دستورالعمل تست الایزا ریدر

گردآوری شده توسط : *گروه تحقیقاتی آزمایشگاه نیلو*

آخرین به روز رسانی: *1397/08/29*



1- هدف
هدف از تدوین این دستورالعمل، تشریح روند انجام کار و کنترل کیفی دستگاه الایزا ریدر می باشد.
2- دامنه کاربرد
این دستورالعمل در بخش هورمون شناسی كاربرد دارد.
3- مسؤلیت اجرا
مسؤلیت اجرای این روش اجرایی با کارمندان فنی بخش هورمون شناسی و مسئول تضمین کیفیت می باشد.
4- تعاریف
ندارد
5- شرح اقدامات
اصول:
روشهای ایمنواسی:
در مواردیکه واکنش آنتی ژن – آنتی بادی قابل رویت نباشد باید به نحوی این واکنشها آشکار شود که این امر منجر به پدید آمدن نسل جدیدی از روشها به نام labeled Immunoassay شد. در این واکنشها آنتی بادی یا آنتی ژن توسط موادی نشاندار می شود
- رادیوایمنواسی: سنجش ایمنی آنتی بادی یا آنتی ژن با استفاده از مواد رادیوایزوتوپ نشاندار می گردد.
Radio Immunoassay (RIA): آنتی ژن نشاندار شده است.
Immunoradiometric Assay (IRMA): آنتی بادی نشاندار شده است.
- آنزیم ایمنواسی: برای نشاندار کردن از یک آنزیم استفاده می شود.
Enzyme Immunoassay (EIA): آنتی ژن نشاندار شده است.
Immunoenzymometric Assay (IEMA): آنتی بادی نشاندار شده است.
الایزا (ELISA) نام عمومی برای اینگونه روشهاست که بصورت رایج استفاده می شود و به عبارتی ارزیابی های سنجش ایمنی آنزیمی که در آنها آنتی بادی یا آنتی ژن بر روی یک فاز جامد Coat می شود به نام الایزا شناخته شده است.

اساس واکنش:
الایزای غیر مستقیم :
برای تعیین آنتی بادی اختصاصی و یا تیتراسیون آنتی بادی در نمونه های سرمی استفاده می شود.
در واکنش این سیستم آنتی ژن به جدار چاهک ها (از جنس پلی استیرن) متصل شده (کوت می شود). سپس نمونه حاوی آنتی بادی به چاهک ها اضافه می شود. پس از افزودن نمونه و طی زمان انکوباسیون شستشو انجام شده و سپس آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می شود. (بر حسب اینکه چه کلاسی از آنتی بادی برای اندازه گیری اهمیت دارد نوع آنتی هیومن مورد استفاده نیز متفاوت است مثلأ برای IgG از آنتی هیومن IgG استفاده می شود).
اختصاصیت روش بستگی به آنتی ژن کوت شده در چاهک ها دارد.
برای جلوگیری از جذب غیر اختصاصی پروتئین های موجود در سرم و جلوگیری از اشغال نقاط اتصال آنتی ژن نمونه بوسیله بافر رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) رقیق شود.

الایزای ساندویچ:
این روش خود به دو دسته تقسیم می شود:

الف) روش Ag Capture یا Ab Sandwich
شایعترین روش الایزا بوده و یک آنتی ژن (که باید دو ناحیه آنتی ژنیک متفاوت داشته باشد مثل TSH, LH, FSH, PSA و hCG) بین دو آنتی بادی اختصاصی قرار می گیرد. یک آنتی بادی برای به دام انداختن آنتی ژن به چاهک کوت می شود و آنتی بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده است به عنوان شناساگر عمل می کند.

ب) روش Antibody Capture
این روش خود به دو دسته تقسیم می شود

1) روش Direct Ab Capture یا Ag Sandwich
در این روش از آنتی ژن کوت شده برای به دام انداختن یک آنتی بادی اختصاصی استفاده می شود. سپس آنتی ژن نشاندار به آنزیم به محیط اضافه شده و از طریق بازوی دیگر آنتی بادی (Fab) به آن متصل می شود. در نتیجه آنتی بادی اختصاصی در بین دو آنتی ژن ساندویچ می شود (مثل کیت HBs Ab).

