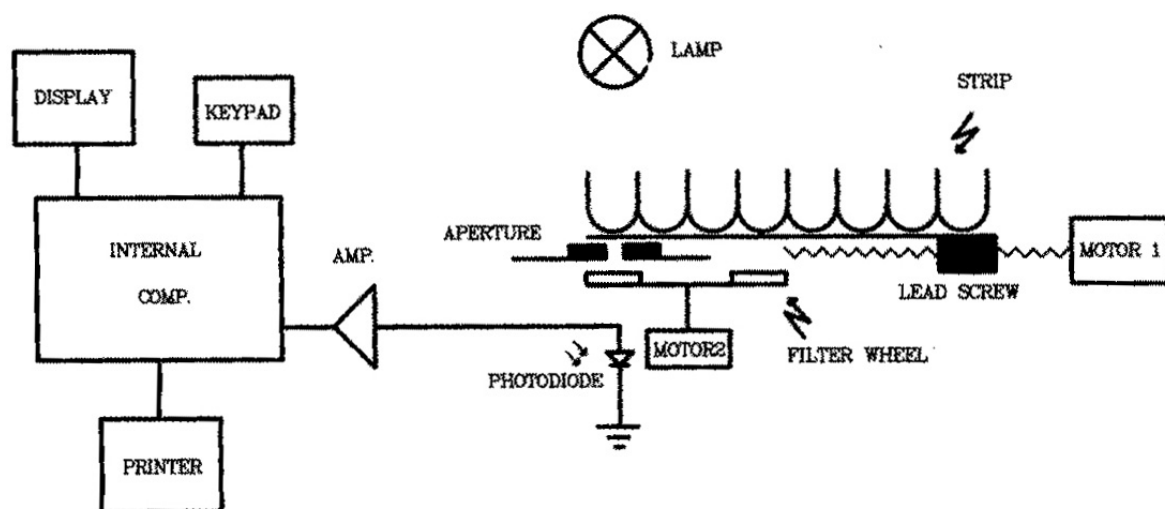
Single Reader: قابلیت قرائت تنها یک *Well* را دارا است (قیمت پایین - سرعت پایین)

Strip Reader: قابلیت قرائت یک *Strip* را دارا است (قیمت متوسط - سرعت متوسط)

Plate Reader: قابلیت قرائت یک *Plate* (معمولا ۹۶ تایی) را دارا است (قیمت بالا - سرعت بالا)

در دستگاه‌های *Strip Reader* معمولا جذب *Well* های یک *Strip* به صورت پی در پی قرائت می‌گردند و در هر لحظه تنها یک *Well* خوانده می‌شود.

Plate Reader ها نیز معمولا دارای قابلیت قرائت یک *Well* در هر لحظه می‌باشند و *Well* های مختلف را متوالیا و پس از جابجایی *Plate* می‌خوانند. اما بعضی از انواع کامل‌تر قابلیت قرائت همزمان ۸ یا ۱۲ *Well* را دارا هستند.



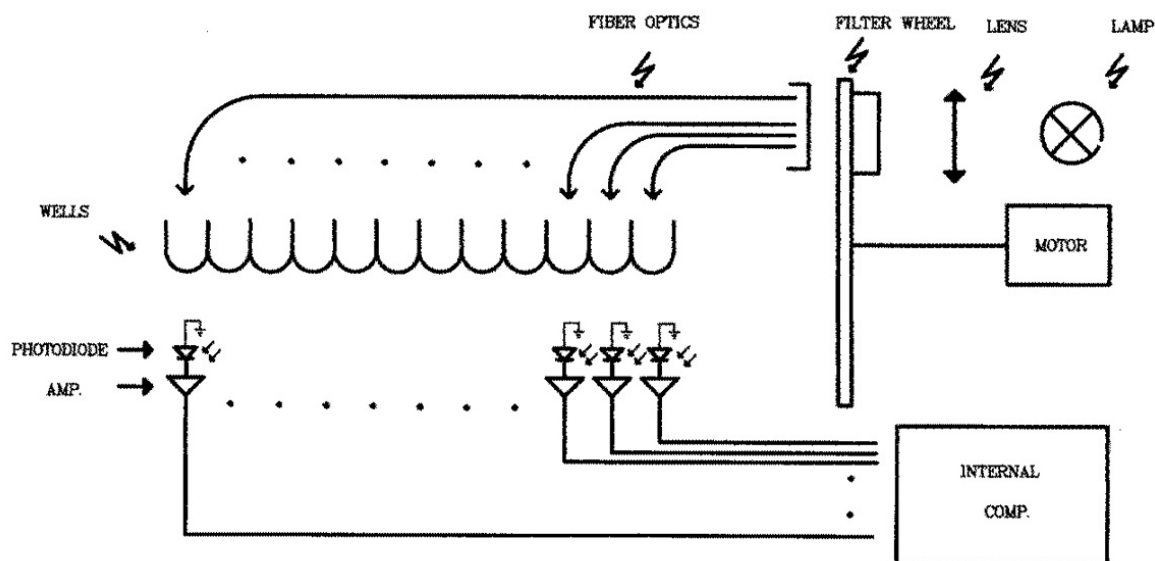
در شکل (1) بلوک دیاگرام الیزاریدر از نوع *Strip Reader* را مشاهده می‌نماییم.

