دکتر محمدرسول زارعی
(DCLS)

بهمن ۱۳۹۷

تضمین کیفیت در آزمایشات الایزا

تعريف كيفيت

- كيفيت ،اختلاف بين مقدار يا هدف موردنظرباچيزي است كه بدست مي آيد .

- براي رسيدن به يك محصو ل با كيفيت نيازمند كنترل فرايندها ، و استانداردسازي آنها هستيم

QUALITY ASSURANCE
تضمین کیفیت

- به مجموعه فعالیت هاواقدامات سیستماتیکی اطلاق می شودکه منجربه تولید یک جواب آزمایش صحیح ودقیق وقابل قبول درآزمایشگاه شود.

Path of Workflow

THE PATIENT → Test selection → Sample Collection

Pre examination Phase

Sample Transport

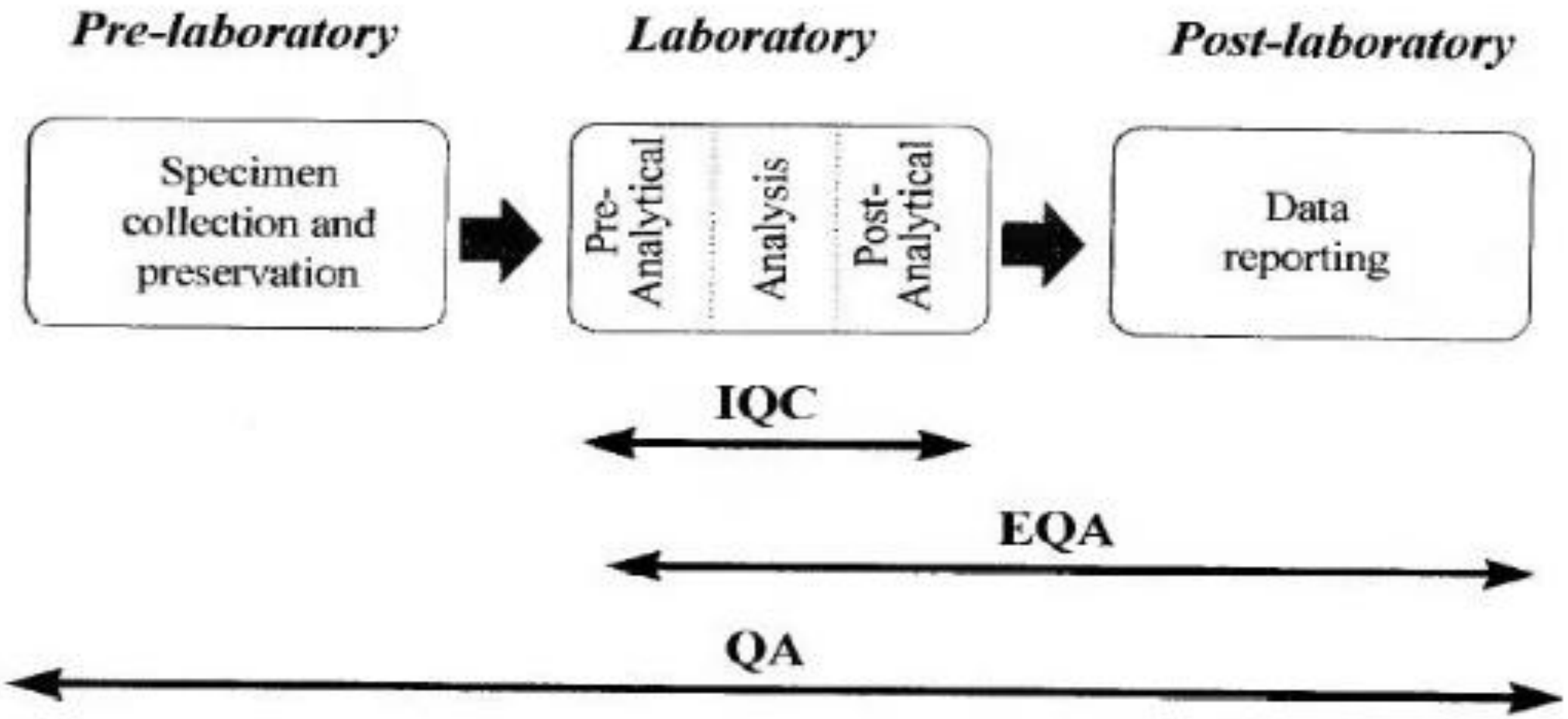
Laboratory Analysis Examination Phase

Report Creation → Report Transport

Result Interpretation

Postexamination Phase

Quality Assurance
تضمین کیفیت



The Quality Assurance Cycle
Before specimen collection

GH / PRL / Cortisol / Renin

Transferin
Ferritin
Thyroid Hormones

Insulin / Gastrin /Calcitonin

Cortisol / T4 /Drug

Renin, Cortisol, thyroxine and drugs

The Quality Assurance Cycle

Before specimen collection

Biologic Rhythms

1. Circadian (diurnal) .....TSH, Growth Horn

- *If possible, samples should be taken between 7 and 9 a.m.*
- *Sampling should be carried out 12 hours after the last meal.*
- *Samples should be taken before interfering diagnostic and therapeutic procedures are performed.*
- *In drug monitoring, consider the peak after drug administration and the steady state phase before the next dose.*
- *Always document the exact time of sampling in the charts and requests.*

Correct Patient Preparation

To reduce variability, biochemical tests may benefit from special instruction to, or preparation of, the patient before the samples are taken. This preparation may include:

- Dietary restriction. Examples are fasting (lipid profile, C-peptide), fluid restriction (urine cortisol[10]), and avoiding certain foods (5-HIAA).
- Drug restriction. A common error is to overlook withholding steroids for at least 8 hours prior to a Synacthen test.
- Attendance at a particular time of day (0800 for serum cortisol, 0800-1000 for aldosterone-renin ratio).
- Activity/posture/stress (ambulant for 30 minutes for plasma aldosterone, non-stimulated and recumbent for 30 minutes for plasma catecholamines).
- Other investigations (rectal examination for PSA).

The Quality Assurance Cycle Specimen collection

Sample type: Blood

Many analytes are stable a period of time when store in whole blood

Inhibin A level decline significantly even when store for short period in whole blood due to erythrocyte catalase interfrerence in certain enzyme based assay.

Homocyctein is unstable in whole blood and must separated and frozen within 1 hr

Low molecular mass polypeptide hormones such as ACTH,Glucagon,Gasterin rapidly destroyed by enzyme present in blood

The Quality Assurance Cycle Specimen collection

- Sample type: Serum
  - matrix of choice for all immunoassay. except PTH ,degrades significantly in serum compared to EDTA plasma

- Sample type: Gel tubes

Decrease

Anticonvulsants(phenobarbital , phenytoin, carbamazepin)

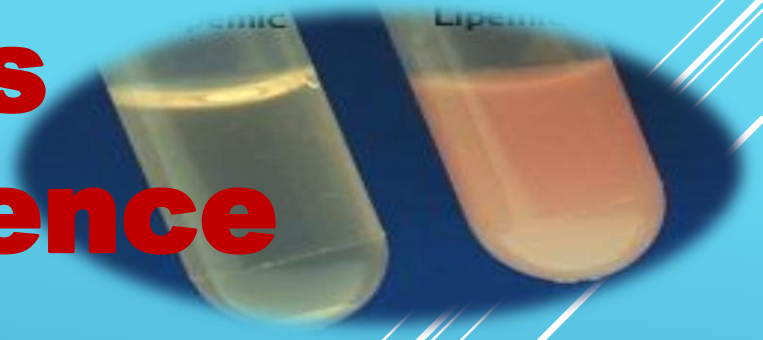
PTH

Progesterone

Increase

CRP in certain method on slide

Invalid specimens
Endogenous Interference



LIPEMIA

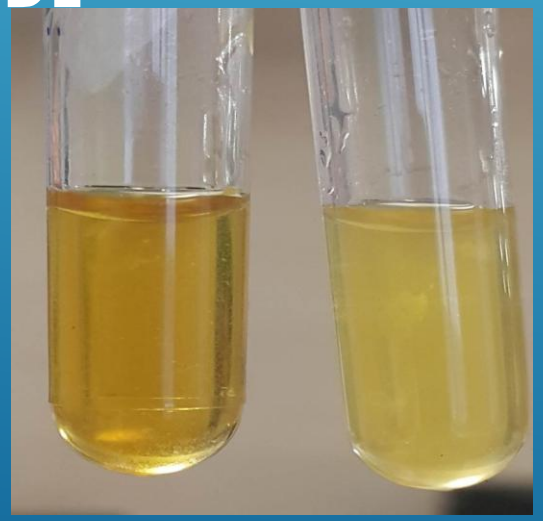
FAT SOLUBLE COMPOUNDS LIKE STEROIDS
TURBIDIMETIC ASSAYS, FFA IN FT4

HEMOLYSIS

RELEASE OF PROTEOLYTIC ENZYME AND DESTROYED PEPTIDE
INSULIN,GLUCAGON,PTH,ACTH,GASTRIN
RELEASE OF ANALYTE FROM RBC FOLATE

ICTER

MINIMAL INTERFERENCE BUT SOME REFERENCE INDICATE INTERFERENCE.



Endogenous Interference

CLSI-ILA30A

6.2.2 RF

RFs are antibodies that bind to the constant or Fc portion of other immunoglobulins. RFs are often found in persons with rheumatoid arthritis; however, they are not specific for that disease and are also found in many other rheumatic and nonrheumatic (inflammatory, infectious, and neoplastic) disorders.[29] Examples of disease where RFs may be present include: Sjogren's syndrome, mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosis, systemic sclerosis, mixed cryoglobulinemia type II, systemic vasculitis (eg, panarteritis nodosa and Wegener's granulomatosis), juvenile arthritis,[31] and chronic sarcoidosis. They also are found in normal persons without known disease.

Examples of Interference	Comments	References
RF		
1. Cardiac troponin I (cTnI)	1. False-positive results (0.9 µg/L true concentration incorrectly reads >50 µg/L) in a MEIA in five serum samples with elevated RF concentrations (202 to 325 U/L). Samples, however, read correctly in a different cTnI assay, which did not have RF interference. The RF interference could be eliminated by incubating the samples with anti-RF antibody.	65
2. In cancer-antigen CA 19-9 assay	2. Positive interference in a chemiluminescent immunoassay (CLIA).	66