1) روش Indirect Ab Capture یا Indirect Ag Sandwich
آنتی هیومن گلوبولین به چاهک کوت شده و با اضافه کردن نمونه آنتی بادی به دام می افتد و سپس با اضافه کردن آنتی ژن اختصاصی به محیط یک کمپلکس ایمنی تشکیل می شود. سپس آنتی بادی اختصاصی نشاندار بر علیه آنتی ژن به عنوان سیستم شناساگر استفاده می شود.

الایزای رقابتی یا مهاری:
در روش های فوق اساس سنجش بر رقابت بین دو آنتی بادی یا دو آنتی ژن (که یکی نشاندار است) است.
روش رقابتی: هر دو آنالیت نشاندار و غیر نشاندار با هم به سیستم اضافه می شود.
روش مهاری یا بلاکینگ: ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه می گردد.

الف) الایزای رقابتی یا مهاری برای آنتی ژن:
آنتی ژن نشاندار و آنتی ژن موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی بادی اختصاصی کوت شده در چاهک با هم رقابت کرده. منحنی این روش به صورت معکوس است، بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور مقادیر زیاد آنالیت غیرنشاندار موجود در نمونه کمتر به آنتی بادی متصل می شود. روش کمی لومینسانس استفاده می شود.

ب) الایزای رقابتی یا مهاری برای آنتی ژن:
آنتی بادی نشاندار و آنتی بادی موجود در نمونه برای اتصال به یک آنتی ژن کوت شده در چاهک با هم رقابت کرده. منحنی این روش به صورت معکوس است، بدین معنی که آنالیت نشاندار در حضور مقادیر زیاد آنالیت غیرنشاندار موجود در نمونه کمتر به آنتی بادی متصل می شود. شاخصترین مثال برای این روش تست HBc Ab می باشد.

این دستگاه قادر به خواندن مونو کروماتیک یا بیکرو ماتیک پلیتها با 4 فیلتر 405/450/492/630 نانومتر می باشد. مزیت خوانش در سیستم های دو موج آن است که از مزیت تصحیح جذب نوری برخوردارند و در آنها نقصهای ناشی از سیستم نوری، تغییرات چاهک به چاهک و حجم نهایی چاهکها بطور اتوماتیک بر طرف می گردد. به این فیلتر فیلتر افتراقی (Differential Filters) صورت می گیرد.
در دستگاههای خوانشگر انتخاب طول موج توسط فیلترها و یا گریدها (ساختارهای خاصی هستند که با تابیده شدن نور به آنها، تنها نور با طول موج خاصی از آنها ساطع می شود).
- این دستگاه تمامی میکرو پلیتهای استاندارد با چاهکهای ته گرد و صاف را می پذیرد همچنین این دستگاه توانایی قرائت پلیت را در جهت ((1-12و (A-H) داراست وپس از قرائت پلیت نتایج را به پرینتر جهت چاپ ارسال می نماید.
- این دستگاه قادر است تا نمونه بیماران رابه طریق مختلف قرائت نماید جهت سهولت در کاربری و کاهش خطا این برنامه در حافظه دستگاه ثبت شده که توسط کلیدهایی که بر روی صفحه کلید وجود دارد دسترسی به این برنامه امکانپذیر میشود.

روش قرائت دستگاه به قرار زیر میباشند.
1- Absorbance mode (ABS KEY)
2- Single Calibrator Mode (STAND KEY)
3- Cut Off Mode(C.OFF KEY)
4- %Absorbance Multi – Point Mode (%ABS KEY)
5- Point –to-point mode(PGM KEY)
6- Best Fit By Polynomial Regression(POLY KEY)
7- Best Fit By Linear Regression(REGR KEY)

- برنامه های از پیش ذخیره شده می توانند توسط کاربر با استفاده از فهرست آزمایشات در هر لحظه در خواست شود.
- دستگاه موجود این بخش جهت قرائت کیت در جهت A-H تنظیم شده است که جهت تغییر آن می تواند از کلید 8×12 موجود در صفحه کلید استفاده نمایید.

