تفسیر نتایج الایزا

دکتر محمد کرد

عضو هیئت علمی گروه علوم آزمایشگاهی

دانشکده ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

ایمیل: MOHAMMADKORD2000@YAHOO.COM

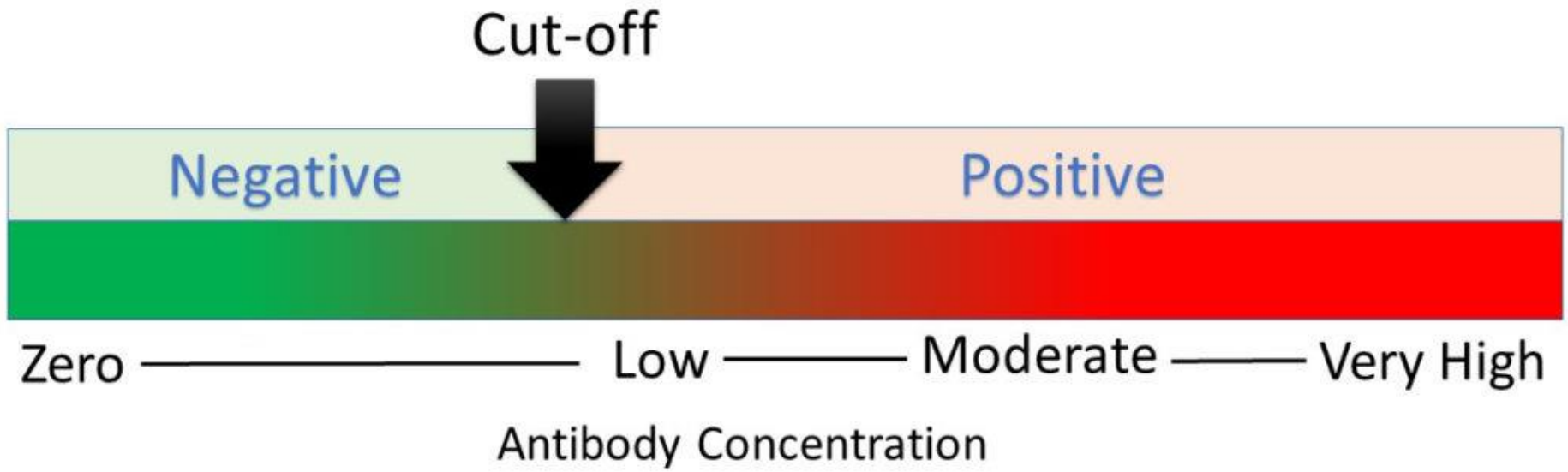
نتایج گزارش شده در روش الایزا

- نتایج کیفی
- نتایج کمی
- نتایج نیمه کمی

نتایج کیفی

- وجود یا عدم وجود یک آنالیت را نشان می دهند.
- گزارش نتایج بصورت مثبت و یا منفی می باشد.
- نیازمند محاسبه ی **Cut off** هستند تا بر اساس آن وجود یا عدم وجود بیماری و یا آنالیت مورد نظر به اثبات برسد.

ELISA Interpretation



محاسبه ی CUT OFF در تست های کیفی الایزا

❖ **Cut off تجاری**

- **بصورت تجاری در داخل کیت مورد نظر وجود دارد.**

❖ **Cut off محاسباتی**

- **بر اساس مجموع جذب نوری محاسبه شده و فاکتور ارائه شده در داخل بروشور کیت محاسبه می شود.**

Cut off OD calculation

Cut off= Mean OD of NC+ F

Ready To Use Cut off: Patient OD / Mean OD of cut off

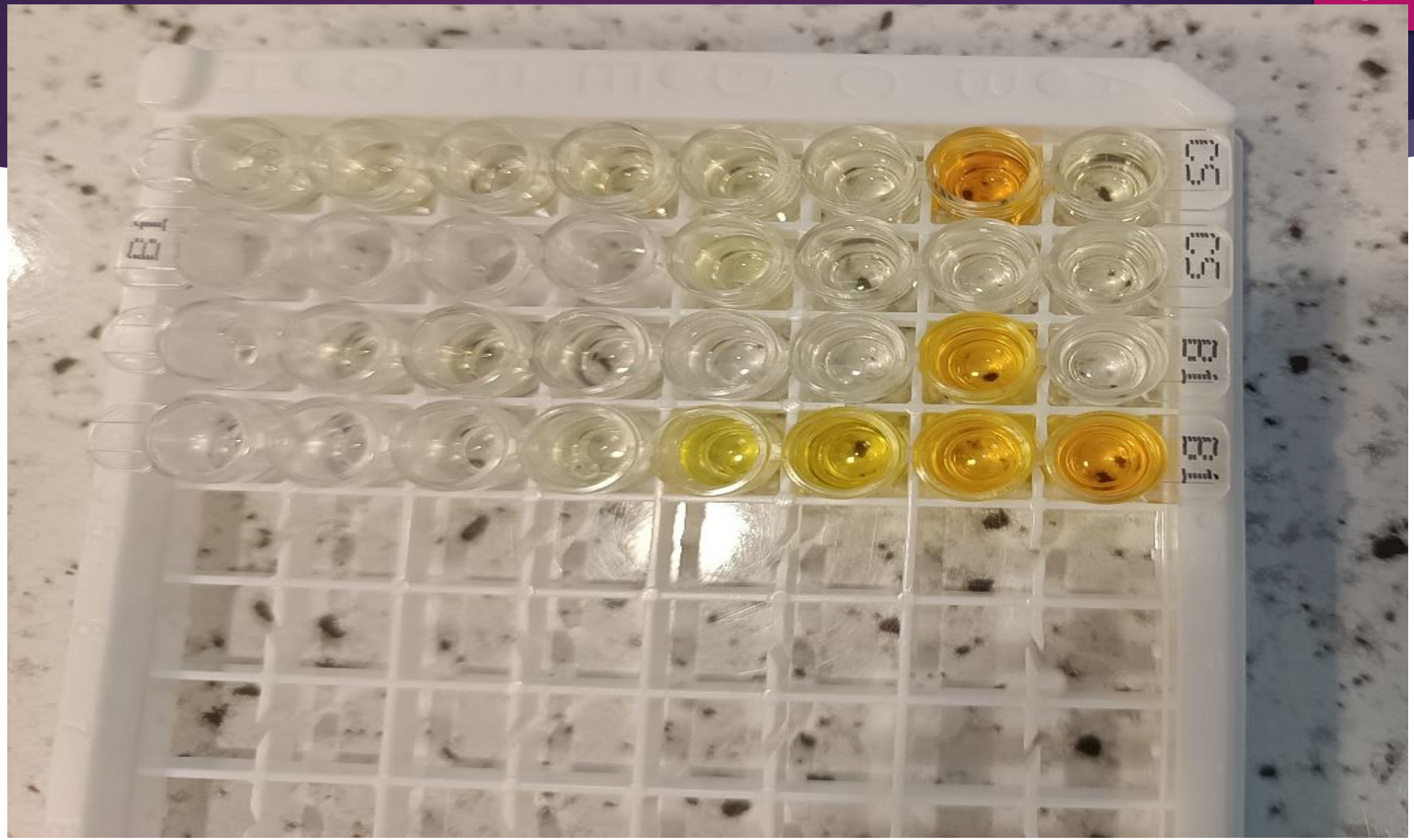
تفسیر نتایج کیفی

- Negaive: <1.0
- Positive: >1.0

OD Negative <0.10

OD Positive > 1.3

- Negative: <0.9
- Equivocal(مبهم) : 0.9-1.1
- Positive: >1.1


B1

Troubleshooting

پایین بودن جذب نوری Cut off:

- افت Conjugate
- شستشوی نامناسب
- افت کیفیت Cut off
- زمان انکوباسیون نامناسب
- خطاهای تکنیکال مانند سمپلینگ نامناسب

❖ پیامد ها: افزایش کاذب موارد مثبت

Troubleshooting

بالا بودن جذب نوری Cut off:

- شستشوی نامناسب
- تغلیظ Cut off
- زمان و دمای انکوباسیون نامناسب
- خطاهای تکنیکال مانند سمپلینگ نامناسب
- آلودگی ویال Cut off