Endogenous Interference

2. Origins of Interfering antibodies

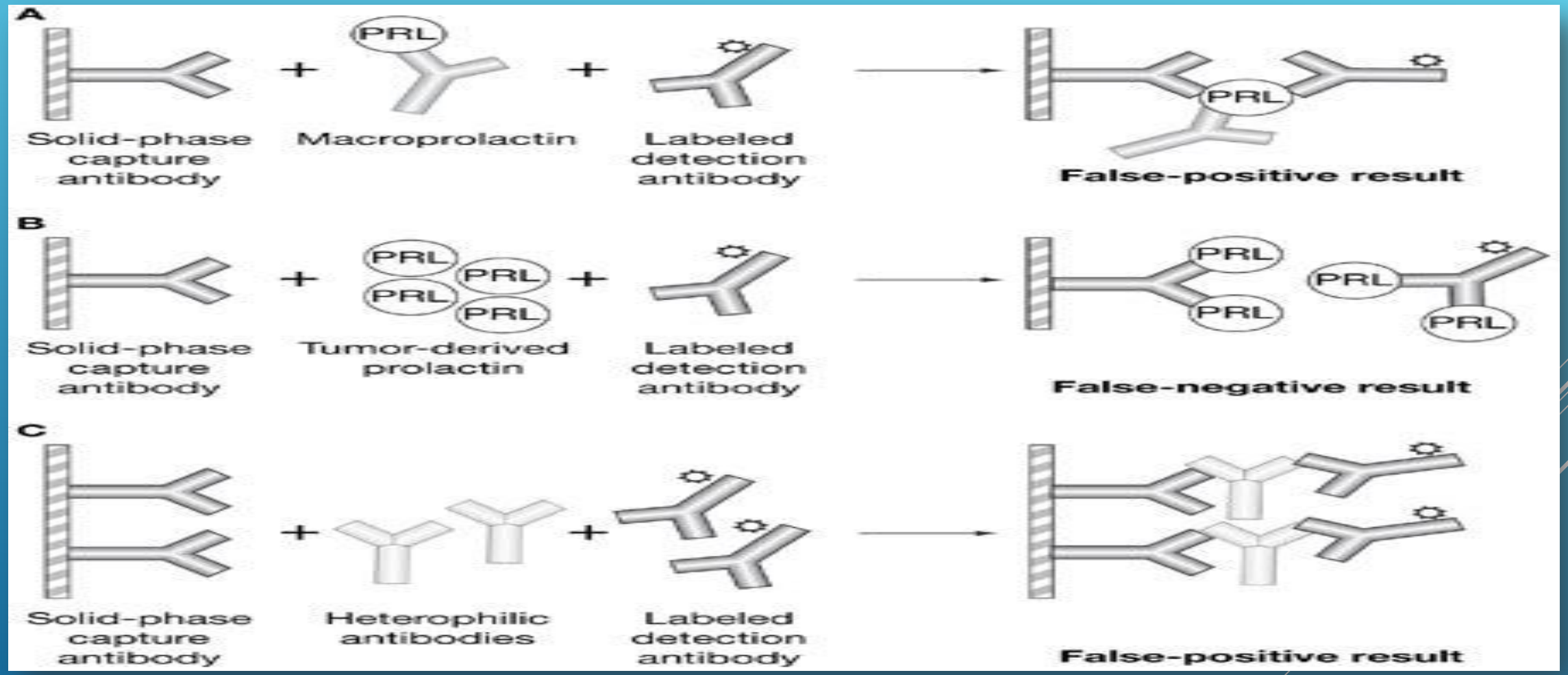
CLSI-ILA30A

6.2.3 Autoimmune Antibodies

Circulating thyroid hormone autoantibodies have been described in thyroid and nonthyroid disorders and are important interferents in thyroid hormone immunoassays. These are endogenous antibodies reacting with thyroxine and triiodothyronine. The prevalence of these antibodies has been reported as between 0% to 25%, depending on the detection method used.[17] Thyroglobulin autoantibodies (TgAb) are often present in patients with autoimmune thyroid disease. Approximately 10% of healthy individuals have TgAb at measurable levels. TgAb can be detected in 30% of patients with Graves' disease and in 85% of patients with Hashimoto's thyroiditis.[32]

Autoantibody	Autoantibodies	
1. Cancer-antigen (CA 125)	1. Positive interference	67-71
2. T3,T4 Thyroglobulin	2. These are the most commonly described examples of such interference in the literature. Interference is positive or negative depending on assay architecture and the partitioning among antigen Ag, tracer assay antibody, and autoantibody.	72

Prolactin: multiple interferences



Anti-prolactin autoantibodies can be present in serum in the form of macroprolactin (macroPRL).

Protocol 2. Procedure for screening for macroprolactin using PEG precipitation.[45]

Reagents

(1) Prepare 200 mL of phosphate-buffered saline (PBS; 137 mmol/L sodium chloride, 10 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4);
(2) Prepare 100 mL of 25% w/v PEG by dissolving 25 g of PEG 6000 in 80 mL of PBS. When dissolved, make the volume up to 100 mL with PBS and store at 4°C (N.B. solid PEG should be less than 5 years old and PEG solutions should be used within 2 weeks of preparation);
(3) Equilibrate the PEG solution at room temperature prior to use.

Procedure

(1) Add 250 μL of PEG solution (25% w/v) to 250 μL of each specimen in appropriately labelled tubes, vortex thoroughly and incubate at room temperature for 10 min;
(2) Centrifuge the tubes (14,000*g*; 5 min);
(3) Decant each supernatant into a second appropriately labelled tube and measure the prolactin concentrations within 24 h. (For some immunoassays [e.g. the Beckman Access and Siemens Immulite methods], dilution of the supernatant 1 in 5 with PBS is also recommended.) If the prolactin result is over range or if there is insufficient sample to analyse without dilution, the specimen can be diluted with PBS;
(4) Multiply the prolactin concentrations by 2 to correct for the dilution with PEG. Additional multiplication will be required for diluted specimens.

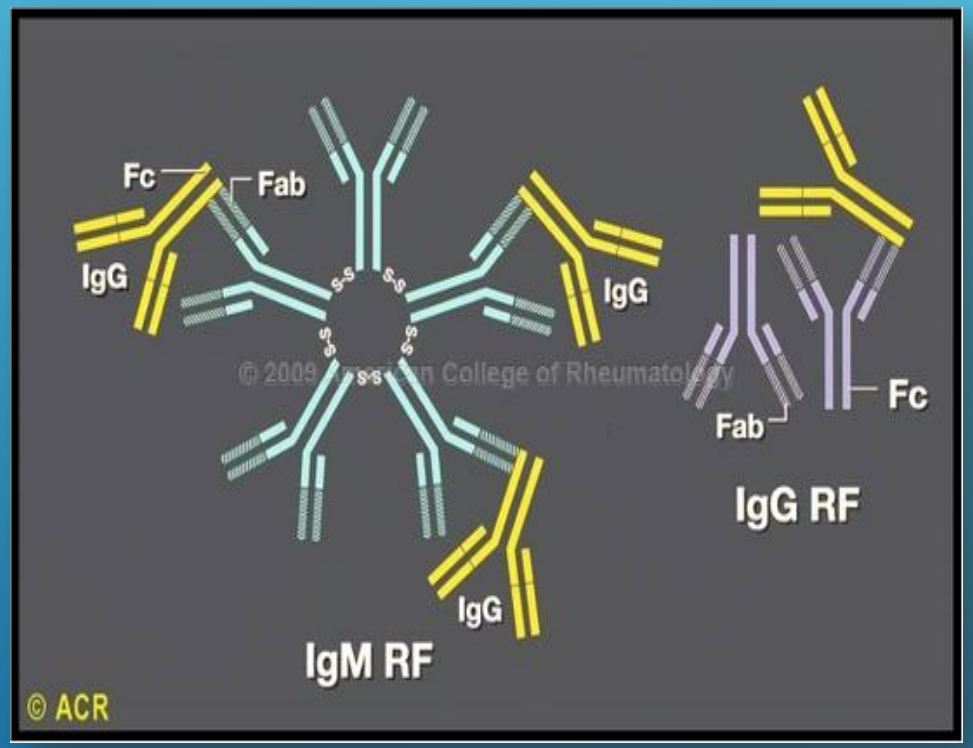
HETEROPHILE ANTIBODIES

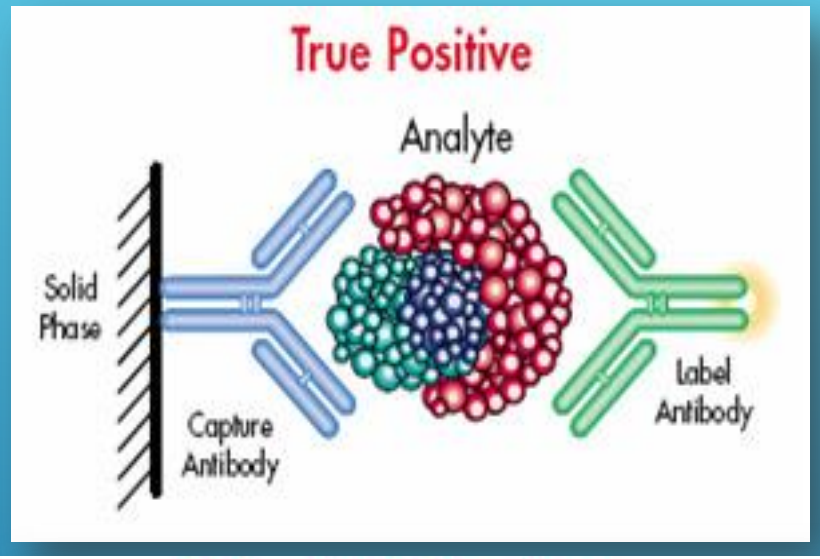
6.2.4 Infectious Agents

Certain infectious agents may cause a lower affinity heterophile antibody response. The term heterophile antibody was originally used to describe IgM antibodies associated with EBV mononucleosis that agglutinated sheep red cells. However, antibodies such as Paul-Bunnell antibody may have a broader reactivity and cross-react with red cell proteins of different species, including rat, sheep, horse, rabbit, guinea pig, and cow.[6] The presence of heterophile antibodies with symptoms of mononucleosis is generally sufficient for diagnosis of Epstein-Barr infection.[46] Heterophile antibodies due to mononucleosis usually persist for two to three months when measured using sheep erythrocytes, but may be detectable for one year or more in 75% of patients when using horse erythrocytes.

Other infectious diseases where heterophile antibodies have been reported are leprosy and syphilis.[24] Heterophile antibodies have been demonstrated in sera of patients with both early and late syphilis. Additionally, cryoglobulinemias, large immune complexes containing RF, are common in persons infected with hepatitis C and also have been reported in viral diseases, such as mononucleosis.[11]

Heterophile antibody and RF





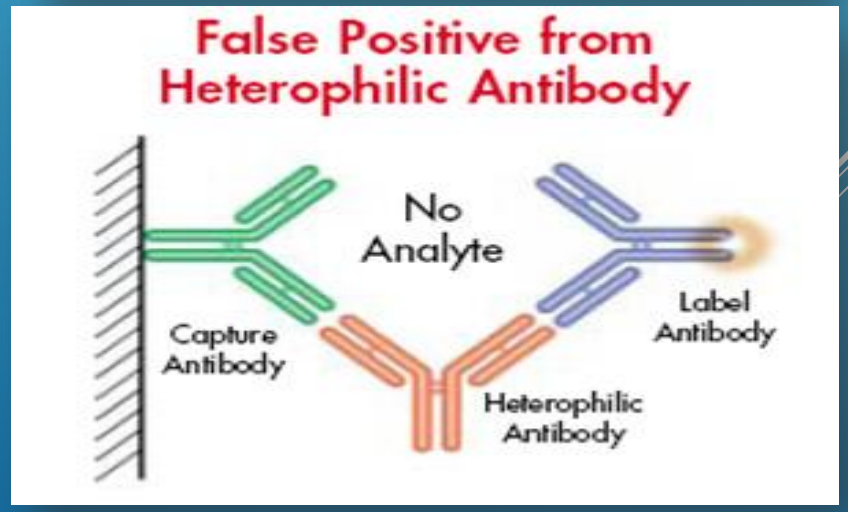


Table 2. Heterophile Antibody

Example of Assays Affected	Examples of Effect	References
1. Cardiac troponin-I (cTnI)	1. False-positive result in a microparticle-enhanced immunoassay (MEIA), but not in three other cTnI immunoassays or a cTnT assay. When sample was incubated with heteroblocker, the observed MEIA cTnI result decreased from 81 μg/L to 1.5 μg/L.	49
2. HIV	2. False-positive HIV immunoassay results: preabsorption with goat, bovine, and sheep IgG removed interference both from immunoassay and from Western blot testing.	47,50
3. hCG	3. See comments on hCG in Table 4.	47,51-53
4. Luteinizing hormone (LH)	4. Falsely increased LH in two males confirmed by pretreating the serum samples with animal sera, which reduced the observed LH results to normal levels.	54
5. Prostatic-specific antigen (PSA)	5. False-positive result not supported by clinical findings.	55
6. Tryptase	6. Confirmed by repeating the assay after pretreatment of the sample with heteroblocker.	56
7. Digoxin assay	7. False high serum digoxin levels (> 3 μg/L) occurred in a patient who had stopped taking digoxin for several weeks. Protein-A pretreatment or ultrafiltration of the sample removed the interfering endogenous antibodies and the interference.	57