جهت استفاده ازبرنامه Point To poit mode(PGM KEY):
ابتدا کلید شماره 5 (PGM) را فشار می دهید بر روی صفحه فیلترهای متفاوت ظاهر می شود بنا بر نوع تست فیلتر مناسب را انتخاب کرده و کلید Enter را فشار می دهید سپس برای گزینه بلانک بنا بر نوع آزمایش کلید 1(yes)یا کلید 0( NO) را انتخاب کنید سپس تعداد کالیبراتورها و ارزش هر یک را وارد کرده و کلید Enterرا فشار دهید.
چنانچه کالیبراتورها و نمونه ها بصورت تکی یا دوگانه استفاده شده باشند بااستفاده از کلید شماره 0و1انتخاب صحیح را انجام داده در اخر کلید Read را فشار دهید.برای مشخص شدن موقعیت اخرین چاهک از کلید9 استفاده می کنیم ممکن است در هنگام کار با دستگاه Stat Fax 2100 پیامهای خطائی بر روی صفحه نمایش دستگاه ظاهر شود.برای چگونگی رفع این خطا به کتابچه دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید.

چکهای مورد لزوم:
جهت کنترل عملکرد لامپ دستگاه و فیلترها بایستی به طریق زیر عمل نماییم.چنانچه هر بخشی از این دستورالعمل معرف نا مناسب بودن عملکرد دستگاه باشد از کار بادستگاه خودداری کرده و با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.به این منظور به طور دوره ای (هر 2 هفته یکبار)کلید (Self CK) را فشار دهید به این ترتیب دستگاه بطور اتوماتیک شدت نور خروجی چرخش فیلترها حرکت X-Y حمل کننده پلیت صفحه نمایشگر Alphanumeric display)) و پرینتر را چک کرده و نتیجه را نمایش می دهد.پیغامهای زیر مشاهده خواهد شد:
Lamp out ok or Lamp out put low
Photometer operation ok
Plate transporter ok
Mechanism failure