❖ پیامد ها: افزایش کاذب موارد منفی

موارد مثبت و منفی کاذب در تست های کیفی

❖ مثبت کاذب

- Cross reactions
- Microclot
- انجام غیرصحیح مراحل تست
- خطاهای Pre Analytical
- آلودگی نمونه
- کاهش کاذب جذب نوری Cut off

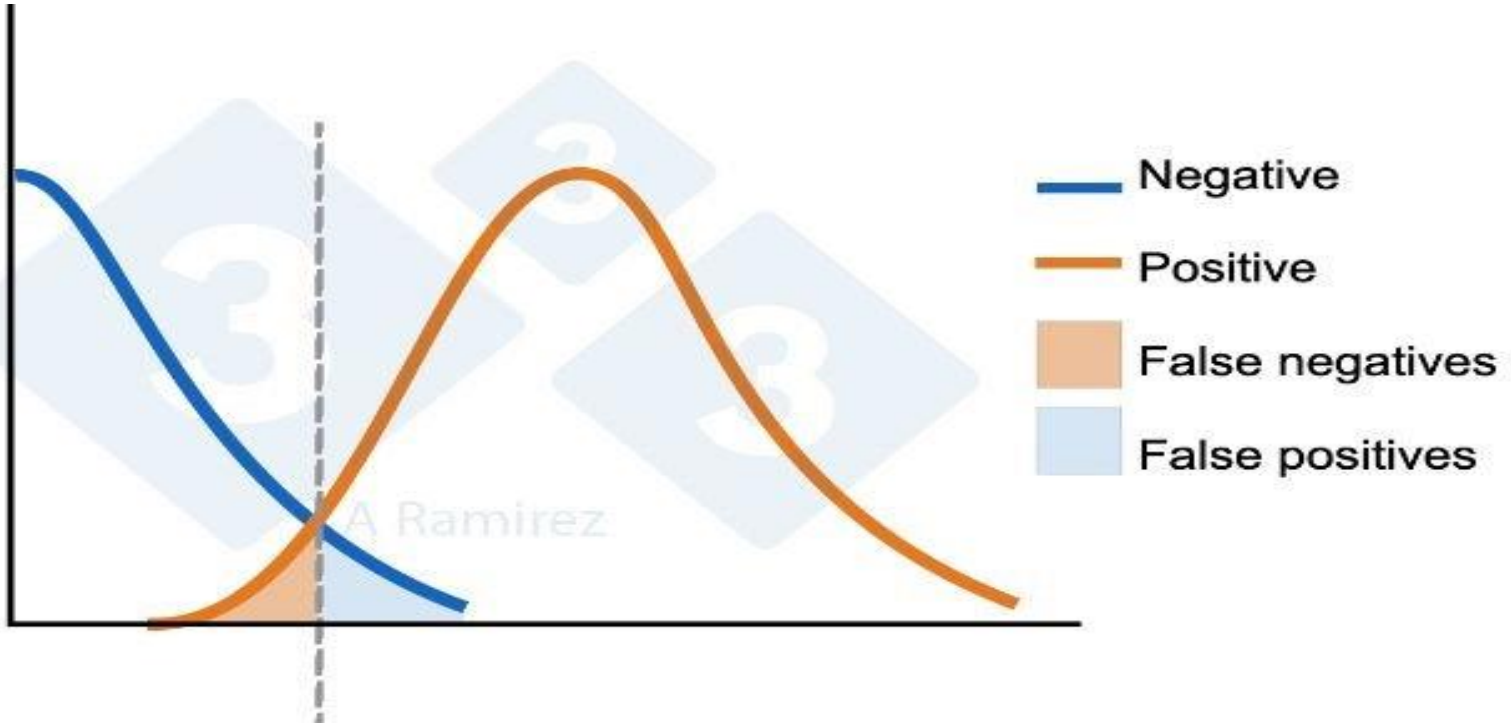
❖منفی کاذب

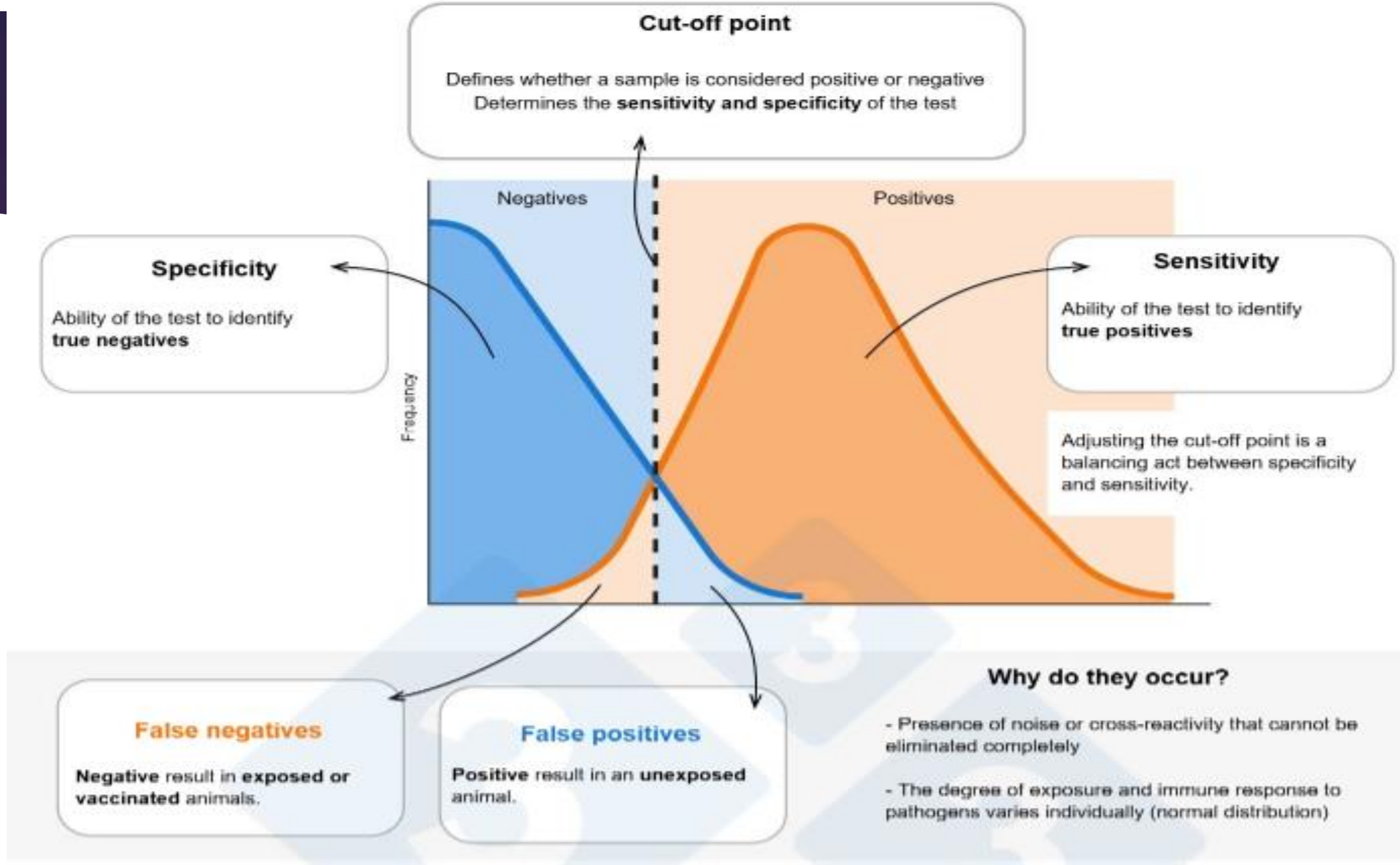
➢حساسیت و اختصاصیت پایین کیت

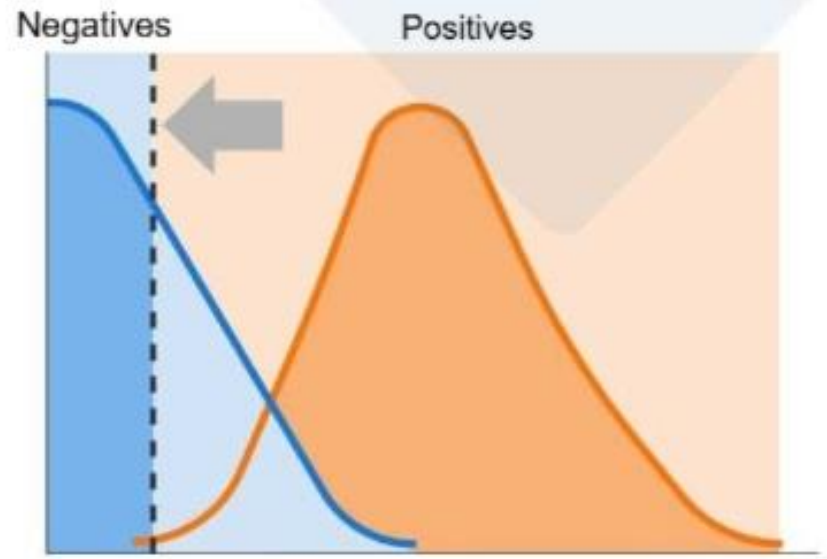
➢نگهداری نامناسب نمونه تا روز انجام

➢انجام غیرصحیح مراحل تست

➢افزایش کاذب میزان Cut off

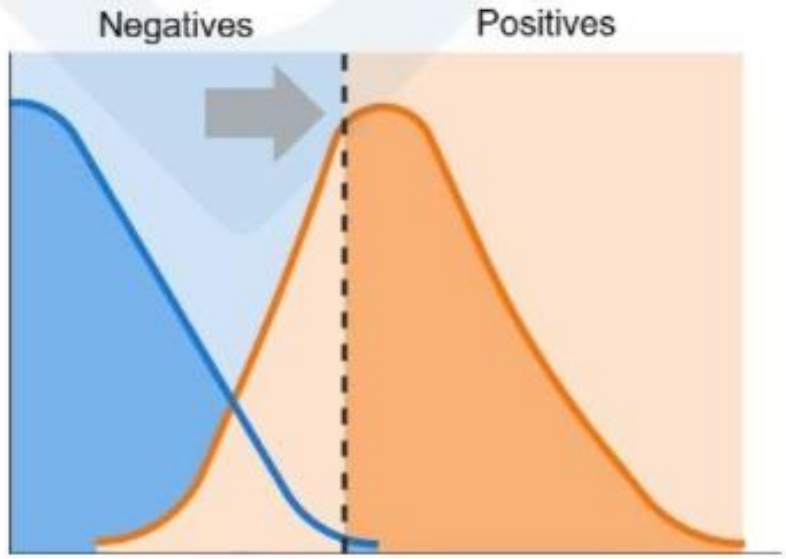

Negative
Positive
False negatives
False positives


Cut-off point
Defines whether a sample is considered positive or negative
Determines the sensitivity and specificity of the test
Negatives
Positives
Frequency
Specificity
Ability of the test to identify
true negatives
Sensitivity
Ability of the test to identify
true positives
Adjusting the cut-off point is a balancing act between specificity and sensitivity.
False negatives
Negative result in exposed or vaccinated animals.
False positives
Positive result in an unexposed animal.
Why do they occur?
- Presence of noise or cross-reactivity that cannot be eliminated completely
- The degree of exposure and immune response to pathogens varies individually (normal distribution)



Low cut-off

Its goal is to detect all possible cases, even those with low antibody levels.



High cut-off

