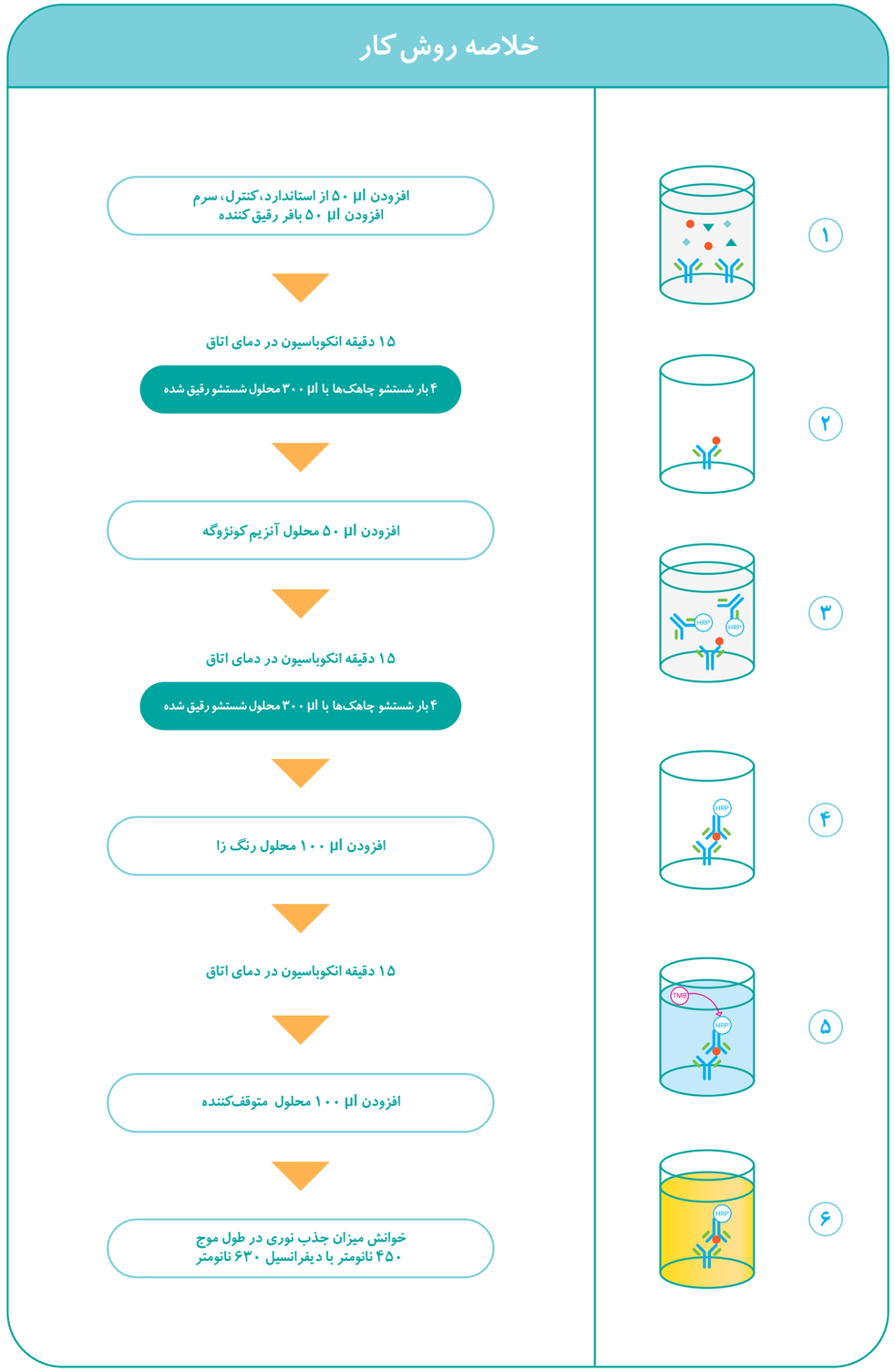
خلاصه روش کار



Key: TMB | HRP | Prolactin | Antibody

کاربرد

اندازه‌گیری غلظت prolactin در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک
(Cat.No. DG.PRL.01) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک: پرولاکتین متشکل از یک زنجیره منفرد ۲۳ کیلودالتونی از ۱۹۹ اسید آمینه ساخته شده است. این هورمون عمدتا" از سلولهای لاکتوتروپیک بخش پیشین هیپوفیز ترشح می شود. ساخت این هورمون منحصر به هیپوفیز نبوده و به میزان کم در دسیدوای رحم باردار، میومتر و پروستات نیز تولید می شود. ترشح پرولاکتین توسط هورمون آزاد کننده تیروتروپین (Thyrotropin releasing hormone) تحریک و با دوپامین مهار می گردد. اختلاف جنس تا سن بلوغ تاثیری بر روی میزان تولید پرولاکتین ندارد. در زنان باردار با افزایش استروژن (تا هفته ۳۸ بارداری) سنتز این هورمون روند صعودی داشته و ۳ هفته بعد از قطع شیردهی میزان سرمی آن به سطح پایه بر می گردد.

پرولاکتین نقش مهمی در تکامل غدد پستانی، تولید و ترشح شیر و کنترل عملکرد غدد جنسی دارد به طوریکه افزایش ترشح آن باعث کاهش استروئیدهای منشاء تخمدانی، اختلال در تکامل فولیکولها و ترشح دو هورمون LH و FSH می گردد. علاوه بر آن پرولاکتین در تولید هورمون های استروژن و تستوسترون تاثیر گذار است. [۱،۲]

کاربرد بالینی: از اصلی ترین استفاده بالینی اندازه گیری پرولاکتین سرمی، ارزیابی هایپر پرولاکتینمی (Hyperprolactinemia) و تومورهای هیپوفیزی ترشح کننده پرولاکتین می باشد. مهم ترین این تومورها،Prolactinoma است که بارزترین نشانه بالینی آن در زنان آمنوره (Amenorrhea)، گالاکتوره (Galactorrhea)، اختلالات بینایی، جنسی و ناباروری است. در مردان این تومور باعث ژنیکوماستی، ناباروری، کاهش توده عضلانی و نیز اختلالات بینایی می گردد. [۳،۴]