پس ازپایان یافتن چک دستگاه پرینتر نتایج را ثبت می کند پیغام System Check Ok معرف ان است که دستگاه اماده استفاده می باشد.کنترل دستگاه به طریق مذکور هم بایستی بطور دوره ای هم به هنگام بازگشت دستگاه از سرویس انجام شود.چنانچه اخطاری مشاهده شد به دفترچه راهنما دستگاه قسمت 2.4.5 Flags and Error messages مراجعه و یا با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.
کنترل خطی بودن (Linearity)
علاوه بر موارد ذکر شده خطی بودن (Linearity) دستگاه نیز بایستی بطور ماهیانه مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از این آزمون تعیین قابلیت دستگاه در تبعیت از قانون بیر (Beer's Law) می باشد که طبق این قانون غلظت محلول نسبت مستقیم با مقدار نور جذب شده دارد. توجه شود که کنترل خطی بودن در دستگاه الایزا یک پارامتر مهم در کارایی دستگاه فوق می باشد چرا که کنترل صحت فتومتریک تا حدود زیادی با گذاشتن استانداردهای مختلف در هر run کاری قابل کنترل می باشد اما اگر خطی بودن دستگاه دچار اشکال باشد تفاوتهای فاحشی در جوابها حاصل می شود. فقدان Linearity در غلظت های بالا معمولأ نشان دهنده وجود نورهای ناخواسته (stray light) میباشد که می تواند بعلت زوال فیلترها باشد . جهت چک linearity دستگاه ابتدا باید یک محلول با حداکثر جذب نوری در طول موج 450 نانومتر یا نزدیک به ان انتخاب نموده (محلول اسید پیکریک پیشنهاد می شود ) ودر تمام چاهکهای پلیت بریزید و پلیت را در طول موج 450 نانومتر قرائت نمایید. نتیجه جذب نوری تمام چاهکها در صورت سالم بودن فیلتر بایستی >3.0 باشد سپس یکبار دیگر بدون پلیت جذب نوری را قرائت می کنیم در چنین شرایطی باید جذب نوری برای تمام چاهک ها بین ±0.01باشد .در صورتی که نتایج بالا حاصل نشد با شرکت پشتیبان تماس بگیرید.
روش دیگر:
در بررسی خطی بودن دستگاه مقدار محتویات داخل well ها حتمأ باید یکسان باشد (چون مسیر نوری path lenth چاهک های مختلف باید حتمأ یکسان باشد).
ابتدا معرف دی کرومات پتاسیم (1/3 گرم دی کرومات پتاسیم را در 800 میلی لیتر آب مقطر حل کرده ، سپس 3/3 گرم پتاس به آن اضافه می کنیم و حجم را به یک لیتر می رسانیم) یک رقت سریال تهیه کرده (به نسبت 2/1 ، 4/1 ، 8/1) و سپس با یک سمپلر 200 λ کالیبره شده ، 200 λ از هر رقت (از رقیق نشده هم بعنوان رقت 1/1) به 3 چاهک به طور متوالی اضافه می کنیم (از هر رقت در سه چاهک ریخته می شود) سپس در Absorbance Mode ، با فیلتر اولیه 450 nm و فیلتر افتراقی 630 nm جذب آنها خوانده شده و با مقادیر مورد انتظار بدست آمده از میانگین جذب نوری 3 چاهک اول (که مستقیمأ از خوانش ODمعرف اصلی بدست می آید) مورد مقایسه قرار می دهیم.
برای بدست آوردن محدوده مورد انتظار (Expected value) در هر رقتی ابتدا میانگین جذب نوری بدست آمده برای محلولی اصلی را به عنوان عدد پایه در نظر می گیریم وسپس برای رقت های مختلف ضربدر ضریب رقت می نمائیم.
برای بدست آوردن محدوده مورد نظر در هر رقت از فرمول ذیل استفاده می کنیم:
Expected value ± (1% of the expected value + 0.01A)
به طور مثال اگر رقت 4/1 عدد مورد انتظار 0.438 باشد محدوده قابل قبول به صورت ذیل محاسبه می شود:
0.438 ± (0.01 x 0.438 +0.01) = 0.438 ± 0.015
در نتیجه محدوده قابل قبول برای رقت 4/1 ، 0.424 – 0.454 می باشد.

TEST 186
همچنین جهت چک فیلترها می توانیم از برنامه Test # 186استفاده کنیم چنانچه عدد بدست آمده بین 2-10 باشد عملکرد فیلترها مناسب است در غیر اینصورت دستگاه را برای سرویس به شرکت پشتیبان ارسال نمایید. برای انجام تست ابتدا دستگاه را روشن کرده و 15 دقیقه می گذاریم تا گرم شود و سپس بعد از ظاهر شدن کلمه selection mode ، دکمه Test را زده و سپس عدد 186 را وارد کرده و Enter می کنیم. بعد از چند ثانیه چهار عدد برای فیلترهای 0, 1, 2, 3 ظاهر می شود که اگر این اعداد بین 10-2 باشد نسان دهنده سلامت فیلترها می باشد (در فیلترهای نو این عدد به 10 نزدیکتر است و در فیلترهای کهنه به 2 نزدیکتر است).

کنترل صحت فتومتری:
آزمون صحت فتومتری برای بررسی این مسئله که آیا حداکثر جذب نوری به مقدار مشخص در طول موج خاصی صورت می گیرد ، به عبارت دیگر هدف تعیین تفاوت جذب واقعی با جذب مشاهده شده می باشد. صحت فتومتری به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش فتوالکتریک ، نوع و کیفیت منوکروماتور (تک رنگ کننده) بستگی دارد.
برای بررسی صحت فتومتریک از محلول رنگزای قلیائی دی کرومات پتاسیم (40 میلی گرم دی کرومات پتاسیم را در 800

میلی لیتر آب مقطر حل کرده ، سپس 3/3 گرم پتاس به آن اضافه می کنیم و حجم را به یک لیتر می رسانیم ) استفاده می کنیم. با یک سمپلر 200 λ (که به دقت کنترل کیفی شده و CV آن زیر 3% می باشد) مستقیمأ از معرف فوق به داخل 5 چاهک ریخته و در Absorption Mode با فیلتر اولیه 405 nm و فیلتر افتراقی 630 nm جذب آنرا می خوانیم و سپس میانگین آنرا محاسبه می نمائیم. عدد به دست آمده باید در محدوده 0.235 ±0.040 یا 0.195 – 0.275 قرار گیرد.