To **ensure** that **a positive result is truly positive.**

اقدامات آزمایشگاهی لازم پس از تفسیر نتایج کیفی

- شرح حال بیمار
- تکرار روی همان نمونه
- تکرار نمونه گیری
- مشاوره با پزشک معالج
- تست های تکمیلی

مزایای استفاده از مقدار Cut-off در آزمایش‌های الایزا

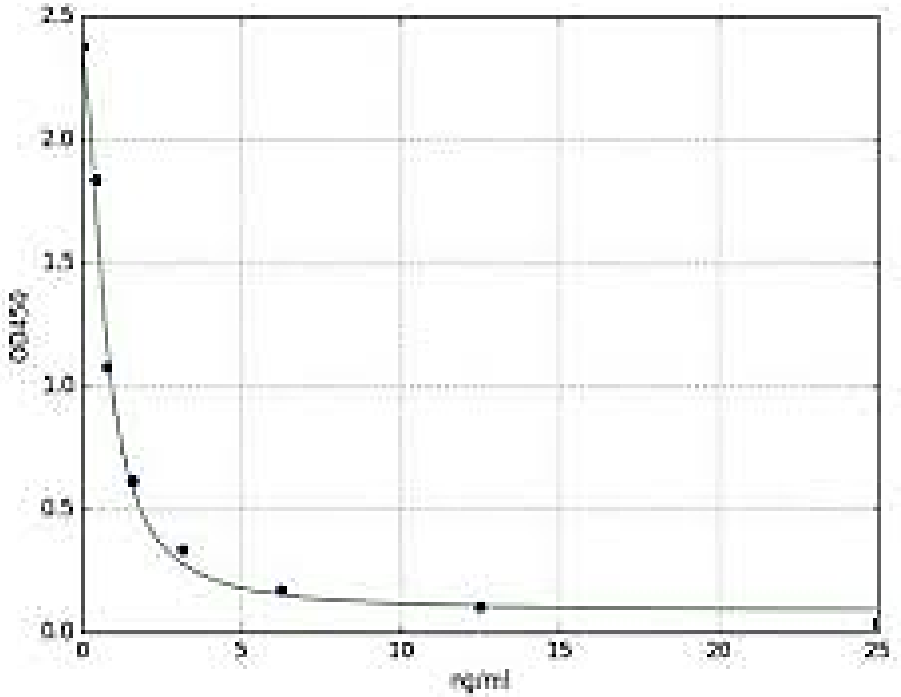
- **تفسیر آسان نتایج:** استفاده از مقدار Cut-off به عنوان یک نقطه تصمیم‌گیری ساده می‌تواند فرایند تفسیر نتایج آزمون را ساده‌تر کند. با مقایسه سیگنال نمونه با مقدار Cut-off، می‌توان به سرعت نمونه‌های مثبت و منفی را تشخیص داد.
- **دقت بالا:** استفاده از مقدار Cut-off باعث افزایش دقت و قابل اعتماد بودن آزمون می‌شود. با تعیین مقداری واضح برای Cut-off، خطای تفسیر نتایج کاهش می‌یابد و نتایج قابل تفسیر تر می‌شوند.
- **انتخاب گروه هدف:** با استفاده از مقدار Cut-off، می‌توان گروه‌های مثبت و منفی را مشخص کرد. این امر امکان تحلیل و مقایسه گروه‌های مختلف را فراهم می‌کند و اطلاعات بیشتری در مورد ویژگی‌های مورد بررسی به دست می‌آورد.
- **تعیین حد مرز:** مقدار Cut-off می‌تواند حد مرزی را برای تصمیم‌گیری در مورد وجود یا عدم وجود مولکول‌های هدف در نمونه‌ها ارائه دهد. این حد مرز معمولاً بر اساس استانداردها و شرایط آزمون تعیین می‌شود و به عنوان یک معیار مقایسه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- **قابلیت تکرارپذیری:** با استفاده از مقدار Cut-off، می‌توان نتایج آزمون را بازتولید کرد و تکرارپذیری آزمون را بالا برد. این امر مهم است زیرا به اطمینان از صحت و قابل اعتماد بودن نتایج کمک می‌کند.

