

# MONOKIT

کیت اندازه‌گیری هورمون PRL در سرم انسان  
**Prolactin ELISA Kit 96t**  
Cat. No: 0634-96 / Rev: B1 (1403/03/05)

## مقدمه:

هورمون پرولاکتین (PRL) یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای حاوی ۱۹۸ اسید آمینه با ساختاری شبیه به هورمون رشد است که توسط سلول‌های لاکتوتروف در هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می‌شود. این هورمون در تنظیم تولید هورمون‌های جنسی (استروژن در زنان و تستوسترون در مردان)، LH، FSH، رشد پستان و تولید شیر نقش دارد. در دوران بارداری میزان بالای پروژسترون مانع از ترشح شیر می‌شود ولی بلافاصله پس از زایمان و خروج جفت، با کاهش پروژسترون تولید شیر آغاز می‌گردد. از نظر بالینی، اندازه‌گیری پرولاکتین در تشخیص هایپرپرولاکتینمی و پیگیری درمان آن اهمیت دارد. مقادیر غیر طبیعی پرولاکتین در بیماری Bulimia، افزایش دوپامین، افزایش هورمون آزادکننده تیروتروپین (TRH) در مراحل اولیه هیپوتیروئیدیسم و یا به دنبال اثرات جانبی داروهای روان‌درمان مشاهده می‌شود. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح PRL در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

## اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الیزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه مونوکلونال ضد PRL صورت می‌گیرد. با قرار گرفتن نمونه سرم در معرض آنتی‌بادی متصل به بیوتین و آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ به سطح پلیت متصل می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت پرولاکتین سرم

ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت پرولاکتین سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

## محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
  - ۲) کالیبراتورها (PRL Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
  - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (PRL Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر.
  - ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
  - ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - ۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  - ۸) محلول کنترل (PRL Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
  - ۹) برچسب مخصوص پلیت: ۱ ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

## مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

## احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول

آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

## جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایتکتیک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

## آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن‌را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

## روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید. و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

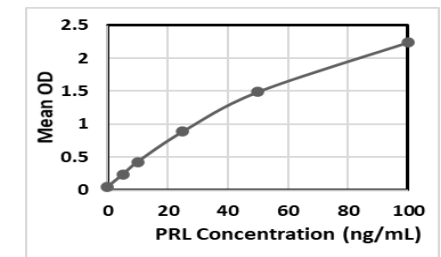
۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از مدت Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول‌موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

1: <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.054	0.056	0
	B1	0.058		
Cal. B	C1	0.223	0.234	5
	D1	0.245		
Cal. C	E1	0.421	0.428	10
	F1	0.435		
Cal. D	G1	0.871	0.884	25
	H1	0.897		
Cal. E	A2	1.462	1.486	50
	B2	1.510		
Cal. F	C2	2.196	2.238	100
	D2	2.280		



مقادیر مورد انتظار برای تست PRL به روش ایبزا

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Sexuality	Age	Normal Range (ng/mL)
Females	<13	0 - 10
Females	(13 - 18)	0 - 51
Females	>18	1.2 - 28.5
Postmenopausal Females	-	1.5 - 18.5
Males	(13 - 18)	5 - 25
Males	>18	1.8 - 20

پارامترهای کنترل کیفی

(۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 11.5% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/mL)	3.52	18.51	56.33
SD (ng/mL)	0.18	0.83	2.50
CV (%)	5.1	4.5	4.4

(۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 11.5% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/mL)	2.92	19.6	47.43
SD (ng/mL)	0.16	0.92	2.11
CV (%)	5.5	4.7	4.4

(۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به عنوان یک نمونه غلظت PRL در آن اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias < 10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	3.6	12.5	8.05	8.25	102.5
2	13.4	23.2	18.3	19.0	103.8
3	27.5	48.6	38.05	36.6	96.2

(۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت PRL در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 10% است.

No.	Sample (ng/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	4.83	-1.8	-1.9	2.8	-3.5
2	11.20	-1.8	-1.4	-1.9	2.5
3	18.05	-2.6	-1.7	-2.0	-0.4

(۵) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ng/mL ۰/۲ تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

(۶) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز PRL مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰ ± ۱۰۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration (ng/mL)
PRL	1	-
TSH	<0.0001	1000
LH	<0.0001	1000
FSH	<0.0001	1000
GH	<0.0001	1000
Chorionic Gonadotropin (CG)	<0.0001	1000

(۷) بررسی اثر هوک (Hook effect)

غلظت PRL تا ۲۳۰۰ ng/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

(۸) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.  
In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.  
Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.  
مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>OBL</b>	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

#### References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل، خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.