معمولاً علاوه برProlactinoma بیماری های محور هیپوتالاموس- هیپوفیز، آکرومگالی، هیپوتیروئیدیسم اولیه، بیماریهای کلیوی، هیپوگلیسمی وابسته به انسولین با افزایش این هورمون همراه است. ازعوامل غیر مرتبط با بیماریها در افزایش سطح سرمی پرولاکتین می توان بارداری، تحریک پستان، شیردهی، استرس و خواب را نام برد. مصرف داروهائی مانند استروژنها، متیل دوپا، آنتی دپرسانها، داروهای ضد فشار خون، ال دوپا و بروموکریپتین (Bromocriptine) باعث کاهش غلظت سرمی این هورمون می شود. [۵-۷]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۱۵ دقیقه + ۱۵ دقیقه + ۱۵ دقیقه

طراحی کیت پرولاکتین بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی‌بادی های مونوکلنال می‌باشد. در این روش آنتی‌ژن مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی بادی تثبیت شده در ته چاهک‌های پلی‌استایرنی و آنتی‌بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز(HRP) که شاخص‌های‌آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول پرولاکتین شناسایی می کنند، قرار می گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت‌های غیرمتصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین (TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف‌کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت پرولاکتین ارتباط مستقیم دارد، در طول موج **۴۵۰** نانومتر (با دیفرانسیل **۶۳۰** نانومتر) اندازه گیری می‌گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.

به‌منظور رقیق‌سازی نمونه می‌بایست از "محلول استاندارد صفر" کیت مربوطه، استفاده گردد.

- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله اول تست در کمتر از **۱۰** دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی پرولاکتین به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد Prolactin (Anti- Prolactin Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استاندارد صفر (Standard A)	1/4 ml
۳	استانداردهای B-F (Standards B-F) برحسب (ng/ml) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO IS 83/573 (4th) (ng/ml × 21.28 = mIU/mL)	5/1 ml
۴	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO IS 83/573 (4th)	2/1 ml
۵	بافر رقیق‌کننده (Assay Buffer)	1/6 ml
۶	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۷	محلول (HRP) کونژوگه شده به آنتی‌بادی ضد Prolactin (Anti-Prolactin Antibody- HRP Conjugate)	1/6 ml
۸	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۹	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25-A) [۸] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری پرولاکتین، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد تا **۱۴** روز و در دمای **۲۰-** درجه سانتیگراد تا شش ماه قابل نگهداری هستند. [۹] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری پرولاکتین نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. در صورتی‌که غلظت نمونه‌ای بیش از آخرین استاندارد باشد، جهت اندازه‌گیری دقیق آنالیت، ابتدا نمونه را با **"محلول استاندارد صفر"** رقیق و نمونه رقیق شده را مجدد تست کنید. در محاسبه غلظت نهایی این نمونه ها، ضریب رقت را منظور نمایید. به علت افزایش سطح پرولاکتین حین خواب توصیه می گردد نمونه گیری سرم جهت اندازه گیری این هورمون، حداقل **۲** ساعت بعد از بیداری انجام شود.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر **۴۵۰** و**۶۳۰** نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای **۱۰۰** و **۵۰** میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (**۲۵-۲۰** درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

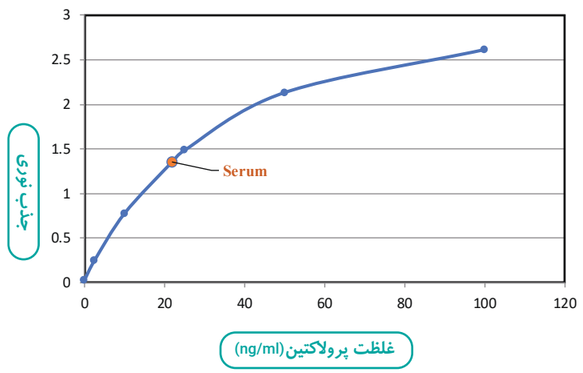
مراحل انجام تست :

۱. ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید.
۲. ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را ۱۵ ثانیه تکان دهید.
۳. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۴. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۵. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید.
۶. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۷. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۸. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۹. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت پرولاکتین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب ng/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت پرولاکتین آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

غلظت Prolactin (ng/ml)	میانگین جذب نوری	جذب نوری	نمونه
۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۱	استاندارد A
		۰/۰۳۵	
۲/۵	۰/۲۵۲	۰/۲۴۹	استاندارد B
		۰/۲۵۵	
۱۰	۰/۷۸۳	۰/۷۸۸	استاندارد C
		۰/۷۷۸	
۲۵	۱/۴۸۶	۱/۴۴۴	استاندارد D
		۱/۵۲۸	
۵۰	۲/۱۳۲	۲/۰۷۷	استاندارد E
		۲/۱۸۷	
۱۰۰	۲/۶۱۳	۲/۶۰۱	استاندارد F
		۲/۶۲۵	
۲/۴۲	-	۰/۲۲۶	کنترل پایین
۵۱/۶۴	-	۲/۱۰۴	کنترل بالا
۲۱/۷۵	-	۱/۴۰۰	سرم



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیتهای هورمونی TSH (تا ۱۰۰ mIU/ml)، LH (تا ۵۰۰ mIU/ml)، FSH (تا ۵۰۰ mIU/ml) ، GH (تا ۵۰۰ ng/ml) و hCG (تا ۲۰۰,۰۰۰ mIU/ml) بررسی گردید.نتایج در جدول زیر آمده است.