HIGH DOSE HOOK EFFECT

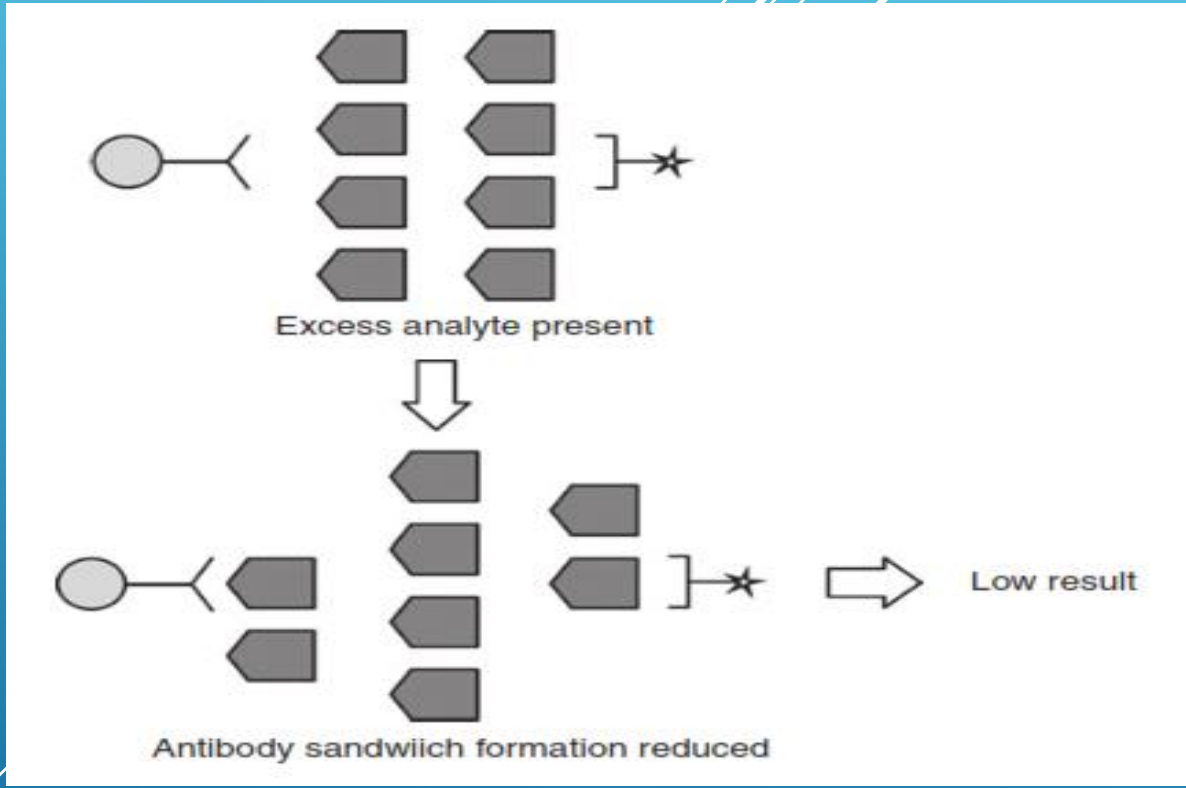
HIGH DOSE HOOK EFFECT

- کسب نتیجه منفی کاذب
- درغلظت بالای آنالیت را
- پدیده هوک یا قلاب می گویند

HIGH DOSE HOOK EFFECT

- Two-site immunometric assays, sample
- and capture antibody are added simultaneously

- Example AFP, CA125, CEA, hCG, PSA
- prolactin and thyroglobulin



ENZYME – LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (*ELISA*)

- الایزا نامی عمومی برای روشهای آنزیم ایمنواسی است.

- آنتی ژن یا آنتی بادی بر روی یک فاز جامد coat شده است.

EIA

- ***Homogeneous EIA*** **refers to any antigen - antibody reaction that does not require a separation step .**

- ***Heterogeneous EIA*** **needs physical separation (washing) of free from bound ligands**

مراحل آزمایش الایزا:

۱-کوتینگ:جذب آنتی ژن یا آنتی بادی به یک فاز جامد

۲-اضافه نمودن استانداردها، نمونه های بیماران ویا معرف های دیگر نظیر کنترل

۳-انکوباسیون وانجام واکنش ها

۴-شستشو:جداسازی واکنش دهنده های آزادازآنهائی که به فاز جامد متصل شده اند.

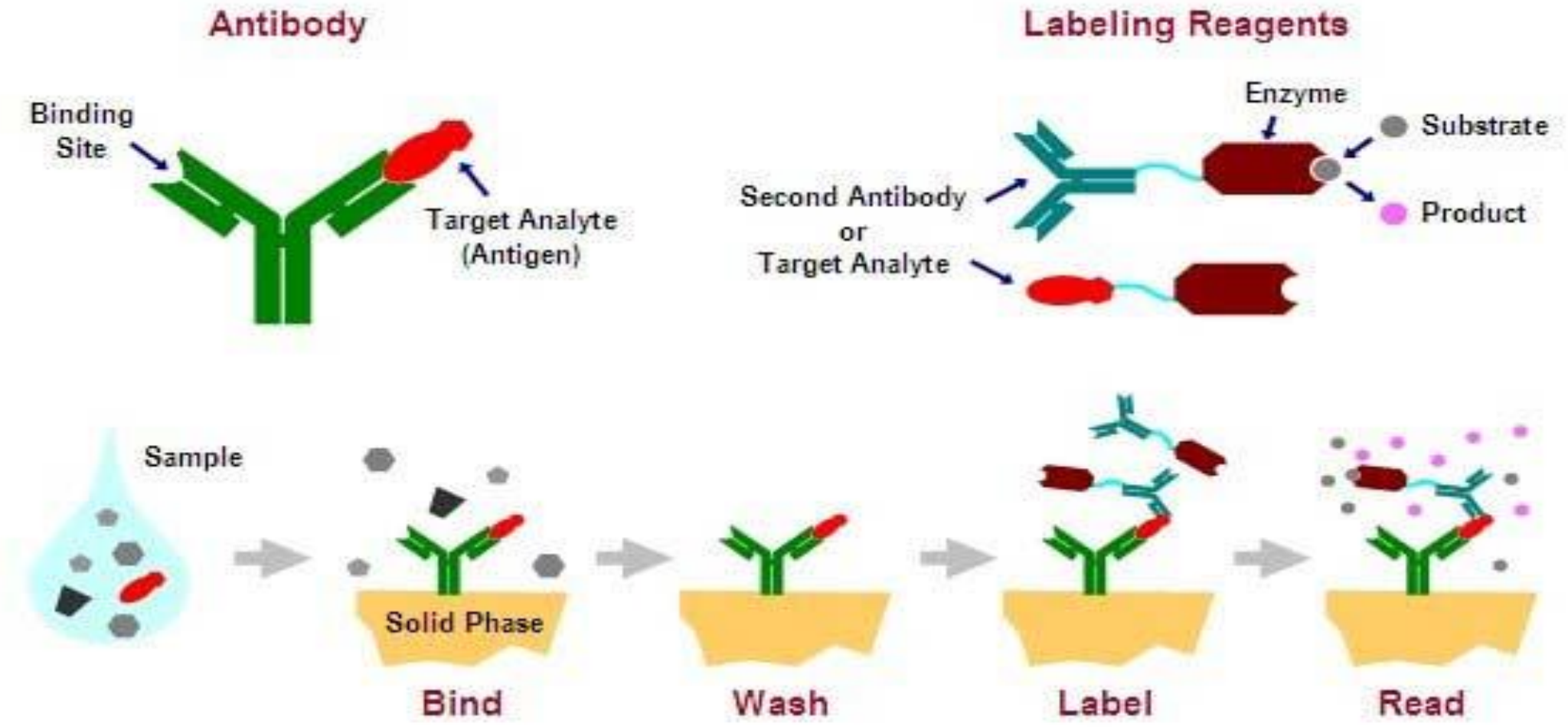
۵-اضافه کردن محلول کنژوگه آنزیمی

۶-جداسازی کونژوگه های اتصال یافته از نوع آزادتوسط شستشو

۷-اضافه نمودن یک سیستم نمایانگر که در حقیقت سوبسترای کروموژن آنزیم است ومنجر به تشکیل رنگ می شود.

۸-توقف واکنش آنزیمی وقرائت نتایج

ELISA


Antibody
Binding Site
Target Analyte (Antigen)
Labeling Reagents
Enzyme
Substrate
Second Antibody or Target Analyte
Product
Sample
Solid Phase
Bind
Wash
Label
Read

انواع الايزا

1.Non-Competitive or Direct (Sandwich) :

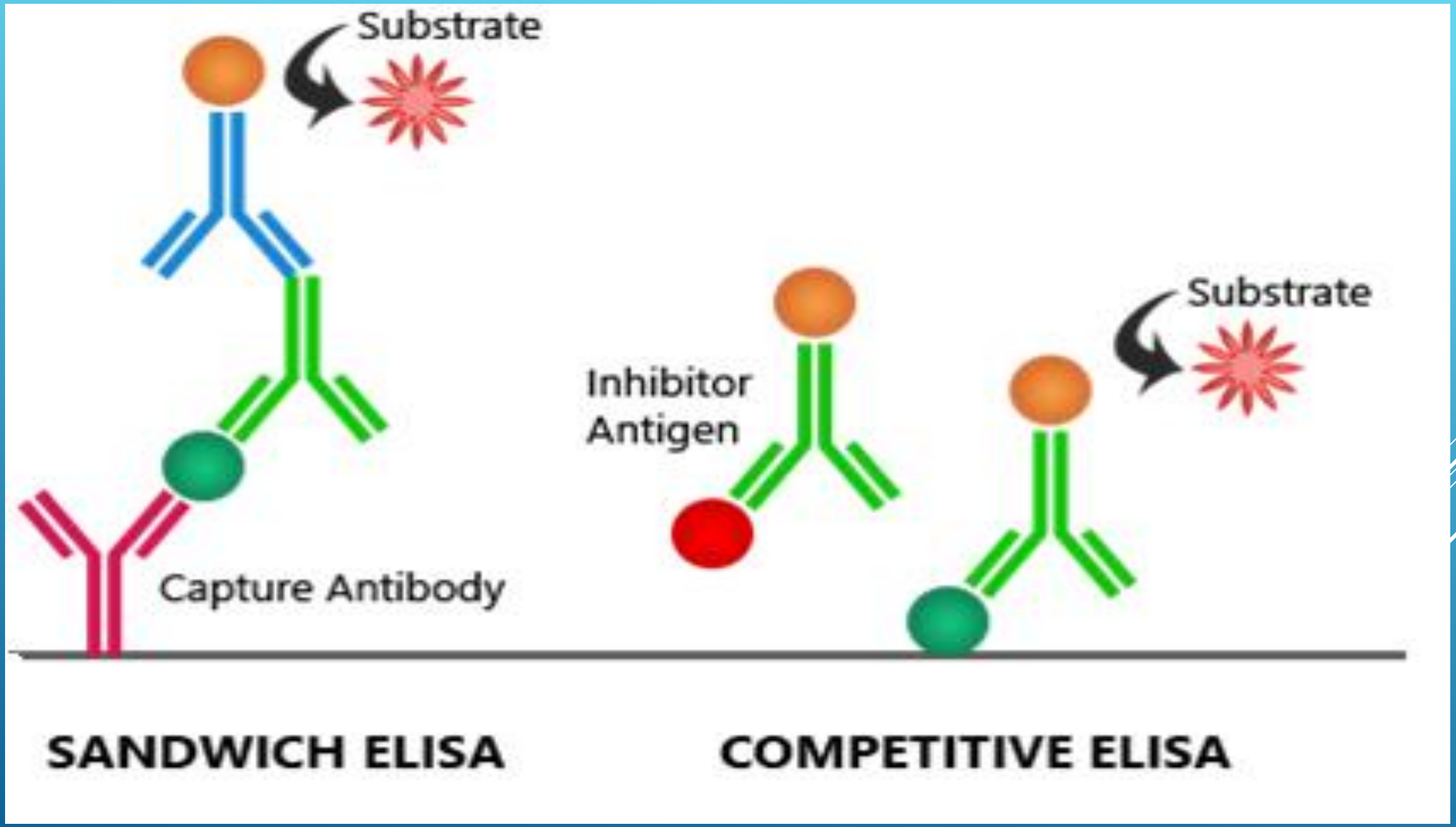
a)Ab. Sandwich or Ag.capture : LH.FSH.HCG.PSA.TSH

b) Ab.capture: Anti. HCV-Anti HiV-HbsAb

2-Competitive ELISA :