کنترل تکرارپذیری:
برای پی بردن به وجود هر گونه اختلال در کثیف بودن حس گرها ، لنزهای دستگاه و کالیبراسیون نامناسب یک یا چند کانال دستگاه و یا ناپایداری لامپ دستگاه می باشد. که در این حالت حداقل 8 بار خوانش OD در غلظت های مختلف انجام شود و سپس CV (Coefficient Variation) آنرا محاسبه کرده (کمتر از 3 درصد قابل قبول است).
برای انجام این کنترل ابتدا یک رقت 2/1 از معرف تهیه شده برای کنترل خطی بودن تهیه کرده و سپس از معرف اصلی و معرف رقیق شده 200λ به 8 چاهک اضافه کرده و در Absorption Mode با فیلتر اولیه 405 nm و فیلتر افتراقی 630 nm جذب آنرا می خوانیم و سپس میانگین ،انحراف معیار((SD و ضریب تغییرات آنرا محاسبه می نمائیم.
روش کار:
- دگمه Power را روشن کرده تا جمله Select Mode بیاید.
- دگمه Poly را فشار داده و طول موجهای مورد نظر را انتخاب می کنیم(2 Enter برای طول موج 405 نانومتر و 4 Enter برای طول موج 490نانومتر )
- سپس تعداداستانداردها را وارد کرده و Enter می کنیم.
- دو بار پشت سر هم Enter می کنیم.
- مقادیر استانداردها را وارد کرده و بعد از هر کدام Enter می کنیم.
- سپس می پرسد استانداردها و تستها را Duplicate می باشد و یا خیر که دگمه No را می زنیم بعد دوباره Enter می زنیم و سپس دگمه Read را می زنیم.
- اگر در حافظه برنامه مورد نظر را داشتیم دگمه A را زده شماره برنامه را Enter می کنیم و دگمه Read را می زنیم.
- بعد از خواندن پلیت هم دستگاه و هم پرینتر را خاموش می کنیم.

کنترل کالیبراسیون دستگاه الایزا ریدر
1- یک محلول رنگی را به مقدار یکسان در چاهک ها ریخته و جذب نوری آنها را قرائت کنید. سپس پلیت ها را بیرون آورده و مجددأ 180 درجه بچرخانید و دوباره جذب نوری آن را قرائت کنید. چنانچه در هر دو حالت جذب نوریها یکسان بود، دستگاه کالیبره می باشد.
2- جهت بررسی کالیبره بودن موتوری که پلیت را جابجا می کند، می توان از یک پلیت خالی استفاده نمود. در این حالت چنانچه بین جذب نوری خوانده شده برای ستون اول با ستون آخر اختلاف معنی داری وجود نداشت می توان به سالم بودن و کالیبره بودن موتور پی برد.