تفسیر نتایج کمی

Interpretation of Quantitative Result

تفسیر نتایج در تست های رقابتی (Competitive)

- ارتباط معکوس بین غلظت آنالیت مورد نظر و جذب نوری



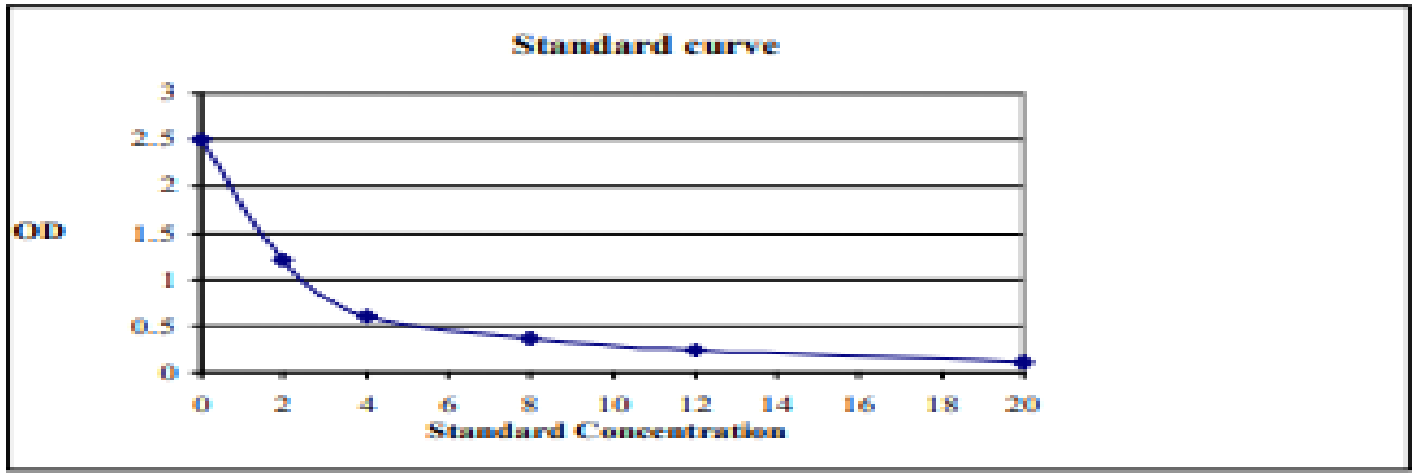
مثال هایی از تست های رقابتی

- T3
- T4
- Free T3& FT4
- 17 OH progesterone
- Testosterone
- Vitamines

تفسیر نتایج در تست های رقابتی (Competitive)

Table 1: Example of Standard Curve

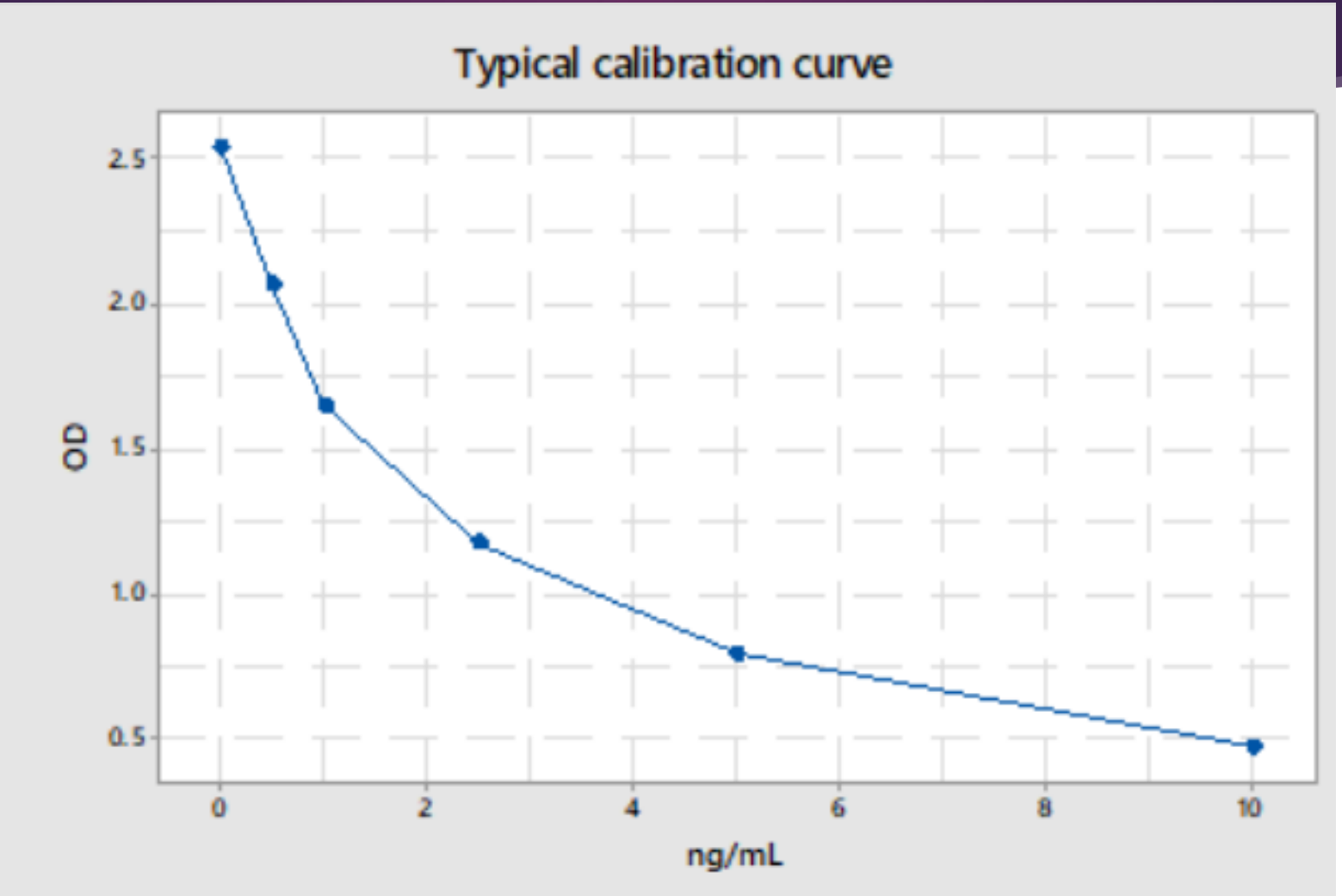
Standard Conc. (µg/dl)	Mean Absorbance (450/630 nm)
0	2.5
2	1.21
4	0.61
8	0.37
12	0.24
20	0.11