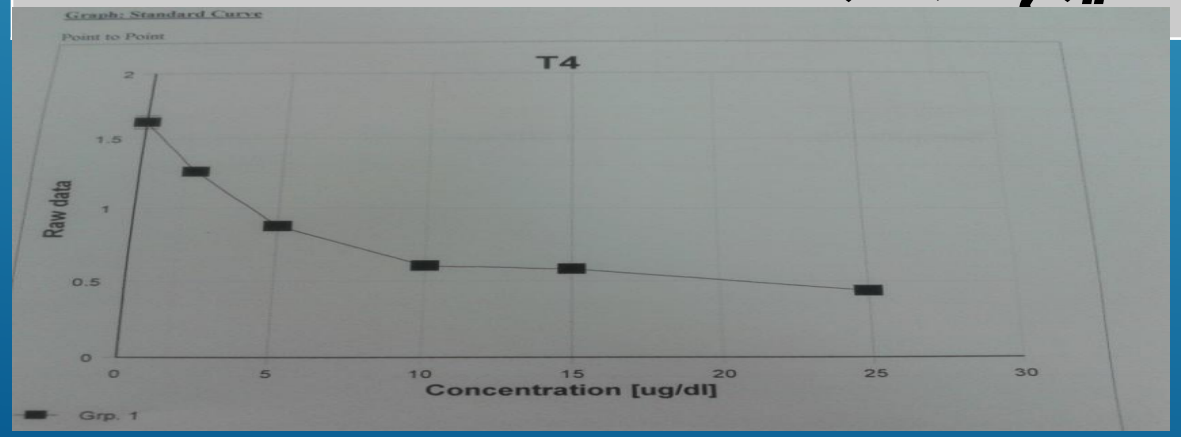
a) Competitive for antigen :T3-T4-ViT.D3-Testosteron

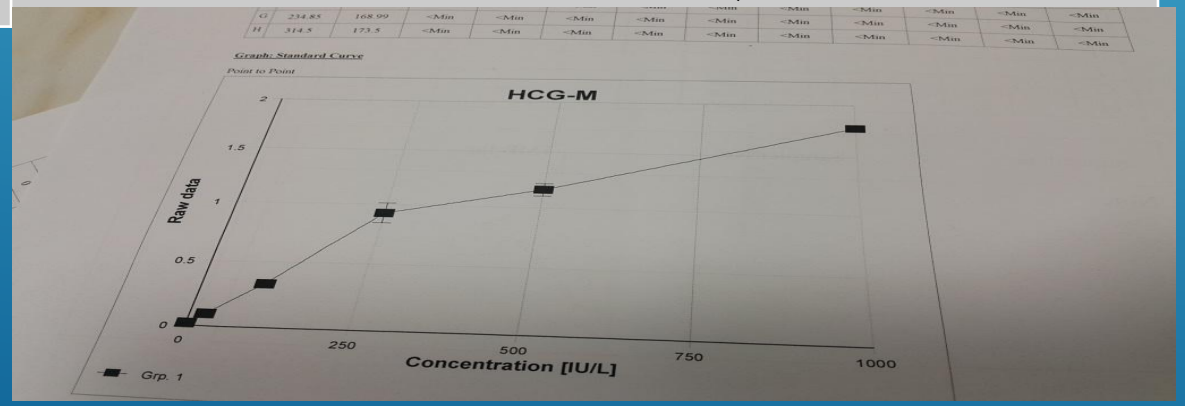
b) Competitive for antibody :HbcAb


Substrate
Capture Antibody
Inhibitor
Antigen
Substrate
SANDWICH ELISA
COMPETITIVE ELISA

مقایسه روش های ایمونومتریک با ایمونواسی

IMMUNO ASSAY EIA-Ag*	IMMUNOMETRIC ASSAY EIMA-Ab
مولکول انتی ژن نشاندار است	مولکول آنتی بادی نشاندار است
پیچیدگی نشاندار سازی	سهولت نشاندار سازی
عملکرد رقابتی	عملکرد غیر رقابتی
حساسیت کمتر- کم بودن مکانهای نشاندار سازی	حساسیت بالا- زیادتر بودن جایگاههای نشاندار سازی
از مولکول های نشاندار سیگنال دریافت می کنند.	به ازا هر مولکول یک سیگنال دریافت می شود
برای غلظت های بالا حساسیت دارد	قادر به تجسس مقادیر ناچیز
ویژگی کمتر-استفاده از یک آنتی بادی	ویژگی بیشتر -استفاده از دو آنتی بادی
منحنی استاندارد سیر نزولی دارد	منحنی استاندارد سیر صعودی دارد
محدوده عملکرد پائین	محدوده عملکرد بالا-حدود صدبرابر
شیوع اثر هوک	کاهش اثر هوک

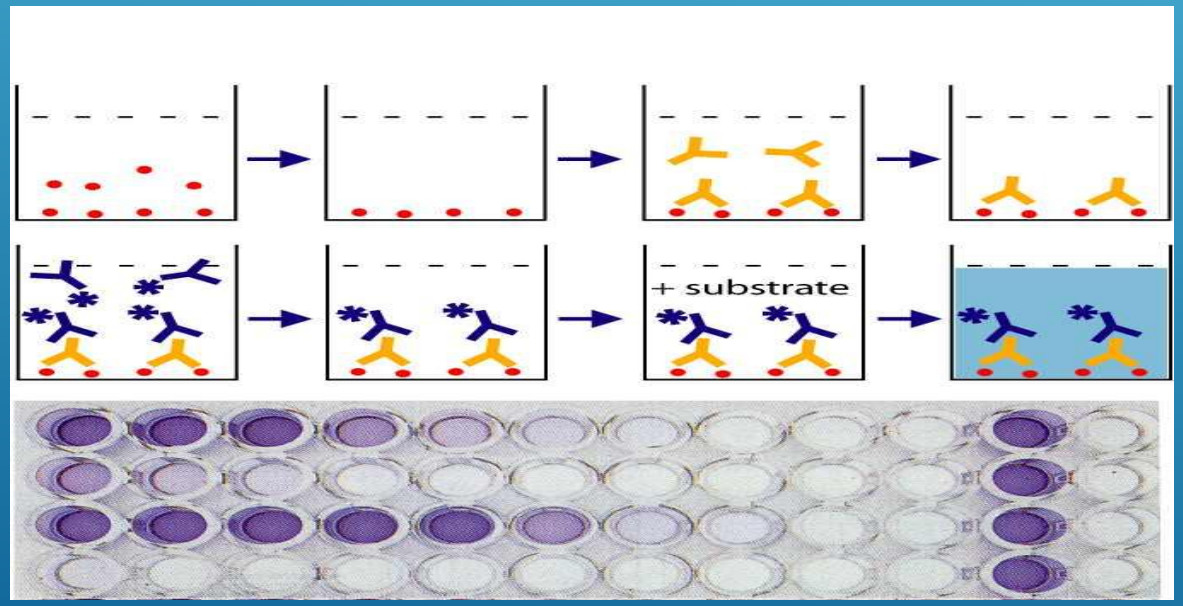


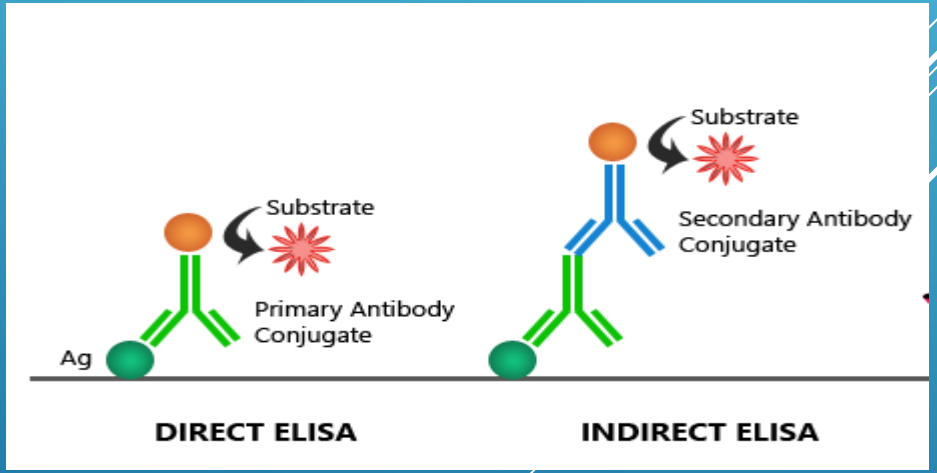


INDIRECT ELISA

- براي تعيين آنتي بادي اختصاصي و يا تيتراسيون آنتي بادي در نمونه هاي سرمي استفاده مي شود.

براي جلوگيري از جذب غير اختصاصي پروتئين هاي موجود در سرم و جلوگيري از اشغال نقاط اتصال آنتي ژن نمونه بايدبا بافررقيق كننده نمونه رقيق شود.





