

کیت سنجش Prolactin به روش الایزا

مقدمه :

پرولاکتین هورمون پلی پپتیدی است که از بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. ترشح پرولاکتین توسط فاکتورهای آزاد کننده و مهار کننده که از هیپوتالاموس ترشح می شوند تنظیم می گردد. در دوران بارداری و پس از تولد نوزاد غلظت پرولاکتین افزایش می یابد، استرسهای روحی و فیزیکی و هیپوگلیسمی نیز می توانند باعث افزایش غلظت پرولاکتین گردند. از طرفی هیپرپرولاکتینمیا می تواند موجب کم کاری گنادها گردد بنابراین سنجش میزان پرولاکتین در موارد ناباروری از ارزش بالایی برخوردار است. در خانمها افزایش پرولاکتین می تواند باعث ایجاد اختلال در عادت ماهانه گردد و در آقایان باعث تضعیف قدرت جنسی شود. از نظر پاتولوژیک برخی عوارض هیپرپرولاکتینمیا عبارتند از انواعی از ماکرو و میکرو آدنوماها، هیپوتیروئیدسم و اختلالات کلیوی.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهای علیه یک شاخص آنتی ژنیک مولکول پرولاکتین پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه ضد پرولاکتین متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت پرولاکتین در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموزن است داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب است با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها، با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت :

- ۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد پرولاکتین (Anti-PRL Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کنژوگه (PRL Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آماده مصرف.
- ۳) سری استانداردها (Standard Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ mIU/L از PRL کالیبره شده بر مبنای WHO IS 84/500^{3rd} (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند).
- ۴) سرم کنترل : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen - Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آماده مصرف.
- ۶) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است.
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید.
- ۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

شرایط نگهداری :

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید.
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد.
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد. از ذوب و فریز نمودن مکرر نمونه پرهیز شود.

توضیحات عمومی :

- (۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید.
- (۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند.
- (۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید.
- (۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد.
- (۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند.
- (۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را وسط چاهکها بریزید.
- (۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود.
- (۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نینجامد.

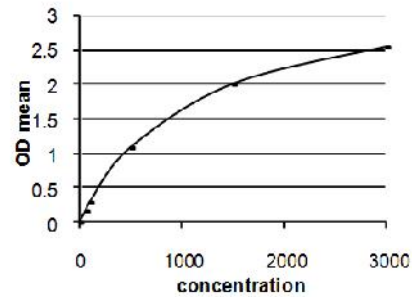
مراحل انجام آزمایش :

- (۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- (۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید.
- (۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نمائید و پلیت را به ملایمت به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند.
- (۴) درب چاهکها را با برس مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- (۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهکها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند).
- (۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - substrate) به هر چاهک اضافه نمایید.
- (۷) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید.
- (۸) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج :

- از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود.
- (۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.
 - (۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید.
 - (۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

استانداردها (mIU/L)	جذب نوری
۰	۰/۰۲
۵۰	۰/۱۷
۱۰۰	۰/۳۱
۵۰۰	۱/۱
۱۵۰۰	۲/۰۲
۳۰۰۰	۲/۵۵



توجه: جذبه‌های نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر طبیعی پرولاکتین در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر طبیعی خود را بدست آورد :

محدوده طبیعی (mIU/L)	میانگین محدوده طبیعی (mIU/L)	
۳۱ - ۴۳۳	۱۷۰	آقایان
۳۳ - ۴۱۳	۱۹۵	خانمهای یائسه
۱۱۸ - ۵۵۵	۲۵۱	خانمها قبل از یائسگی

$$\text{ng/ml} \times 21.2 = \text{mIU/L} \quad \text{mIU/L} \times 0.0472 = \text{ng/ml}$$

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD)، حداقل غلظت پرولاکتین قابل تشخیص در این کیت mIU/L ۱۵ می باشد.

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینترا - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف hPRL انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا - اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (mIU/L)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۳۵	۲	۵/۷
۲	۲۴	۲۹۳	۱۱/۲	۳/۸
۳	۲۴	۱۲۵۰	۴۲/۳	۳/۴

جدول شماره ۲ (اینترا - اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (mIU/L)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۳۶/۶	۲/۴	۶/۵
۲	۱۰	۲۸۵	۱۴/۶	۵/۱
۳	۱۰	۱۲۹۷	۵۳/۱	۴/۱

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از hPRL به ۴ سرم با غلظتهای مشخص hPRL افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار hPRL موجود در سرم (mIU/L)	مقدار افزوده شده hPRL (mIU/L)	مقدار مورد انتظار (mIU/L)	مقدار بدست آمده (mIU/L)	ریکاوری (%)
۱	۱۴۰	۵۰	۹۵	۹۰	۹۵
۱	۱۴۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۱۷	۹۷
۱	۱۴۰	۵۰۰	۳۲۰	۳۲۷	۱۰۲
۲	۳۷۰	۵۰۰	۴۲۵	۴۲۵	۹۸
۲	۳۷۰	۱۰۰۰	۶۸۵	۶۶۰	۹۶
۲	۳۷۰	۱۵۰۰	۹۳۵	۹۷۰	۱۰۴
۳	۹۵۰	۱۰۰	۵۲۵	۵۶۰	۱۰۶
۳	۹۵۰	۵۰۰	۷۲۵	۷۵۰	۱۰۳
۳	۹۵۰	۱۰۰۰	۹۷۵	۹۵۰	۹۷
۴	۱۸۳۰	۱۰۰	۹۶۵	۹۹۰	۱۰۲
۴	۱۸۳۰	۵۰۰	۱۱۶۵	۱۲۵۰	۱۰۷
۴	۱۸۳۰	۱۰۰۰	۱۴۱۵	۱۳۷۰	۹۷

□ خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از hPRL تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار hPRL موجود در سرم رقیق نشده (mIU/L)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۶۷۰	۹۴	۱۰۲	۱۰۰	۹۸
۲	۱۴۰۰	۹۶	۱۰۳	۹۶	۱۰۳
۳	۲۳۰۰	۱۰۰	۹۸	۹۷	۹۸
۴	۲۸۰۰	۹۸	۹۸	۹۸	۹۶

□ اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف hFSH، hLH، hTSH و hCG جهت بررسی واکنشهای متقاطع با hPRL بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است .

جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

غلظت ظاهری hPRL (mIU/L)	غلظت	آنالیت
< ۱۵	۵۰۰	hFSH (IU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
< ۱۵	۵۰۰	hTSH (mIU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
< ۱۵	۲۰۰۰۰	hCG (IU/L)
	۱۰۰۰۰	
	۱۰۰۰۰	
	۱۰۰۰	
< ۱۵	۵۰۰	hLH (IU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	

۶) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش پرولاکتین جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۱۵۰۰۰ mIU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد.

References :

Bergh T., Nilius S.H., Wide L. (1977) Hyperprolactinaemia in amenorrhoea incidence and clinical significance. Acta. Endocrinol. 86:683-694.
Seppala M. (1978) Prolactin and female reproduction. Ann. Clin. Res. 10:164-170.
Thorner M.O., McNeilly A.S., Hagan C. (1974) Long-term treatment of galactorrhoea and hypogonadism with bromocriptine. Br. Med. J 2:4.

روش انجام آزمایش Prolactin بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد پرولاکتین			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلولها
-	-	۵۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۵۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۵۰ میکرولیتر	-	-	نمونه
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	آنزیم کنژوگه
پلیت را به ملایمت به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشوید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			