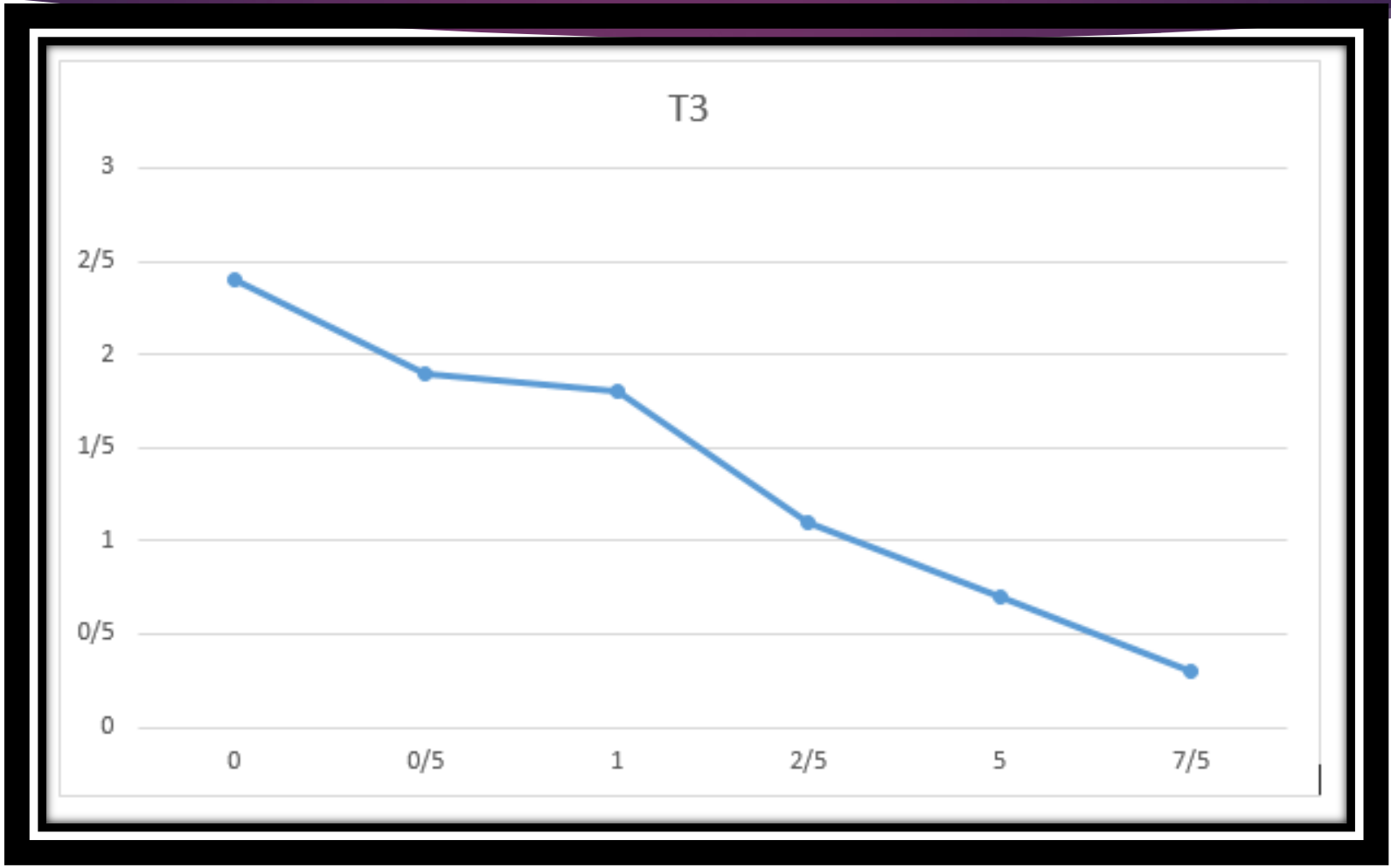
تفسیر نتایج

- شیب خط و شکل نمودار بسیار مهم (مطابق الگوی سرتیفیکیت کیت)
- مقادیر جذب نوری کالیبراتورها متاثر از:
- تاریخ کیت
- تعداد باز و بسته شدن و طریقه نگهداری و استفاده از کیت
- زمان انکوباسیون
- کیفیت شستشو
- دقت و مهارت فردی
- معیار های کیت مناسب