PIPETTES AND BEST PIPETTING PRACTICE

Manual single channel

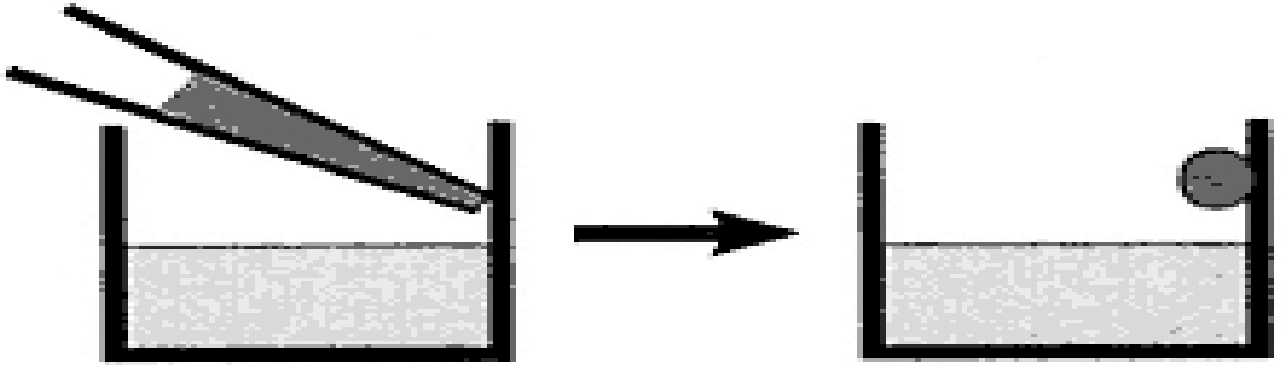
Manual multi-channel

Electronic single channel

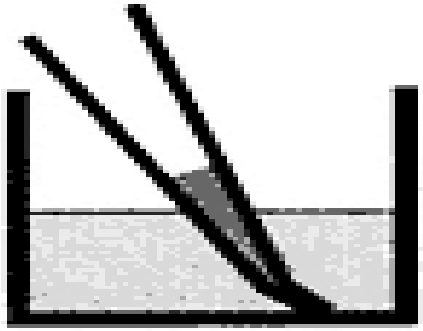
Electronic multi-channel

WAYS TO OPTIMIZE PIPETTE PERFORMANCE

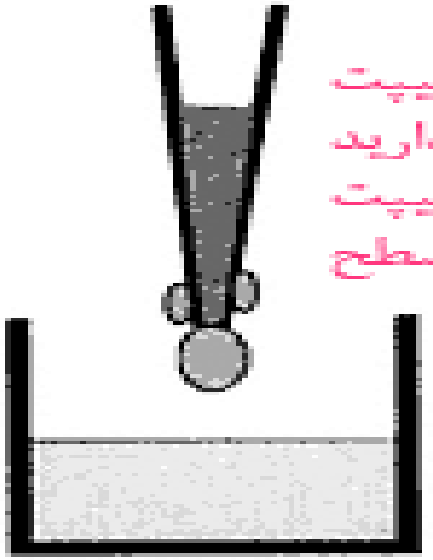
- Choose the right pipette for the job.
- Check for leaks or any other pipette malfunctions
- Choose the correct pipette tip
  - Correct size
  - Correct style
- Have pipettes calibrated and serviced regularly.
- Allow all liquids and equipment to equilibrate to ambient temperature before beginning work.
- Pre-rinse the pipette tip by aspirating and dispensing the sample liquid at least 3 times before aspirating a sample for delivery.
- Immerse the tip vertically into the sample liquid well clear of the container walls and bottom and at a depth of approximately 2 – 5mm below the meniscus.



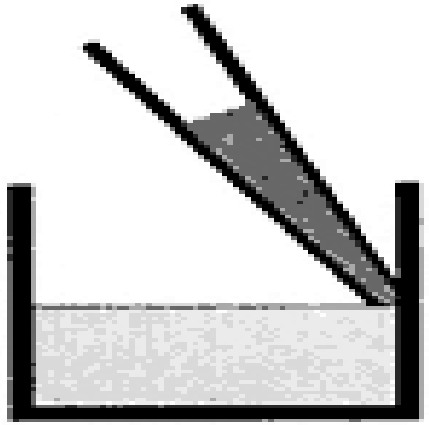
پیپت کردن را با درجه مناسب انجام دهیم تا تموته در دیواره چاهک باقی تماند.



پیپت را وارد چاهک نکنید و فشار ندهید این عمل باعث خم شدن سر پیپت و ایجاد خطا زمان خارج شدن مایع می شود.



از انداختن قطره در حین پیپت کردن اجتناب کنید، بگذارید که قطره خارج شده از پیپت محل تلاقی پیپت و سطح چاهک باشد.



مطمئن شوید که سر پیپت دیواره ها را لمس می کند این بهترین روش برای پیپت کردن تموته است.

GUIDE TO PIPETTING

RESULTS

- After reading the results the standard curve is drawn were the concentration is blotted on the X-axis and the absorbance on the Y-axis

RESULTS

- The standards concentrations is specified on the x-axis and the reading of each standard is specified on the y-axis and the standard curve is drawn

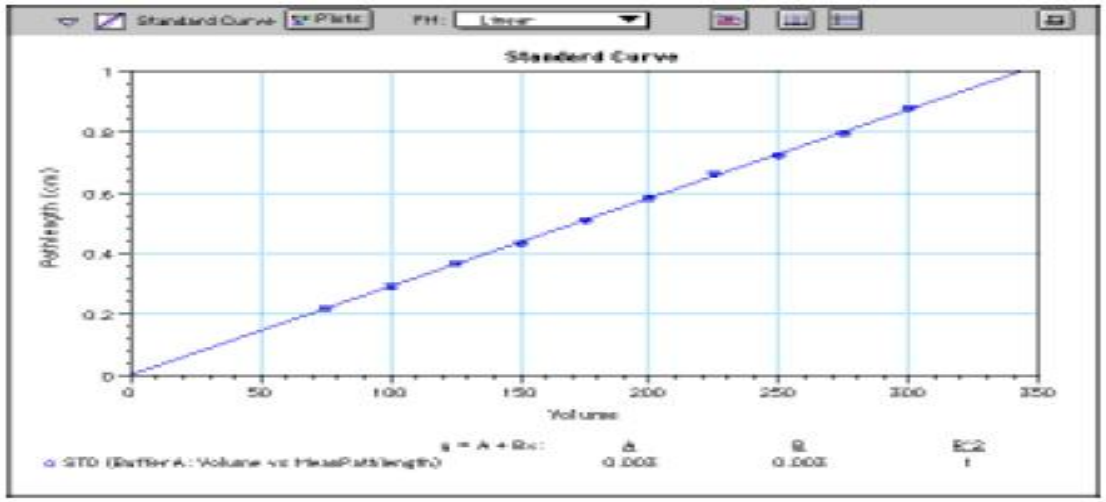
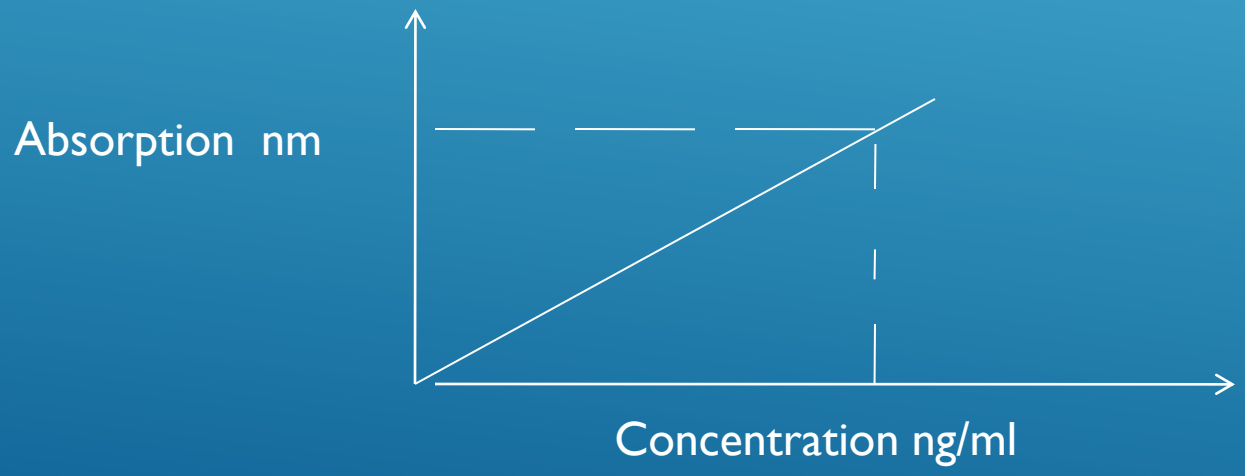


Figure 8: The calibration curve relating well volume to pathlength

RESULTS

- This standard curve is used to determine the unknown concentration of each sample by finding the opposite concentration to the absorbance



ELISA EQUIPMENT : MICROPLATE READER

INSTALLATION REQUIREMENTS

1. A clean, dust free environment.
2. A stable work table away from equipment that vibrates (centrifuges, agitators).
3. An electrical supply source, which complies with the country's norms and standards.

- **Maintenance:**

- Checking the light source for cleaning

- After turning on , wait for 30 min. to warm up,

کنترل کیفی الایزا:

- بررسی صحت خوانشگر الایزا
- بررسی خطی بودن خوانشگر الایزا
- بررسی تکرارپذیری سمپلر و تکرارپذیری خوانشگر الایزا
- بررسی فرآیند شستشو

MICROPLATE (ELISA) READER

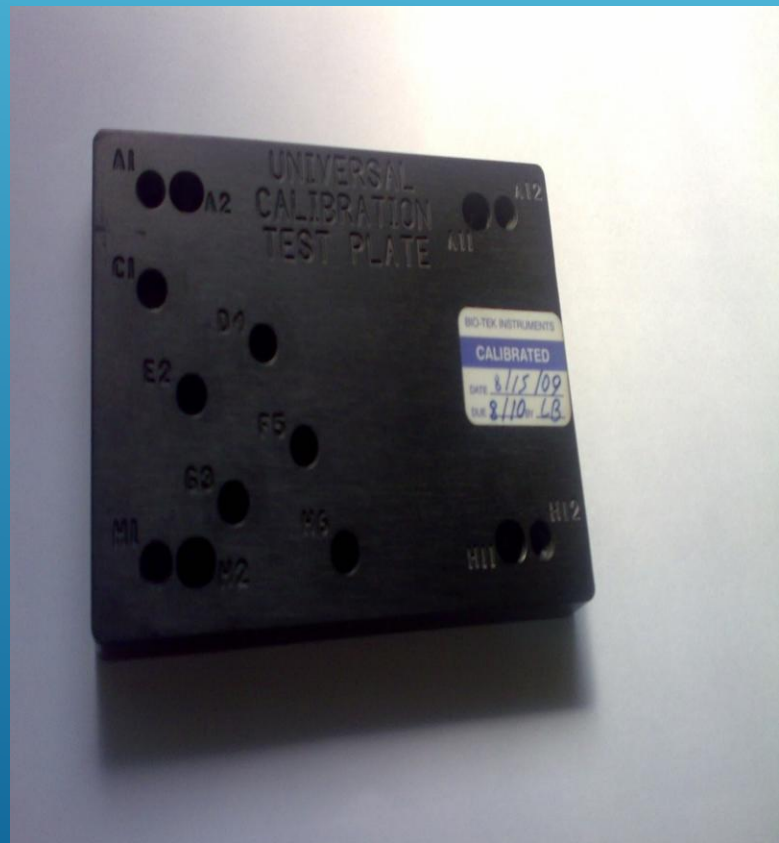
- **Calibration:**
- With calibrate microplates covered with known filters in low, high and average wave lengths

- Put calibrate microplate in instrument and read the OD in all wells then turn the microplate 180 degree and read OD again

- There must be no differences

Well	405 (nm)	450(nm)	490(nm)	620(nm)
C1	0.155 (0.143-0.167)	0.147 (0.136-0.158)	0.142(0.131-0.153)	0.147 (0.136-0.158)
D4	0.638 (0.622-0.654)	0.57 (0.554-0.586)	0.575(0.559-0.591)	0.583 (0.567-0.599)
E2	1.235 (1.0213-1.257)	1.111 (1.09-1.132)	1.098(1.077-1.119)	1.078 (1.057-1.099)
F5	1.832 (1.804-1.86)	1.659 (1.632-1.659)	1.641(1.615-1.667)	1.609 (1.583-1.635)
G3	2.209 (2.177-2.941)	1.946 (1.917-1.975)	1.911(1.882-1.94)	1.844 (1.816-1.872)
H6	2.84 (2.802-2.878)	2.515 (2.48-2.55)	2.472(2.437-2.507)	2.389 (2.355-2.423)

GREY FILTER



MICROPLATE (ELISA) READER

- Quality Control:

- Calibrated plates with known wave length and OD for all QC checks

-If using chemical solutions ,linearity, photometric accuracy , wave length calibration are the same as spect.