منابع خطا در تست های الایزا :
1- عدم رعایت روش ذکر شده در بروشور (کمپانی سازنده می تواند بدون اطلاع قبلی روش کار خود را عوض کند).
2- باز کردن فویل حاوی پلیت (بلافاصله بعد از آنکه از یخچال خارج شد): پلیت سرد بخار آب موجود در هوا را به قطرات کوچکی تبدیل می کند که روی جدارهای چاهکها خواهد نشست. این عمل سبب می شود که در برخی تست ها که حجم نمونه کم است (مثلأ 10 میکرولیتر) سبب رقیق شدن نمونه شود.
3- در هنگام باز کردن فویل حاوی پلیت به کپسول نم گیر موجود در آن دقت شود. اگر پوشش فوق سوراخ باشد کپسول نم گیر می تواند یا تغییر رنگ دهد و یا سیلیکاژل موجود در آن به هم بچسبد.
4- دقت شود که در تست مورد نظر همولیز تأثیر می گذارد؟
هموگلوبین به دلیل ماهیت پروتئینی ، فعالیت پراکسیدازی داشته و همچنین به دلیل وجود آهن و هم می تواند سرعت واکنش پراکسید هیدروژن و کروموژن را تسریع و بطور کاذب باعث افزایش جذب نوری شود. از طرفی هموگلوبین واکنش آنتی ژن و آنتی بادی را دستخوش تغییر می کند و زمان به تعادل رسیدن واکنش را افزایش می دهد (مثل Free T4 که به طور کاذب کاهش می یابد).
5- آیا مجاز به استفاده از پلاسما می باشیم و در صورت استفاده از پلاسما آیا ضد انقعاد خاصی مورد نیاز است؟
در این موارد باید به بروشور کیت مراجعه شود و با دقت بررسی شود تا نوع نمونه توصیه شده بررسی شود. چه نوع پلاسما و ضدانعقاد می توان برای بدست آوردن پلاسما استفاده کرد. پلاسمایی که از سیترات سدیم تهیه شده به دلیل رقیق شدن پلاسما مناسب نمی باشد.
ضد انعقاد EDTA به عنوان یک شلاته کننده یونهای فلزی می تواند روی (Zn) که به عنوان کوفاکتور آنزیم آلکالین فسفاتاز را مهار می کند.
فلوئور سدیم که به عنوان نگهدارنده قند استفاده می شود می تواند فعالیت آنزیم اوره آز را مهار می کند بنابراین در سنجش هایی که از آنزیم اوره آز به عنوان ماده نشانگر استفاده شده است تداخل می کند.
سدیم آزاید به عنوان به عنوان یک مهار کننده قوی آنزیم پراکسیداز است و هرگز نباید در سنجش هیی که نشانگر آنزیمی آنها پراکسیداز است از نمونه حاوی سدیم آزاید استفاده شود.
6- پلیت ها در هنگام رنگزایی باید در دمای 25- 18 درجه سانتی گراد قرار گرفته و در معرض باد سرد و گرم نباشند چرا که دمای محیط می تواند سرعت واکنش رنگزایی را تغییر داده و در نتیجه منجر به رنگزایی کم یا زیاد شده و با بی اعتبار کردن کنترل مثبت و منفی کل کار انجام شده را بی اعتبار (Invalid) می کنند.
7- خطای در زمان انکوباسیون (خطای زمانی در انکوباسیون های کوتاه مدت بیشتر می باشد). در مرحله انکوباسیون TMB (Tetramethylbenzidine) - که همان سوبسترا بوده و در اثر آنزیم به یک محصول رنگی تبدیل می شود- به هیچ وجه از فویل آلومینیومی برای پوشاندن سطح پلیت استفاده نشود.
8- رعایت زمان خیس خوردن (Soak Time) سبب می شود که اتصالات غیر اختصاصی از چاهکها کنده شود. عدم رعایت این موضوع موجب ایجاد یک رنگ زمینه در کل چاهکهای پلیت کاری خواهد شد و اگر تست فاقد چاهک بلانک باشد این موضوع منجر به ایجاد جوابهای کاذبی می شود. این زمان در کیت آمده است و بین 30 ثانیه تا چند دقیقه متغیر است.