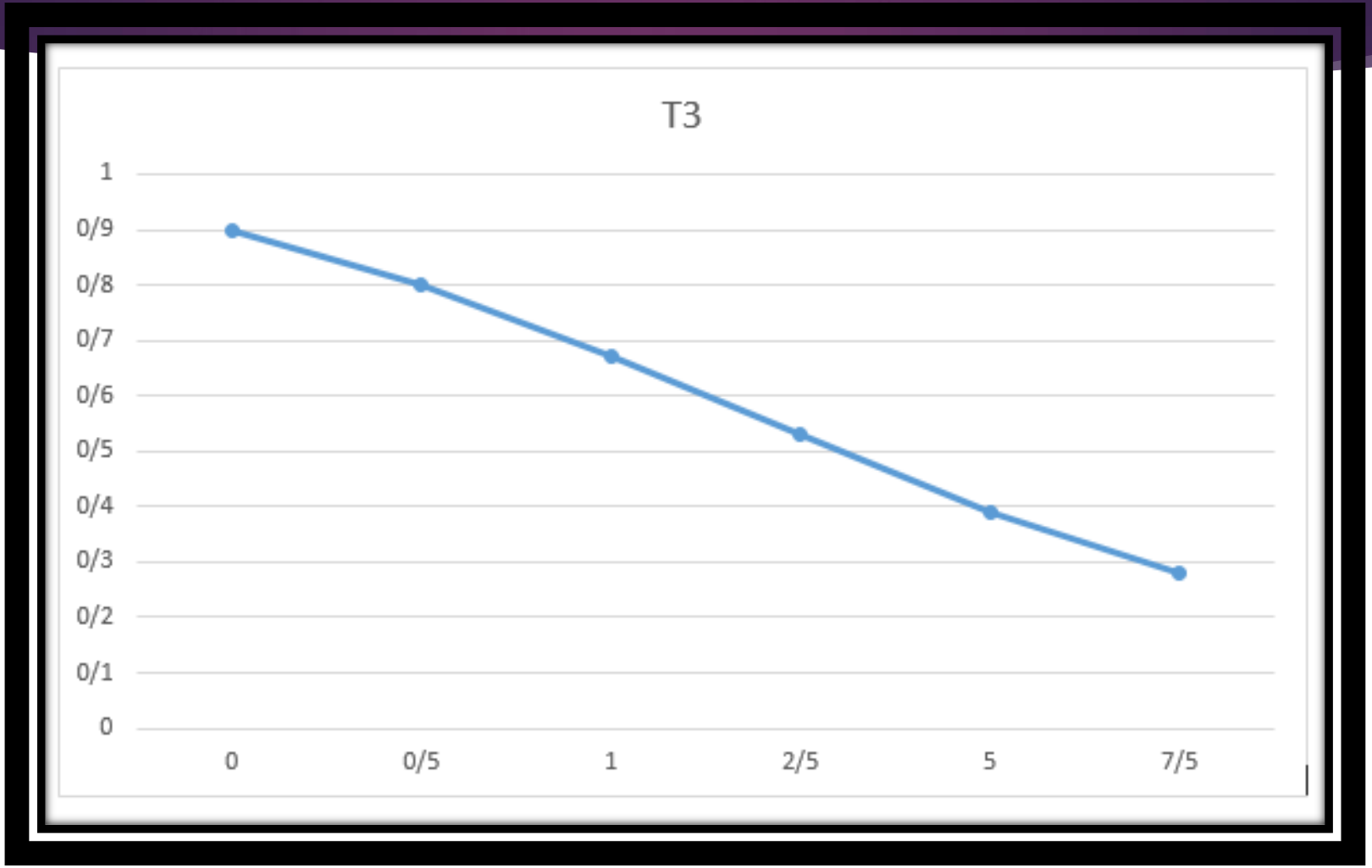
الگوی مناسب نمودار



داده های غیره منتظره در نمودار



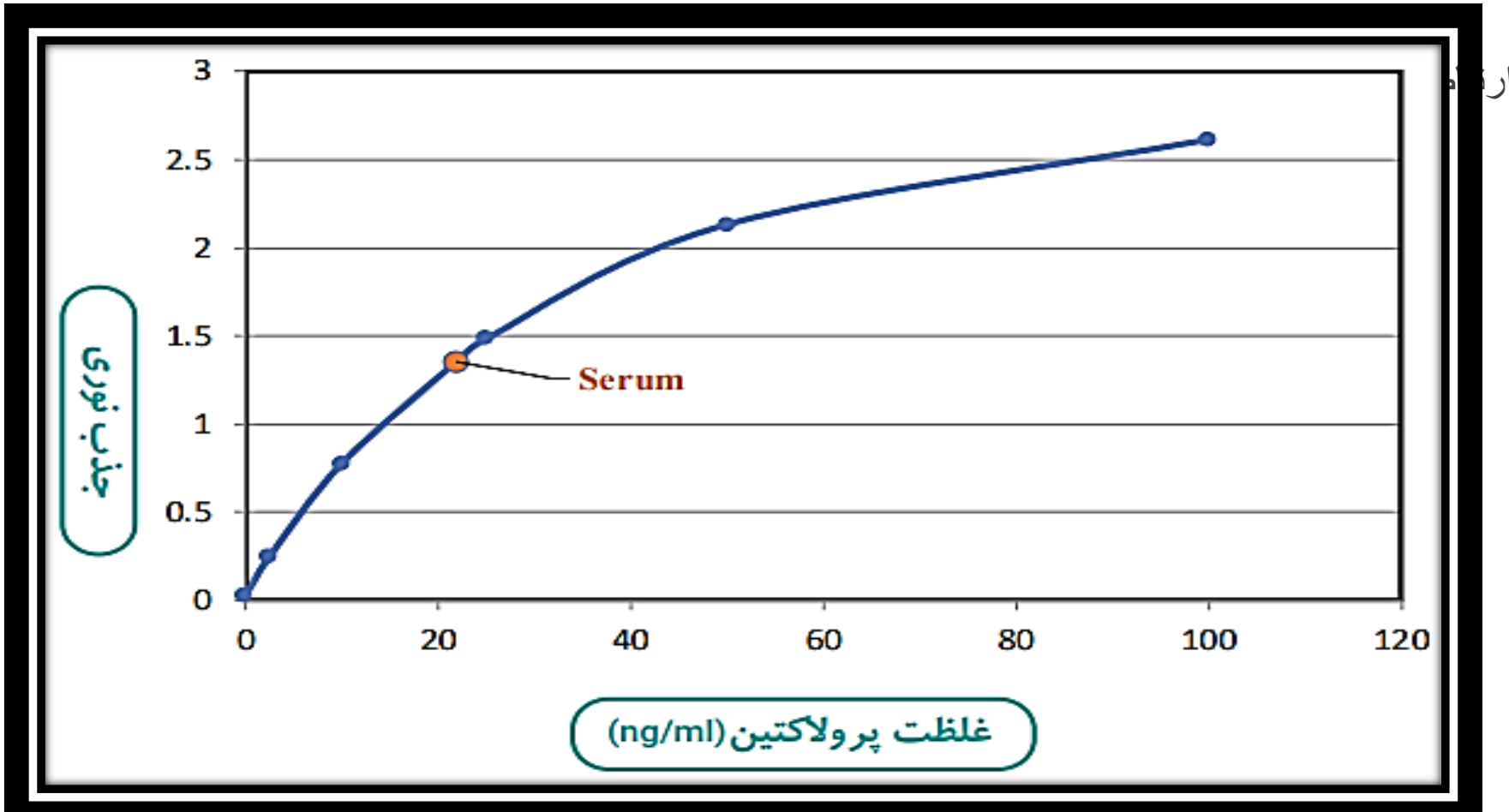
افت OD در تمام کالیبراتورها



ng New Curve			
-01	Standard 1	2.807	0.0
-01	Standard 2	1.253	2.5
-01	Standard 3	0.730	5.0
-01	Standard 4	0.358	10.0
-01	Standard 5	0.205	15.0
-01	Standard 6	0.086	25.0
-01	1	1.215	2.7
-01	2	0.208	14.9
-02	3	0.415	9.2
-02	4	0.417	9.2
-02	5	0.436	8.9
-02	6	0.329	10.9
-02	7	0.373	9.8
-02	8	0.417	9.2
-02	9	0.397	9.5
-02	10	0.451	8.7
-03	11	0.493	8.2
-03	12	0.278	12.6
-03	13	0.477	8.4
-03	14	0.981	3.8
-03	15	0.434	9.0
-03	16	0.444	8.8
-03	17	0.357	10.0
-03	18	0.445	8.8
-04	19	0.475	8.4
-04	20	0.578	7.0
-04	21	0.420	9.2
-04	22	0.415	9.2
-04	23	0.587	6.9
-04	24	0.557	7.3
-04	25	0.529	7.7
-04	26	0.466	8.5
-05	27	0.439	8.9
-05	28	0.482	8.3
-05	29	0.559	7.3
-05	30	0.404	9.4
-05	31	0.587	6.9
-05	32	0.370	9.8

تفسیر نتایج در تست های غیر رقابتی (Non-Competitive)