- Precision (reproducibility):

- Using colored solution; methyl orange in 10mg% (tween 20) in 492nm

-preparing different dilutions, read mean, Min. and Max. OD then compare with company instructions

-Or calculate mean, SD and CV(accepted CV is <3%)

BASIC MAINTENANCE

Frequency: Daily

1. Review that optical sensors of each channel are clean.

If dirt is detected, clean the surface of the windows of the light emitters and the sensors with a small brush.

2. Confirm that the lighting system is clean.

3. Verify that the reader's calibration is adequate. When the daily operations begin, let the reader warm up for 30 minutes. Next, do a blank reading and then read a full plate of substrate. The readings must be identical. If not, invert the plate and repeat the reading in order to determine if the deviation originated in the plate or the reader.

4. Examine the automatic drawer sliding system. It must be smooth and constant.

PREVENTIVE MAINTENANCE

Frequency: Quarterly

1. Verify the stability of the lamp. Use the calibration plate,

conducting readings with intervals of 30 minutes with

the same plate. Compare readings. There must be no

differences.

2. Clean the detectors' optical systems and the lighting

systems.

3. Clean the plate drawer.

4. Verify the alignment of each well with the light emission

and detection systems.

ELISA Equipment :

- **INSTALLATION REQUIREMENTS**

1. A clean, dust-free environment.

2. A stable work table located away from equipment

that generates vibrations, (centrifuges, and agitators).

3. An electric outlet in good condition with a ground pole.

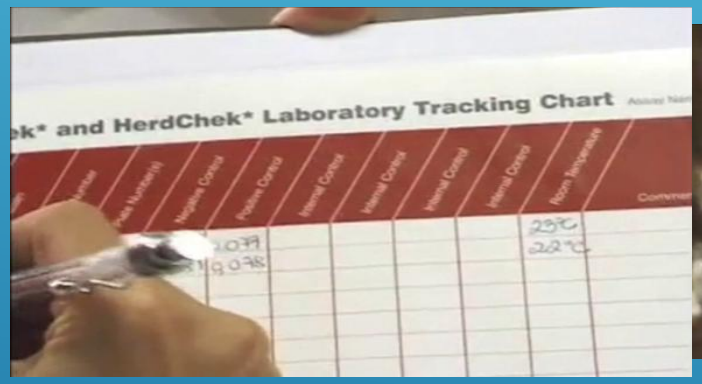
MICROPLATE WASHER

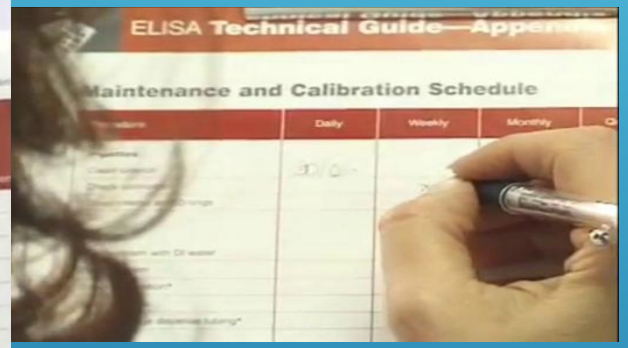
Basic maintenance Frequency: Daily

1. Verify the volume distributed.
2. Test the filling uniformity.
3. Verify the aspiration sub-system's efficiency.
4. Confirm the cleaning of the supply and extraction needles.
5. Clean the washer with distilled water after use, to remove every vestige of salt in the supply and extraction subsystems' channels. The needles may be kept submerged in distilled water.
6. Verify that the body of the washer has been cleaned. If necessary, clean the exterior surfaces with a piece of cloth, moistened with a mild detergent.

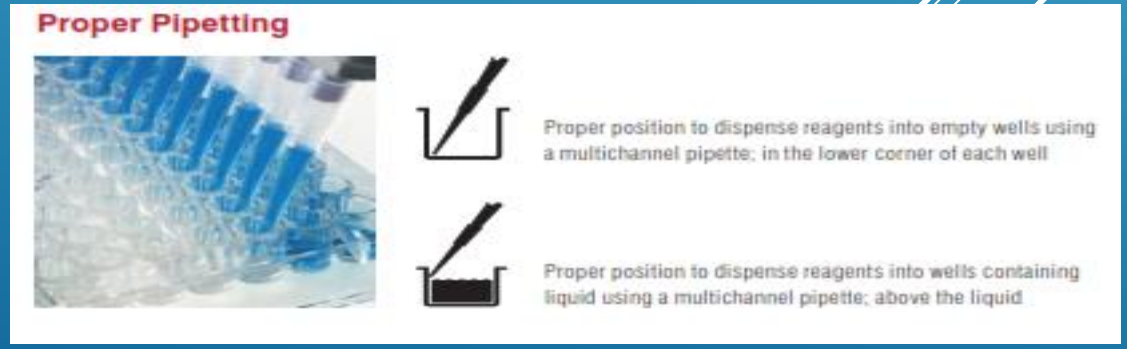
MICROPLATE WASHER MAINTENANCE

Equipment Documentation

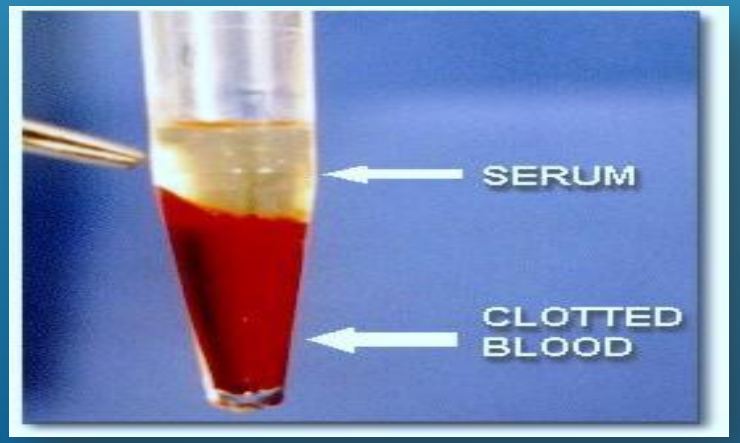


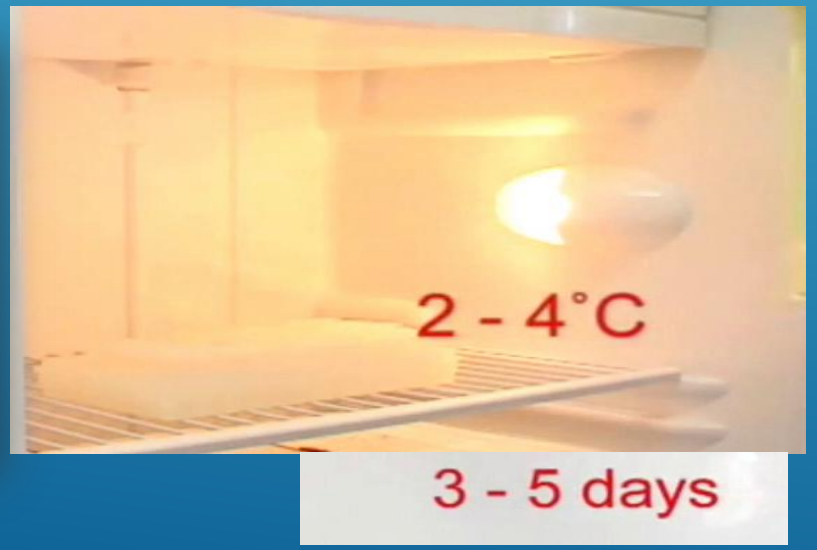


GOOD ELISA PRACTICE BEFORE RUNNING THE TEST

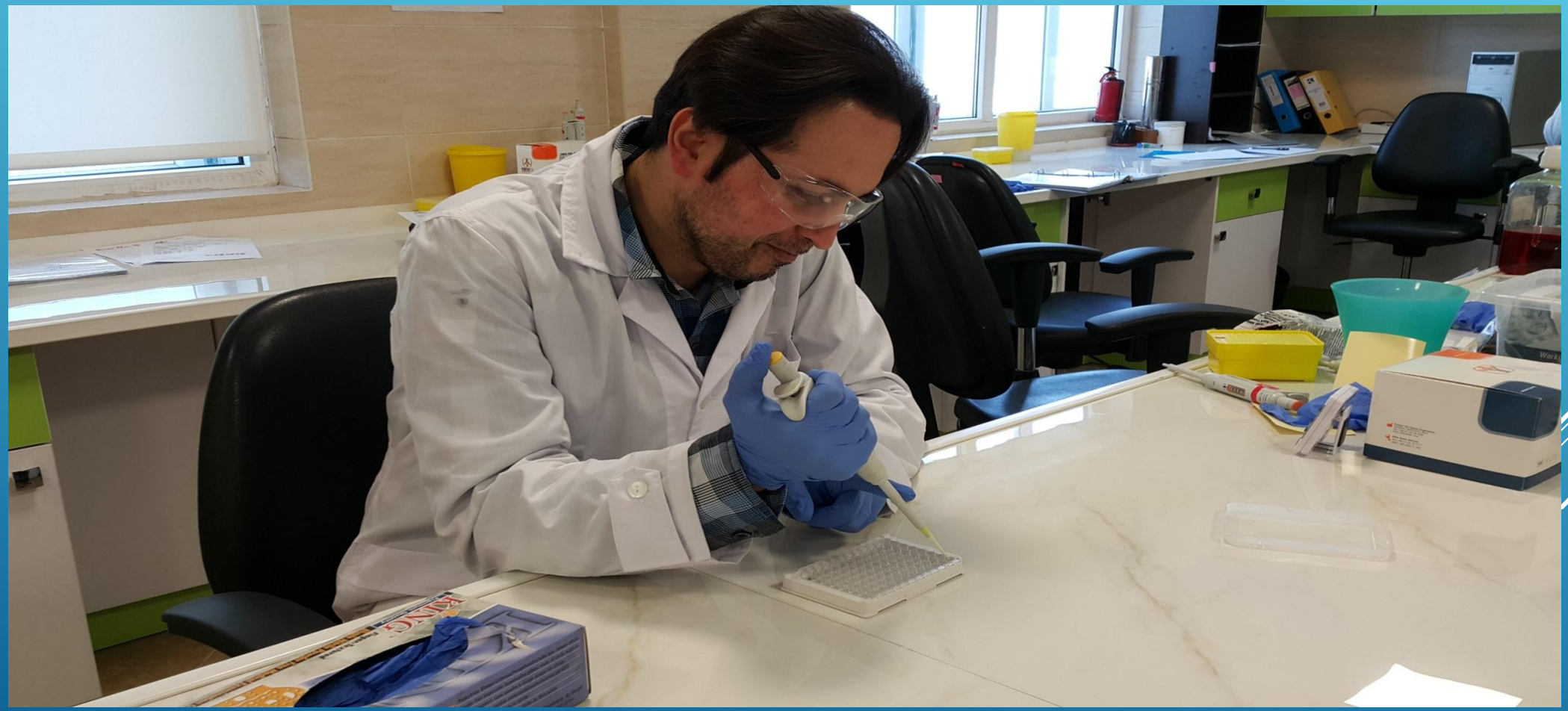


GOOD ELISA PRACTICE BEFORE RUNNING THE TEST





GOOD ELISA PRACTICE
RUNNING THE TEST



GOOD ELISA PRACTICE RUNNING THE TEST, INCUBATION

TAPPING but NOT DRYING

GOOD ELISA PRACTICE
RUNNING THE TEST, WASHING

- Ensure about standard laboratory water used for wash working solution preparation
- Ensure about stability of washing solution (MFQ brochure)
- Check for any required soak time (MFQ brochure)