شکل (1)

همانگونه که مشاهده می‌شود سیستم *Carrier* وظیفه جابجایی *Strip* و تنظیم موقعیت *Well*ها را به عهده دارد. پس از قرارگیری *Well* مورد نظر در مسیر خوانش و تنظیم فیلتر تداخلی میزان جذب *Well* حاوی نمونه توسط کامپیوتر داخلی دستگاه اندازه‌گیری و مبنای محاسبه غلظت قرار می‌گیرد.

مرغوبیت فیلترهای تداخلی بکار رفته، دقت و تکرار پذیری سیستم مکانیکی تنظیم موقعیت *(Carrier)Strip*، دقت و نویز پایین فتودیود و اجزاء الکترونیکی و نوع لامپ بکار رفته همگی در عملکرد مطلوب یک الیزاریدر مؤثر هستند. در یک *Single Reader*، *Carrier* و ملحقات مکانیکی تنظیم موقعیت *Strip* حذف شده و برای تنظیم فیلتر نیز به جای استفاده از موتور و روشهای اتوماتیک جاگذاری به صورت دستی انجام می‌گردد.

در ساده‌ترین نوع *Plate Reader* که معمولی‌ترین آنها نیز می‌باشد همانند بلوک دیاگرام شکل (1) تنها یک مسیر خوانش وجود دارد و سیستم مکانیکی امکان تنظیم در دو جهت را فراهم نموده است. در شکل (2) قسمت *Optic* یک *Plate Reader* کامل‌تر را مشاهده می‌نمایید.



شکل (۲)

در این نوع **Plate Reader** ها از تکنولوژی **Fiber optic** برای هدایت نور بهره می‌جویند و به این ترتیب بجای استفاده از لامپ برای **Well 12** از یک لامپ و **12** فیبر نوری استفاده شده است. گذشته از مزایای فنی پایین بودن تعداد لامپها، دیگر مزیت آن یکنواختی تغییرات احتمالی نور با این طرح می‌باشد. به عبارت دیگر نور تابیده به **Well** های مختلف در این طرح حتی در صورت تغییرات احتمالی نیز با یک نسبت کم یا زیاد می‌شوند که به نوبه خود در دقت و ثبات عملکرد دستگاه بسیار مؤثر است. مزیت اصلی این نوع **Plate Reader** در مقایسه با نوع اول سرعت بالاتر آن است. هر چند این نوع دستگاه‌ها از اپتیک و الکترونیک کامل‌تر و پیچیده‌تری برخوردارند اما از لحاظ مکانیکی ساده‌تر و کارآمدترند.

Blanking :

در الیزاریدر **Blanking** به دو صورت میسر است، **Blanking** با هوا و یا محلول. در صورتی که هوا به عنوان **Blank** انتخاب شود، مجموع جذب **Well**، حلال و نمونه به عنوان **OD** نمونه اعلام می‌گردد. حال آنکه در صورتی که **Blank** به صورت محلول باشد مقدار جذب خوانده شده به جذب نمونه نزدیکتر است. (چرا نزدیکتر و نه برابر؟)

در صورت **Blanking** با محلول، دستگاه اولین **Well** از **Strip** را به عنوان **Blank** فرض می‌کند و آنرا خوانده و به حافظه می‌سپارد و **OD** بقیه **Well** ها را از آن کم می‌کند و این تفاضل را به عنوان **OD** نمونه اعلام می‌کند. نکته حائز اهمیت آن است که حتی اگر تمام **Well** ها را با **Blank** پر کنیم تفاوتی در حدود $0.050 \pm$ در **OD** مربوط به **Well** های گوناگون به چشم خواهد خورد. این تفاوت ناشی از تفاوت موجود در ساختمان کف **Well** ها می‌باشد. به این ترتیب **Blanking** محلول نیز نمی‌تواند **OD** نمونه‌ها را دقیقاً تعیین نماید.