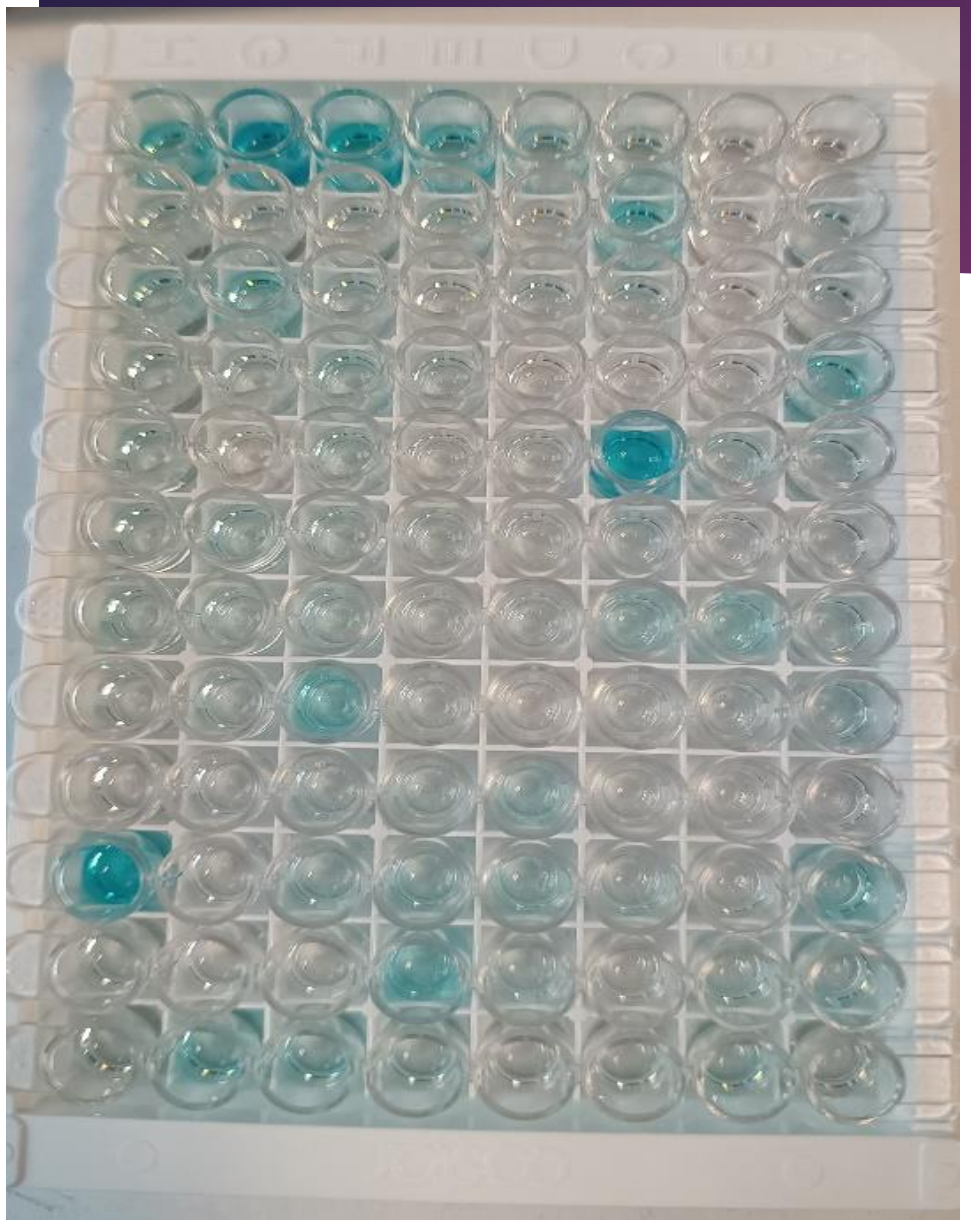
- ارتفاع



مثال هایی از تست های غیر رقابتی

- TSH
- LH,FSH,Prolactin
- Ferritin
- PSA
- Anti CCP
- AMH

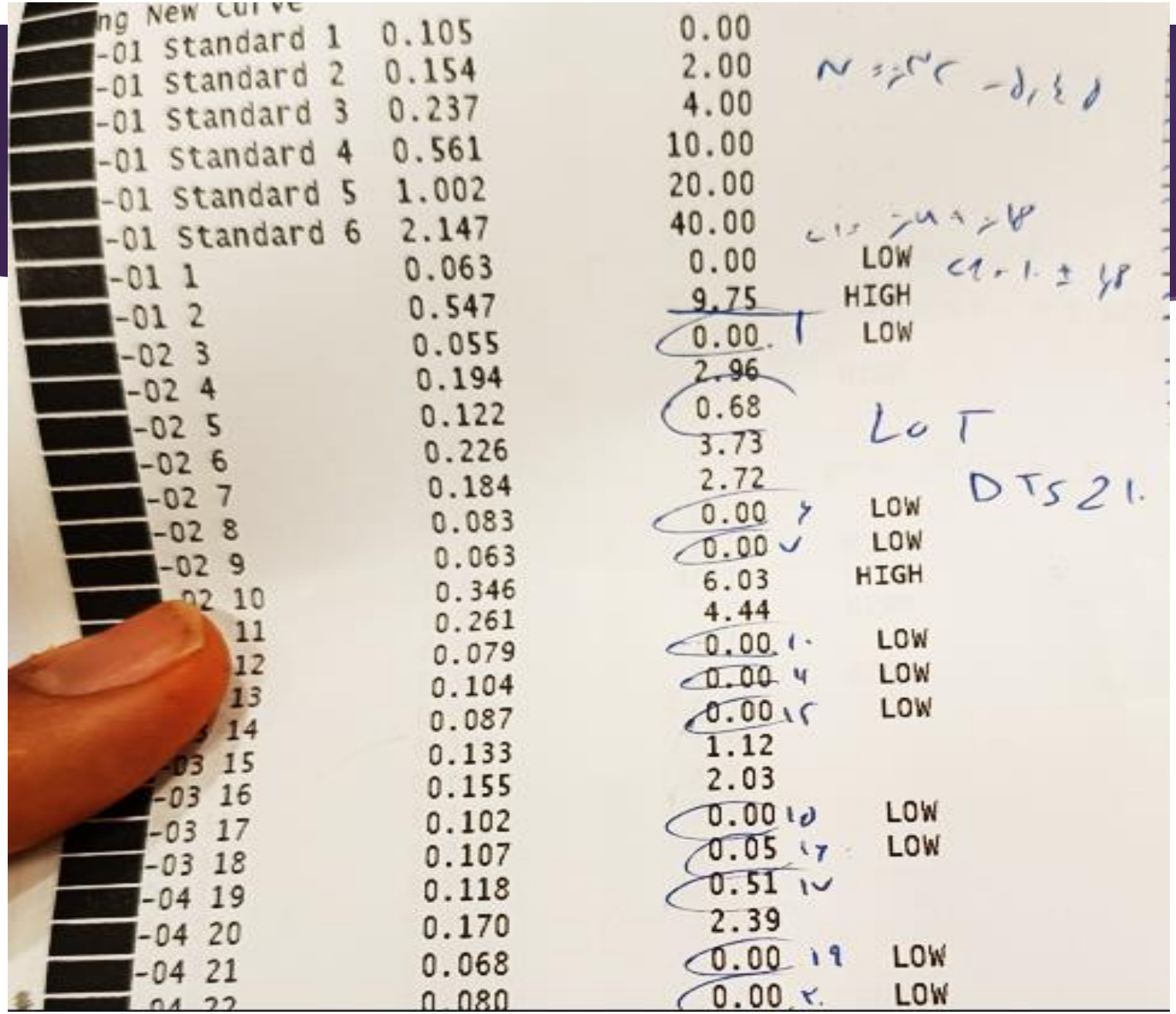
Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µIU/mL)
Cal. A	A1	0.011	0.013	0
	B1	0.014		
Cal. B	C1	0.058	0.06	0.5
	D1	0.062		
Cal. C	E1	0.343	0.349	2.5
	F1	0.354		
Cal. D	G1	0.644	0.633	5
	H1	0.621		
Cal. E	A2	1.191	1.177	10
	B2	1.163		
Cal. F	C2	2.591	2.552	25
	D2	2.513		



TSH
0/03
0/09
0/2
0/36
0/77
1/4
2/72
0
0
0
0
0
0
0
0
0/4
2
4
10
20
40

ng New Curve				
-01 Standard 1	0.028	0.00		
-01 Standard 2	0.087	0.40		
-01 Standard 3	0.204	2.00		
-01 Standard 4	0.361	4.00		
-01 Standard 5	0.770	10.00		
-01 Standard 6	1.401	20.00		
-01 Standard 7	2.724	40.00		
-01 1	0.076	0.32	HIGH	
-02 2	0.729	9.40	HIGH ٢٧٥١٧	
-02 3	0.555	6.85	HIGH ٢٧٠١٢	
-02 4	0.463	5.49		
-02 5	0.456	5.39	٢٨٢٨٢	
-02 6	0.340	3.73		
-02 7	0.206	2.03	HIGH	
-02 8	0.489	5.87		
-02 9	0.421	4.87		
-03 10	0.212	2.11	HIGH	
-03 11	0.546	6.71		
-03 12	0.213	2.12		
-03 13	0.191	1.83		
-03 14	0.256	2.66		

-05 31	0.080	0.35	
-05 32	0.115	0.79	
-05 33	0.105	0.65	
-06 34	0.182	1.70	
-06 35	0.173	1.59	
-06 36	0.269	2.83	
-06 37	0.236	2.41	
-06 38	0.527	6.43	HIGH
-06 39	0.192	1.83	
-06 40	0.122	0.88	
-06 41	0.106	0.66	
-07 42	0.270	2.85	
-07 43	0.105	0.65	
-07 44	0.042	0.09	LOW
-07 45	0.182	1.71	
-07 46	0.122	0.88	
-07 47	0.053	0.17	LOW
-07 48	0.270	2.85	
-07 49	0.167	1.50	
-08 50	2.751	40.41	HIGH
-08 51	0.115	0.79	
-08 52	0.151	1.28	
-08 53	0.192	1.84	
-08 54	0.119	0.84	



ng New Curve		0.00	
-01 Standard 1	0.105	2.00	
-01 Standard 2	0.154	4.00	
-01 Standard 3	0.237	10.00	
-01 Standard 4	0.561	20.00	
-01 Standard 5	1.002	40.00	
-01 Standard 6	2.147	0.00	LOW
-01 1	0.063	9.75	HIGH
-01 2	0.547	0.00	LOW
-02 3	0.055	2.96	
-02 4	0.194	0.68	
-02 5	0.122	3.73	
-02 6	0.226	2.72	
-02 7	0.184	0.00	LOW
-02 8	0.083	0.00	LOW
-02 9	0.063	6.03	HIGH
02 10	0.346	4.44	
11	0.261	0.00	LOW
12	0.079	0.00	LOW
13	0.104	0.00	LOW
14	0.087	1.12	
03 15	0.133	2.03	
-03 16	0.155	0.00	LOW
-03 17	0.102	0.05	LOW
-03 18	0.107	0.51	
-04 19	0.118	2.39	
-04 20	0.170	0.00	LOW
-04 21	0.068	0.00	LOW
04 22	0.080		

TSH (0.35-5.2)	OD		
St concentration	KIT 1	KIT 2	KIT 3
0.0	0.01	0.03	0.01
0.5	0.10	0.05	0.04
2.0	0.25	0.20	0.10
5.0	0.48	0.40	0.35
10.0	0.92	0.88	0.77
25	1.55	1.33	1.2
50	2.9	2.7	2.7

نگاهی به خطاهای رایج در تفسیر نتایج الایزا

حضور بک گراند و مقدار بالای کنترل منفی

- آلوده شدن چاهک های کنترل منفی
- آلوده بودن ویال کنترل منفی
- سر سمپلر مشترک
- شستشوی ناکافی و یا آلوده شدن کنترل منفی با آنزیم کونژوگه
- افزایش زمان مراحل انجام