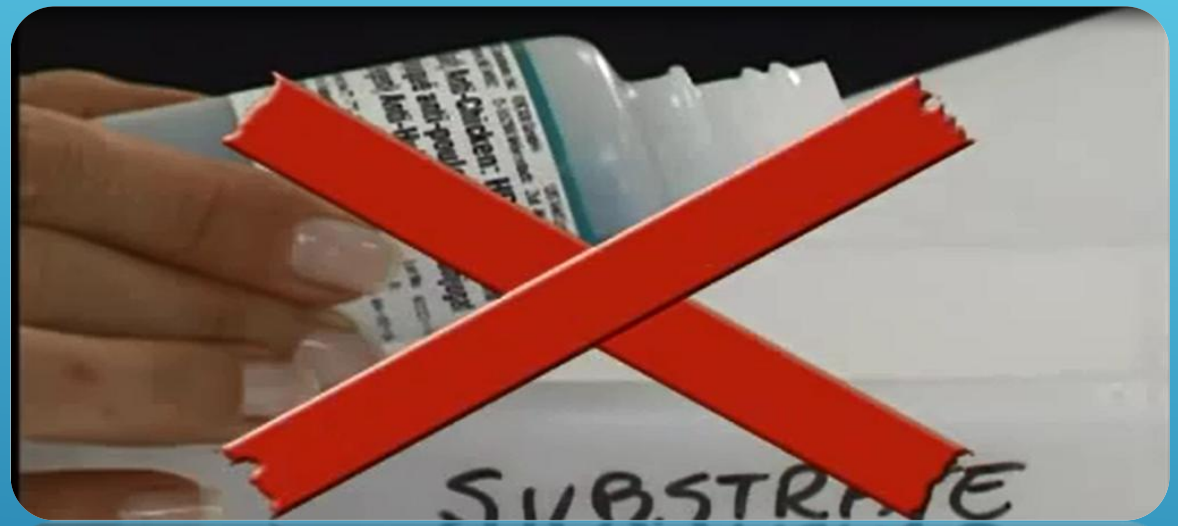
Good ELISA Practice Running the test, Conjugate, substrate and stop

7-HOW TO TREAT WITH THE REAGENTS?

Use reservoir for each reagent

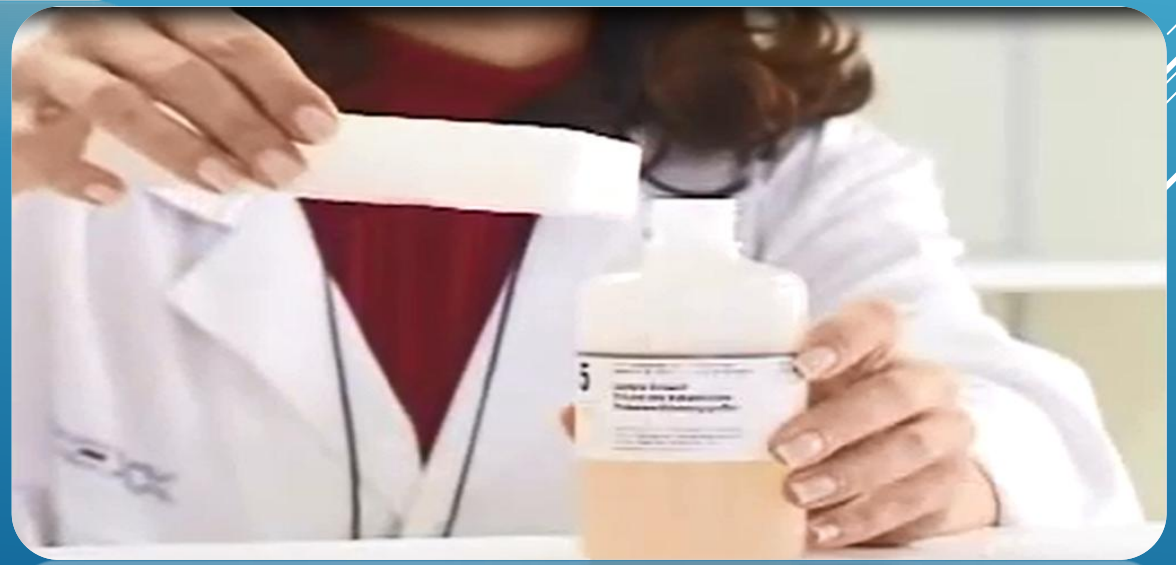
Label the reservoir

7-HOW TO TREAT WITH THE REAGENTS?

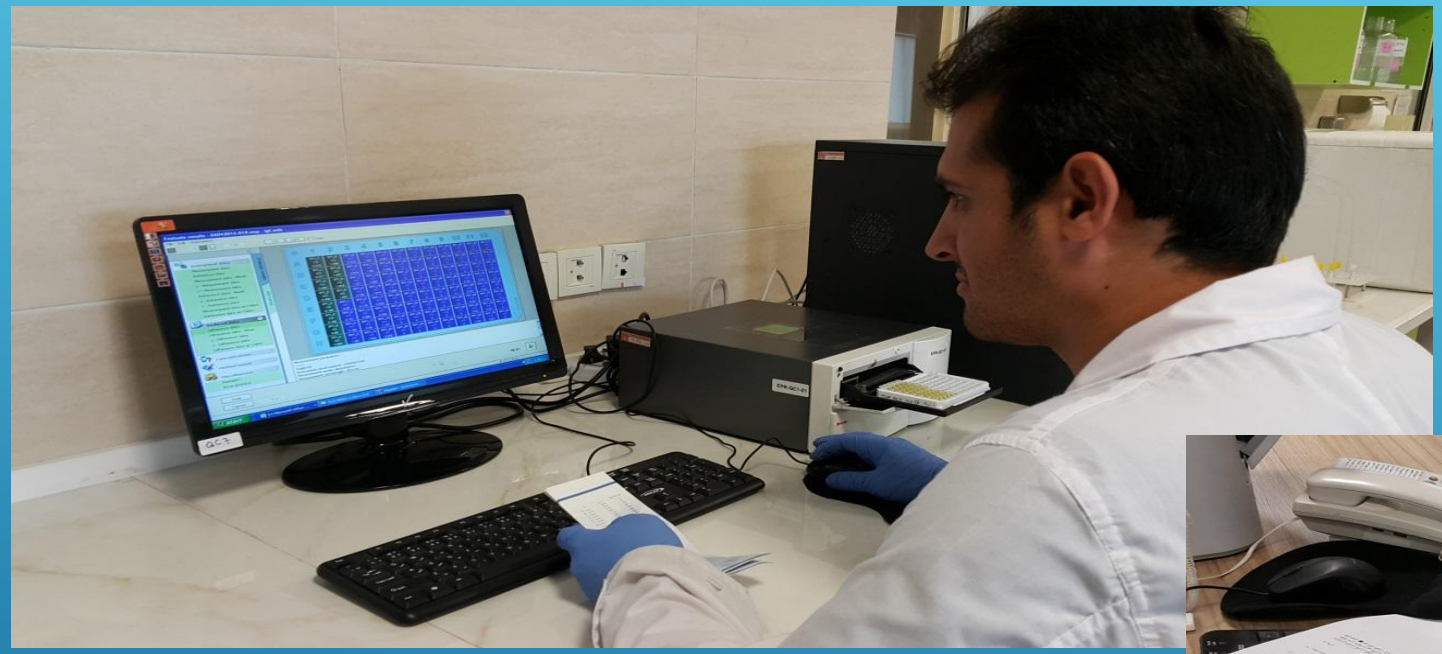


Don’t use the same reservoir for multiple regents

Don’t return the reagents to the stock



Good ELISA Practice, Reading and calculation



Don’t forget to use right filter

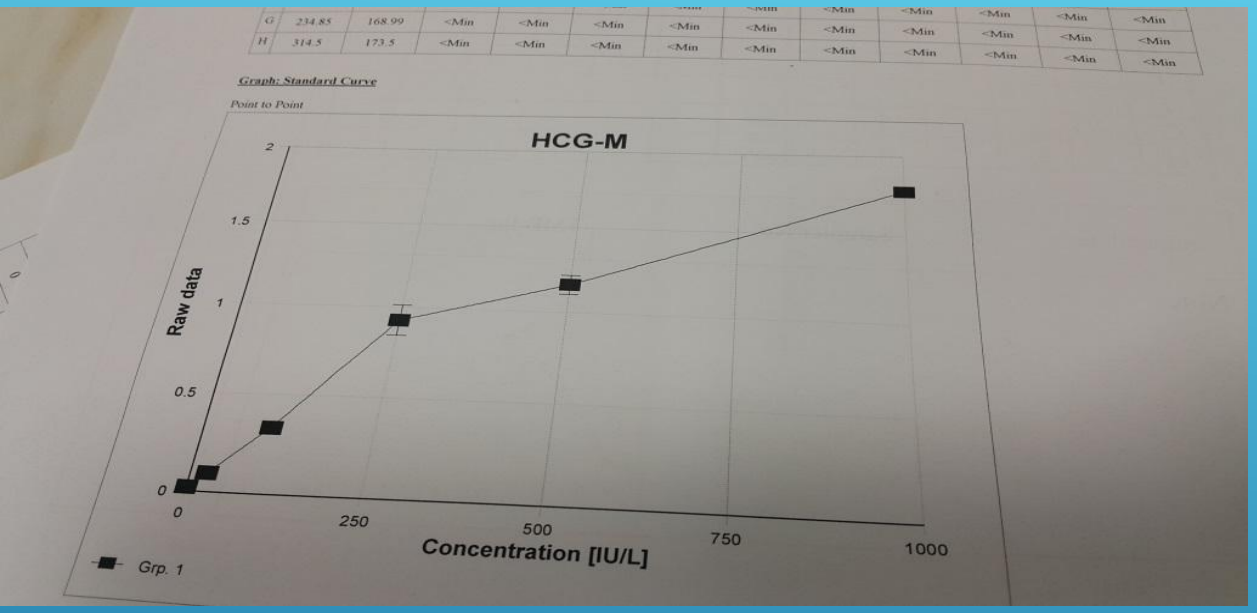
Don’t forget to use blank reading

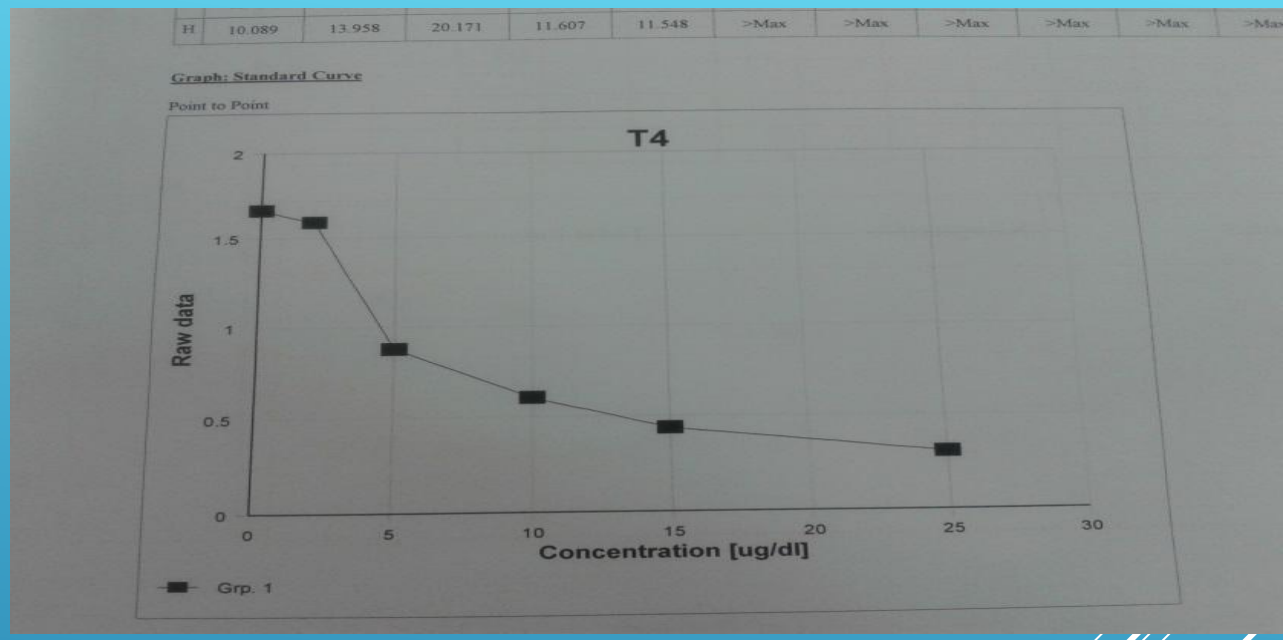
Don’t forget to check plate back cleaning