9- بعد از خواندن OD پلیت ها اگر OD چاهکی بالا باشد بهتر است به رنگ چاهک دقت شود و اگر رنگ چاهک پررنگ نباشد ممکن است ناشی از چسبیدن یک ماده کدر مثل پودر دستکش جراحی در پشت پلیت باشد که در نتیجه باید با یک پارچه بدون پرز پشت پلیت پاک شود.
10- در بین مراحل سنجش نباید وقفه بیافتد چرا که ممکن است منجر به تبخیر محتویات چاهک ها شود.
11- مشکلات مرتبط به شستشو: عمل شستشو جهت جدا کردن ترکیبات اتصال یافته به کف چاهک از ترکیباتی که متصل نشده اند صورت می گیرد. غیر از ترکیبات محلول شستشو نکات دیگری نیز باید مدنظر قرار گیرد. مشکلات مربوط به شستشو به سختی قابل تشخیص بوده و به صورت اتفاقی با خوانده هایی که خیلی بالا و یا پایین باشد مشخص می شوند. رفع این مشکل کالیبره کردن مجدد دستگاه شوینده است. محلول شستشو معمولأ غلیظ تر بوده و باید در آزمایشگاه رقیق شود. اگر رقت درست صورت نگیرد و محلول غلیظ تر از حد توصیه شده باشد منجر به تخریب و جدا شدن مولولکولهای اتصال یافته می شود و بر عکس کاهش توانایی محلول شستشو بدلیل رقیق سازی زیاد باعث عدم جدا شدن اتصالات غیر اختصاصی و ایجاد جذب زمینه ای بالا می شود. مرحله شستشو حداقل باید سه بار انجام شود و محلول اضافی باید تخلیه شده و یا آسپیره گردد. در نهایت باید محلول اضافه داخل چاهک با کوبیدن بر سطح یک کاغذ یا دستمال نم گیر خالی شود. اگر محلول شستشو واجد حباب باشد از وارد شدن آن به داخل چاهک ها جلوگیری شود چرا که این حباب سطح تماس محلول واش را با چاهک کم کرده و اثرات شستشو را کاهش می دهد. pH آب مقطری که برای محلول شستشو استفاده می شود اگر بیش از حد اسیدی و یا قلیایی باشد می تواند برروی اتصالات آنتی ژن – آنتی بادی اثر گذاشته و روی سنجش تاثیر بگذارد.
12- در مورد شستشوی اتوماتیک با دستگاه واشر دقت شود که سرعت ریختن محلول و آسپیراسیون محلول تنظیم باشد.
13- لیپمی در سنجش آنالیت هایی که یک مولکول آب گریز است بدلیل آنکه توزیع آنالیت بین دو فاز آب گریز و آب دوست به دلیل وجود لیپید مختل می شود. و همینطور در بعضی از آنالیت ها که به پروتئین حامل متصل می شود وجود اسید چرب آزاد ممکن است در اتصال آنالیت به پروتئین حامل تداخل نماید و سبب افزایش کاذب میزان آنالیت آزاد می شود. (به خصوص هورومونهای تیروئیدی و استروئیدی). بنابراین ناشتا بودن در این ازمایشات ضروری است.
14- ذوب و فریز کردن مجدد سرم در بعضی از آنالیتها تأثیر می گذارد (در پروژسترون و تستوسترون بی تاثیر می باشد).
15- بهتر است برای تخلیه حجم برداشتی پیستون سمپلر را فقط تا مکث اول به پائین فشار دهید. در صورتی که پیستون تا مکث دوم پائین آورده شود ایجاد حباب می نماید که در سیستم سنجش تداخل کند. معرفها و نمونه ها نباید از بالا به داخل چاهک چکانده شود. نوک سمپلر نباید با ته چاهک تماس یابد. نباید با زاویه شدید به دیواره چاهک تماس داده شود.

کنترل و نگهداری :
دستگاه را در محیط خشک و در فضای بدون گرد و غبار زیاد نگهدارید شرایط مناسب 35-18 درجه و رطوبت کمتر از 85% باشد در مواقع لزوم دستگاه را با استفاده از یک پارچه مرطوب تمیز نمایید جهت ضدعفونی ایزوپروپانول 70% پیشنهاد می شود استفاده از سایر مواد شیمیایی و تمیز کننده های ساینده توصیه نمی شود.

سرویس و تعمیر :
به کتابچه راهنمای کاربر پیوست شده مراجعه شود.

ملاحظات ایمنی جهت کار با دستگاه :
به کتابچه راهنمای کاربر پیوست شده مراجعه شود.