روش Bichromatic Reading :

Bichromatic Reading نه تنها مشکل **Blanking**، بلکه بسیاری از مسائل دیگر در الیزاریدر را نیز حل می‌کند. اغلب کیت‌های معمول دارای رنگ زرد هستند و در طول موج‌های **405** و **450** خوانده می‌شوند. رنگ زرد دارای طیف بلند گذر می‌باشد. این رنگ طول موج‌های بالای **500** نانومتر را به خوبی عبور داده و جذب آن در طول موجهای حدود **600** نانومتر صفر است.

در روش **Bichromatic Reading** نمونه در دو طول موج مختلف خوانده می‌شود و سپس تفاضل **OD** های حاصله مبنای تعیین غلظت قرار می‌گیرد به عنوان مثال:

$$OD \text{ total} = OD (450) - OD (630)$$

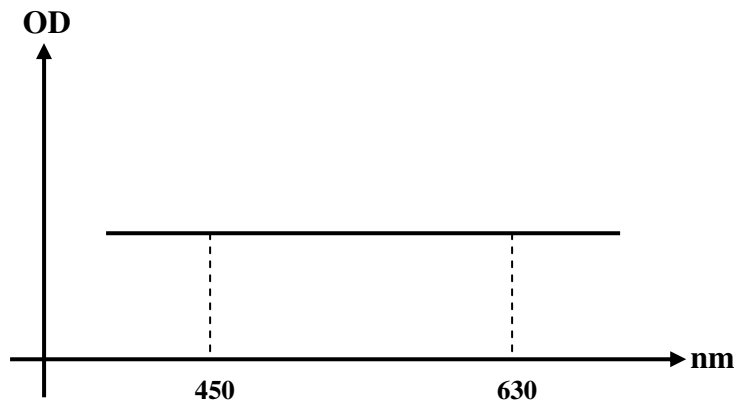
اما ببینیم استفاده از این تفاضل چگونه می‌تواند نقش **Blanking** را داشته باشد. به رابطه زیر توجه کنید:

$$OD \text{ total} = OD \text{ Well} + OD \text{ Solution} + OD \text{ Sample}$$

آنچه توسط دستگاه خوانده می‌شود **OD total** است و آنچه مورد استفاده در تعیین غلظت می‌باشد **OD Sample** است در صورتی که جذب **Well** حاوی محلول را بخوانیم:

$$OD\ Blank = OD\ Well + OD\ Solution$$

به این ترتیب برای بدست آوردن **OD Sampel** می‌بایست **OD Blank** را بدست آورده از **OD total** کم کنیم. اما نکته جالب توجه آن است که **Well** و حلال هر دو بی‌رنگ هستند و این بدان مفهوم است که طیف جذب این دو (یعنی **Blank**) در تمامی طول موج‌ها مقدار ثابتی است.



طیف جذب **Blank**

همانگونه که شکل طیف **Blank** (شکل ۳) نیز مشخص است.

$$OD\ Blank\ (450) = OD\ Blank\ (405) = OD\ Blank\ (630)$$

اما با توجه به صفر بودن جذب نمونه در طول موج **630** خواهیم داشت:

$$OD\ Blank\ (450) = OD\ total\ (630)$$

به این ترتیب:

$$OD\ Sample\ (450) = OD\ total\ (450) - OD\ total\ (630)$$

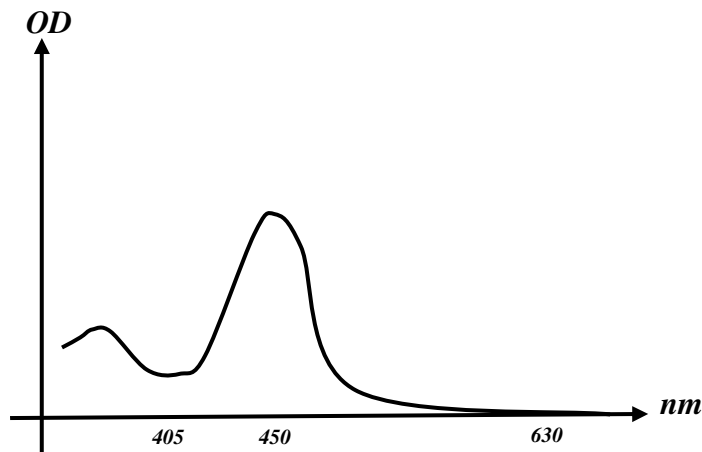
گذشته از آنکه با این روش خطای **Blanking** حذف می‌گردد، تکرارپذیری و ثبات ودقت تکنیک الیزاریدر به مراتب افزایش می‌یابد.

نکات کاربردی:

نکته یک: $\frac{C}{D}$ حداقل باشد.

در الیزاریدر نیز برای تعیین غلظت، جذب نمونه اندازه‌گیری می‌شود اما برخلاف تکنیک‌های معمول فتومتر جذب در الیزاریدر به صورت عمودی خوانده می‌شود. قطر کم **Well**‌ها از یک سو و تقعر سطح نمونه داخل **Well**

که باعث پدیده شکست نور می شود از سوی دیگر ، ایجاب می نماید که برای بدست آوردن دقت ، صحت و تکرار پذیری نتایج نسبت تغییرات غلظت به OD خوانده شده حداقل باشد.



طیف جذب نمونه زرد رنگ

طیف جذب نمونه زرد رنگ شکل (۴) را ملاحظه نمائید . همانگونه که مشخص است جذب نمونه در طول موج 450 بیشتر از جذب آن در طول موج 405 است . هرچند استفاده از طول موج 450 برای نمونه های پر رنگ می تواند $OD > 2.00$ را بدست دهد که چندان قابل استفاده و معتبر نیست اما برای جذب های متوسط و پایین با استفاده از طول موج 450 نسبت $\frac{C}{D}$ پایین تر بوده ، دقت و تکرار پذیری بهتری حاصل میشود . به این ترتیب خطای مطلق دستگاه در OD های بالاتر اهمیت کمتری خواهد داشت.

نکته دو : از OD بالای 2 برای تعیین غلظت هرگز استفاده نکنید .

به جدول زیر دقت کنید :

T = 100.0	OD = 0
T = 10.0	OD = 1
T = 1.0	OD = 2
T = 0.1	OD = 3

همانگونه که مشخص است تمامی رنج تغییرات OD بین 2 و 3 ناشی از تغییرات $Trans$ بین 1.0% تا 0.1% است . از آنجا که صحت فتومتری بهترین دستگاههای فتومتر $T + 1\%$ و دقت آنها در حد $T + 0.1\%$ است ، استفاده از OD

بزرگتر از 2 برای تعیین غلظت معمولاً از اعتبار و صحت لازم برخوردار نیست. در عمل دقیق‌ترین رنج OD در تعیین غلظت $OD < 1.000$ می‌باشد.

اصول انتخاب طول موج 405 یا 450 برای غلظت های مختلف

با توجه به آنکه OD نمونه‌های زردرنگ الیزا در طول موج 450 حدوداً سه برابر OD در طول موج 405 می‌باشد، استفاده از طول موج 450 برای نمونه‌های با جذب پایین و استفاده از طول موج 405 برای نمونه‌های با جذب بالاتر توصیه می‌شود.

می‌توانید الیزا را برای تست مورد نظر در دو طول موج 405 و 450 و در دو برنامه جداگانه کالیبر نموده و هنگام آزمایش نمونه را ابتدا در طول موج 405 بخوانید و در مورد نمونه‌های با OD بزرگتر از 0.800 غلظت را براساس همین برنامه 405 اعلام نمایید. اما در مورد نمونه‌های با OD کمتر از 0.800 بهتر است مجدداً نمونه را در برنامه با طول موج 450 خوانده و بر اساس این برنامه غلظت را اعلام کنید.

معمولاً در دفترچه کیت نیز یک غلظت میانی به عنوان مرز کاربرد طول موج اعلام می‌شود که می‌توان مبنا را بر طول موج 405 قرار داده و سپس برای رسیدن به دقت بیشتر در مورد نمونه‌های با جذب پایین بر اساس قرائت در طول موج 450 اعلام نتیجه نمایید.