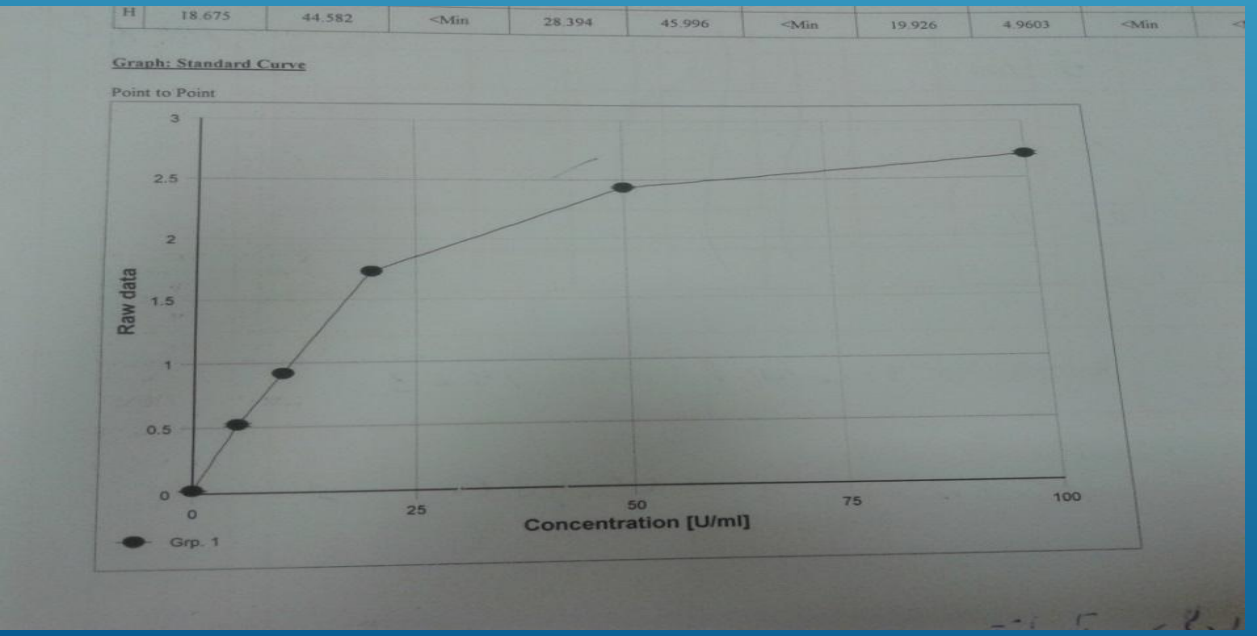
Don’t forget to use correct formula for calculation based on mfq claim

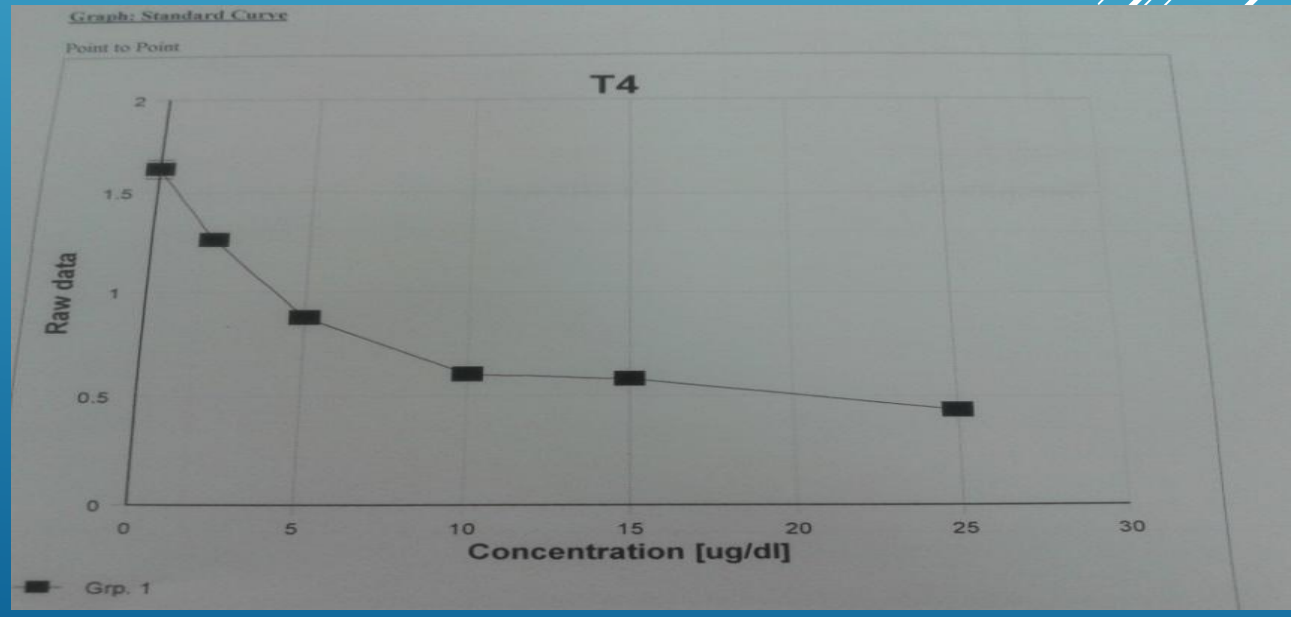
Don’t forget to use correct Reference interval based on mfq claim

Good ELISA Practice, Check Standard curve









تصدیق و صحه گذاری(کیت ها- روش ها یا تجهیزات) جدید

- مقایسه دقت و صحت دو روش آزمایشگاهی (مثلا الایزا –با رادیوایمونواسی)برای یک نوع آزمایش یا دو کیت از یک نوع آزمایش به شکلی یک شرکت الزاما معتبر و داری تائیدیه کیفی باشد
- انجام یك یا چند تست با نتیجه غیر طبیعي با دو کیت الایزا متفاوت جهت مقایسه میزان خطی بودن وهمبستگی نتایج در اعداد بالا و پائین و بررسی مقایسه ای تکرار پذیری صحت و حساسیت و ویژگي کیت جدید الایزا با کیت معتبر و مرجع الایزا

ELISA

TROUBLESHOOTING

مقادیر بالای کنترل منفی و یا رنگ زمینه

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
آلوده شدن چاهک های کنترل منفی با کنترل مثبت	– در هنگام شستشو از سر ریز شدن محلول شستشو از چاهکهای پلیت به یکدیگر اجتناب کنید. – همیشه ابتدا کنترل منفی را در چاهکها ریخته و بعد کنترل مثبت را بریزید
آلوده شدن ویال کنترل منفی	- برای هر نمونه برداری از نوک سمپلر جدید استفاده کنید - – توجه داشته باشید که نوک سمپلر به اندازه کافی بلند باشد تا نمونه ها با انتهای لوله سمپلرتماس پیدا نکند – تست را با مواد کیت تازه تکرار کنید
شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کنترل منفی با آنزیم کنژوگه	– در هنگام شستشو مطمئن شوید که تمامی باقیمانده های آنزیم کنژوگه از چاهک ها خارج شده اند – تمامی نمونه ها و مواد را در مرکز کف چاهک ها بریزید و از تماس نوک

*اگر OD NC>0.2 باشد کنژوگه رقیق شود

مقادیر پائین کنترل مثبت OD پائین

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۱- در زمان تست مواد داخل کیت به دمای اتاق رسانده نشده اند	▸ مطمئن شوید که تمامی اجزای کیت به دمای اتاق رسیده اند(۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) ▸ مطمئن شوید که نوک سمپلرها خوب و محکم فیت شده اند لوله سمپلرها را چک کنید تا گرفته نشده باشند
۲- حجم نمونه کمتر از مقدار لازم است	
۳-محلول کروموژن – سوبسترا بدرستی تهیه نشده است	محلول کروموژن - سوبسترا را درست قبل از استفاده آماده وطبق بروشورتهیه کنید
۴- آلودگی سوبسترا به اسید	
۵-آلودگی کنترل مثبت به باکتری (خرابی کنترل)	مجدداً تست را با یک کیت جدید تکرار کنید

مقادیر پائین کنترل مثبت OD پائین

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۶-زمان انکوباسیون خیلی کوتاه است	رعابت زمان انکوباسیون
۷- ورود رطوبت به کیسه حاوی پلیت	عملکرد صحیح نم گیر داخل کیسه پلیت را بررسی کنید استریپهائی که مصرف نمی شوند را درکیسه قرارداده و در آن را محکم ببندید
۸- دمای اتاق برای انکوباسیون سوبسترا خیلی پائین است	بررسی دمای انکوباتور یا اتاق
۹-خشك شدن چاهکها در خلال انجام تست	انجام تمام مراحل تست بدون وقفه
۱۰- افزودن ناکافی آنزیم کنژوگه غلیظ به محلول رقیق کننده برای ایجاد محلول آماده کار	کنژوگه را دوباره با صحت کامل تهیه کنید

در تمام خانه های پلیت رنگ ظاهر شده است

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۱-شستشوی نا کافی یا مسدود شدن کانالهای واشر الایزا	اطمینان از صحت عملکرد واشرالایزا انجام کالیبراسیون و تعمیرات روتین
۲-وجود گلبولهای قرمز در نمونه	نمونه را قبل از استفاده سانتریفوژ نمائید
۳-تبخیر آنزیم کنژوگه در خلال انکوباسیون ۳۷ درجه	پلیت را با برچسب مخصوص بپوشانید
۴-دمای انکوباسیون بالا	دمای اتاق یا انکوباتور را چك کرده و در میزان مورد نظر کالیبره کنید

در تمام خانه های پلیت رنگ ظاهر است شده

دلایل احتمالی	تصحیح ایراد
۵-آلوده شدن چاهکها با آنزیم کنژوگه	آنزیم کنژوگه را با دقت در مرکز کف چاهکها اضافه نموده و از تماس نوك سمپلر با دیواره ها و لبه های چاهك ها بپرهیزید
۶-آلوده شدن سوبسترا به آنزیم کنژوگه	بازرسی لوله سمپلر ازنظر عدم وجود ذرات مایع یا خشك شده خارجی و استفاده از نوك سمپلر بلند
۷-غلظت بالای آنزیم کنژوگه در محلول رقیق کننده	از روی دستور کار کیت یك محلول کنژوگه آماده کار تازه بسازید

NSB تعیین میزان اتصالات غیر اختصاصی

- وجود بلانک ابزار مناسبی جهت بررسی کارایی یک روش جداسازی (شستشو) می باشد.
- اگر چاهک بلانک دارای جذبی ۱.۰< باشد بیانگر ناکارآمدی شستشو در حذف اتصالات غیر اختصاصی لیگاندهای آزاد در محیط سنجش می باشد.

با تشکر از توجه شما