دلایل گسترش رنگ با سرعت کم

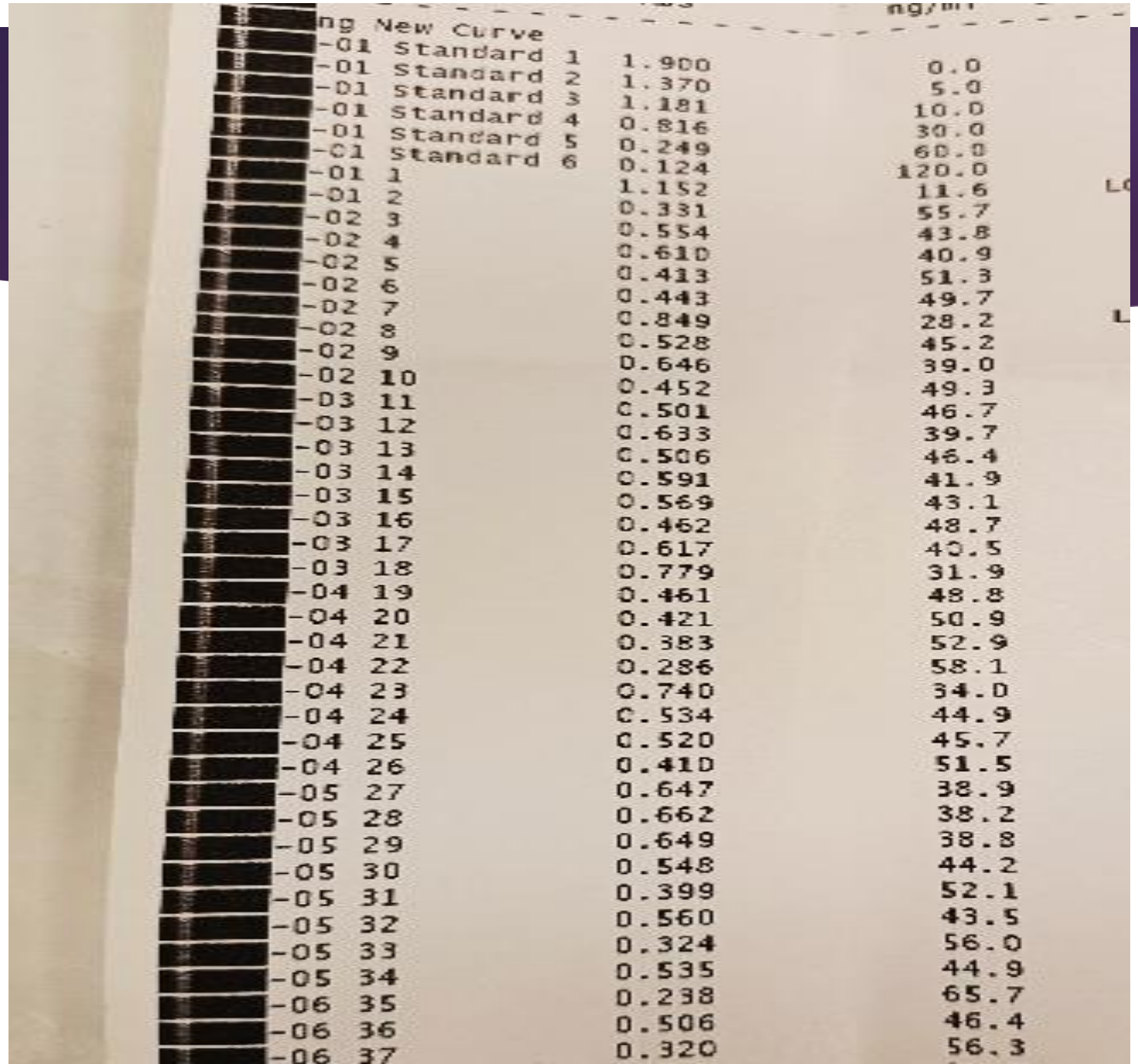
- نگهداری غیر صحیح معرف ها یا یخچال معیوب
- استفاده از کیت تاریخ گذشته
- آلودگی ظروف معرف ها یا آب مقطر به دترژنت، گندزداها یا مواد کثیف
- عدم تهیه درست معرف ها و یا حذف یک مرحله از رقیق سازی
- تغییرات در پروتکل پیشنهادی کیت
- خراب بودن دستگاه خوانش
- استفاده از طول موج نادرست در خوانش چاهک های الایزا در دستگاه الایزا ریدر
- کیفیت نامناسب محلول کروموژن – سوبسترا
- آلودگی سوبسترا به اسید و یا آلودگی کنترل مثبت
- دمای نامناسب در مدت انکوباسیون (دمای کم محیط)
- مقدار نمونه کمتر از مقدار مجاز
- کاهش فعالیت آنزیمی
- غلظت کم آنتی بادی نشاندار-کاهش غلظت آنتی بادی کوتینگ
- غیرفعال شدن آنزیم یا سوبسترا یا وجود مهارکننده در سنجش آنزیمی:
- خراب شدن زود هنگام معرف ها قبل از تاریخ انقضاء یا نگهداری نامناسب کیت

جذب زمینه ای بالا

- نقص در بهینه سازی یا طراحی کیت
- تغییر در ماتریکس کالیبراتورها
- اتصال ماده نشاندار به چاهک ها
- آلودگی با آنتی سرم در روش های رقابتی
- آلودگی با آنالیت
- درجه حرارت بالای انکوباسیون
- تفاوت پروتکل انجام آزمایش با بروشورکیت
- نقص در تهیه محلول شستشو
- تهیه نادرست رقت ماده نشاندار یا نمونه های سرم

رانش سنجش یا Drift

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



[redacted]	ng	New Curve			ng/ml
[redacted]	-01	Standard	1	1.900	0.0
[redacted]	-01	Standard	2	1.370	5.0
[redacted]	-01	Standard	3	1.181	10.0
[redacted]	-01	Standard	4	0.816	30.0
[redacted]	-01	Standard	5	0.249	60.0
[redacted]	-01	Standard	6	0.124	120.0
[redacted]	-01	1		1.152	11.6
[redacted]	-01	2		0.331	55.7
[redacted]	-02	3		0.554	43.8
[redacted]	-02	4		0.610	40.9
[redacted]	-02	5		0.413	51.3
[redacted]	-02	6		0.443	49.7
[redacted]	-02	7		0.849	28.2
[redacted]	-02	8		0.528	45.2
[redacted]	-02	9		0.646	39.0
[redacted]	-02	10		0.452	49.3
[redacted]	-03	11		0.501	46.7
[redacted]	-03	12		0.633	39.7
[redacted]	-03	13		0.506	46.4
[redacted]	-03	14		0.591	41.9
[redacted]	-03	15		0.569	43.1
[redacted]	-03	16		0.462	48.7
[redacted]	-03	17		0.617	40.5
[redacted]	-03	18		0.779	31.9
[redacted]	-04	19		0.461	48.8
[redacted]	-04	20		0.421	50.9
[redacted]	-04	21		0.383	52.9
[redacted]	-04	22		0.286	58.1
[redacted]	-04	23		0.740	34.0
[redacted]	-04	24		0.534	44.9
[redacted]	-04	25		0.520	45.7
[redacted]	-04	26		0.410	51.5
[redacted]	-05	27		0.647	38.9
[redacted]	-05	28		0.662	38.2
[redacted]	-05	29		0.649	38.8
[redacted]	-05	30		0.548	44.2
[redacted]	-05	31		0.399	52.1
[redacted]	-05	32		0.560	43.5
[redacted]	-05	33		0.324	56.0
[redacted]	-05	34		0.535	44.9
[redacted]	-06	35		0.238	65.7
[redacted]	-06	36		0.506	46.4
[redacted]	-06	37		0.320	56.3

علل رانش سنجش

- عدم آماده بودن معرف های کیت از نظر درجه حرارت سنجش قبل از استفاده
- مخلوط نشدن مناسب معرف ها
- پایین بودن درجه حرارت انکوباسیون
- نقص در پی پت ها سمپلرها و دیس پنسرها
- استفاده از انکوباتور خشک به جای انکوباتور مرطوب
- نقص در محلول یا دستگاه شستشو
- نقص در بهینه سازی یا طراحی کیت
- نقص در ساخت معرف ها
- ناهمگونی بین چاهک ها
- سنجش تعداد زیادی چاهک در یک سری آزمایش
- افزایش طول زمان اضافه کردن نمونه ها
- افزایش زمان اضافه کردن معرف ها
- واکنش کند یا سریع محلول متوقف کننده
- تغییر در پروتکل انجام آزمایش

همبستگی ضعیف بین دو کیت

- عدم استاندارد کردن مناسب کیت در زمان طراحی
- ناپایداری در استانداردهای مرجع سازنده کیت
- خطا در منحنی کالیبراسیون ذخیره شده یا در منحنی کالیبراسیون سازنده کیت
- استفاده از آنتی بادی هائی با ویژگی متفاوت در هرسری ساخت
- استفاده از نمونه های کهنه و مانده
- انتخاب محدوده کوچکی از غلظت برای تست همبستگی
- استفاده از تعداد معدود نمونه
- نقص در وسایل نظیر سمپلر

Interferences **تداخلات**

شناسایی وجود تداخل در نتایج یک کیت

- استفاده از کنترلهای دلتا
- عدم تطابق نتایج بیمار با شرایط بالینی بیمار
- مقایسه شرایط وابسته فیزیولوژیکی
- نتایج کاملاً غیر منطقی
- بدست آمدن نتایج مختلف با روشهای مختلف آنالیز

عواملی که باعث ایجاد تداخل در آزمایشات می گردند را می توان در گروههای مختلف جای داد

- متغیرهای پیش آنالیزی Preanalytical variables
- اثرات ماتریکس Matrix effect