در زیر مطالبی برگرفته از کتاب جامع الیزا مربوط به شرکت تحقیق گستر، آورده شده که نشان دهنده نحوه انتخاب طول موج مناسب جهت خوانش در کیت‌های الیزا می‌باشد. در اینجا به عنوان نمونه کیت‌های T4، TSH و BHCG عنوان گردیده است. لازم به ذکر است جداول و مطالب عنوان شده دقیقاً از کتاب جامع الیزا بدون هیچ تغییری کپی برداری شده است.

کیت T4:

T4	جذب نوری 405 nm	T4	جذب نوری 450 nm	عنوان
	1.946.		> 3.00	استاندارد 0 ng/ml
	1.245		> 3.000	استاندارد 10 ng/ml
	0.430		1.247	استاندارد 35 ng/ml
	0.187.		0.544	استاندارد 70 ng/ml
	0.085.		0.246	استاندارد 140 ng/ml
	0.035		0.102	استاندارد 280 ng/ml
	0.283	53 ng/ml	0.820	نمونه ۱
10 ng/ml	1.243		>3.000	نمونه ۲

مماسبه نتایج :

جهت بدست آوردن نتیجه دقیق در این روش از اسپکتروفتومتر (الایزا ریدر) در دو طول موج 450 و 405 نانومتر استفاده می شود . برای نمونه هایی که غلظت $T4$ آنها بین $280-35 \text{ ng/ml}$ است از طول موج 450 نانومتر و برای نمونه هایی که غلظت $T4$ آنها کمتر از 35 ng/ml است از طول موج 405 نانومتر استفاده کنید .

کیت TSH :

hTSH	جذب نوری 405 nm	hTSH	جذب نوری 450 nm	عنوان
	0.006.		0.017	استاندارد $0 \mu \text{ IU/ml}$
	0.045		0.129	استاندارد $0.15 \mu \text{ IU/ml}$
	0.132		0.371	استاندارد $0.5 \mu \text{ IU/ml}$
	0.375.		1.049	استاندارد $1.5 \mu \text{ IU/ml}$
	0.940.		2.632	استاندارد $5 \mu \text{ IU/ml}$
	1.697		>3.000	استاندارد $15 \mu \text{ IU/ml}$
	2.241 .		>3.000	استاندارد $50 \mu \text{ IU/ml}$
	0.443	$1.8 \mu \text{ IU/ml}$	1.242	نمونه ۱
$19.5 \mu \text{ IU/ml}$	1.875		>3.000	نمونه ۲

مماسبه نتایج :

جهت بدست آوردن بهترین حساسیت در این روش ، قرائت اسپکتروفتومتر (الایزا ریدر) در دو طول موج 450 و 405 نانومتر انجام می شود . برای نمونه هایی که غلظت TSH آنها بین $0-5 \mu \text{ IU/ml}$ است از طول موج 450 نانومتر و برای غلظتهای بالاتر از $5 \mu \text{ IU/ml}$ از طول موج 405 نانومتر استفاده کنید .

کیت BHCG :

HCG	جذب نوری 405 nm	HCG	جذب نوری 450 nm	عنوان
	0.001.		0.004	استاندارد 0 mIU/ml
	0.022		0.062	استاندارد 10 mIU/ml
	0.113		0.317	استاندارد 50 mIU/ml
	0.435.		1.220	استاندارد 250 mIU/ml
	0.969.		2.827	استاندارد 750 mIU/ml
	1.772		>3.000	استاندارد 2000 mIU/ml
	0.161	75 mIU/ml	0.451	نمونه ۱
	1.440			

1400 mIU/ml			>3.000	نمونه ۲
-------------	--	--	--------	---------

مماسبه نتایج :

به منظور حصول بهترین نتایج و بالا بردن حساسیت آزمون ، از دستگاه اسپکتروفتومتر(الایزا ریدر) در دو طول موج 450 و 405 نانومتر استفاده می شود . برای نمونه‌هایی که غلظت HCG آنها بین 0-250 mIU/ml است از طول موج 450 نانومتر و برای نمونه‌هایی که غلظت HCG آنها بیش از 250 mIU/ml است از طول موج 405 نانومتر استفاده کنید .