درصد تداخل (Cross-reactivity)	ماده افزوده شده
<۰/۱	TSH
<۰/۱	LH
<۰/۱	FSH
<۰/۱	hCG
<۰/۱	GH

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۱۱۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد.
- در این کیت برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت (تا ۱۰۰۰۰۰ ng/ml) اثر هوک دیده نشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت پرولاکتین با این کیت، ۰/۲ – ۱۰۰ ng/ml می‌باشد.

مقادیر طبیعی

از بررسی غلظت پرولاکتین ۳۷۲ نمونه افراد سالم نتایج زیر بدست آمده است.

جنسیت	تعداد	5٪ to 95٪ Interval (ng/ml)	میانگین (ng/ml)
زنان قبل از یائسگی	۹۱	۴/۵ -۳۰/۴	۹/۱
زنان بعد از یائسگی	۱۰۶	۳/۱-۲۵/۷	۶/۸
مردان	۱۷۵	۲/۸-۲۲/۸	۷/۴

قابل ذکر است که جدول فوق یک راهنمای کلی است و توصیه می‌گردد هر آزمایشگاه با اندازه‌گیری غلظت پرولاکتین افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری پرولاکتین که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ۰/۲ ng/ml می‌باشد.

۲. صحت: غلظت پرولاکتین ۲۶۵ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۸ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین ۰/۲۲ ng/ml تا ۹۸/۸۹ و با روش مرجع ۰/۲۹ ng/ml تا ۹۳/۶۶ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه ها (ng/ml)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۲۶۵	۰/۲-۱۰۰	۰/۰۳۰	۰/۹۸۶
Linear Regression	۲۶۵	۰/۲-۱۰۰	۰/۲۷۱	۰/۹۷۹

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [10] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان پرولاکتین ۳ نمونه با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:.

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (ng/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۵/۸۴	۰/۲۳	۳/۹۵	۰/۲۸	۴/۸۹
۲	۶۰	۱۴/۶۷	۰/۴۸	۳/۳۰	۰/۴۸	۳/۳۳
۳	۶۰	۳۱/۴۶	۱/۱۴	۳/۶۰	۱/۳۸	۴/۰۶

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [11] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۶۵/۳۲ ng/ml با "نمونه فاقد آنالیت" به صورت متوالی رقیق شد سپس غلظت‌ها با کیت پرولاکتین اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۵/۵ تا ۱۰۳/۶ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	غلظت مورد انتظار (ng/ml)	رقت
۹۵/۵	۳۱/۲۰	۳۲/۶۶	۱:۲
۹۹/۱	۱۶/۱۹	۱۶/۳۳	۱:۴
۱۰۲/۹	۸/۴۰	۸/۱۶	۱:۸
۱۰۳/۶	۴/۲۳	۴/۰۸	۱:۱۶

۵. بازیابی: به منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [11] انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی پرولاکتین با غلظت بالا (۶۵/۲۶ng/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی پرولاکتین با غلظت پایین (۶/۸۴ng/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت پرولاکتین اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت
b: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده
C: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۰/۶ تا ۱۰۵/۱ است)

٪ ریکاوری	c (ng/ml)	b (ng/ml)	a (ng/ml)
۹۰/۶	۳/۱۱	۶/۷۷	۹/۵۹
۱۰۱/۳	۵/۹۳	۵/۹۸	۱۱/۹۹
۱۰۵/۱	۱۰/۸۷	۵/۵۲	۱۶/۹۵
۱۰۱/۳	۱۸/۶۴	۵/۱۹	۲۴/۰۷

منابع

1. Freeman M, *et al*. Prolactin: structure, function and regulation of secretion Physiological reviews. 80 (4), 2000.
2. Ciechanowska M., *et al*. Prolactin and the physiological regulation of its secretion, A review. Journal of Animal and Feed Sciences. 22, 2013.
3. Majumdar A., *et al*. Hyperprolactinemia. J Hum Reprod Sci. 6 (3), 2013.
4. Daria La Torre. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. Therapeu tics and Clinical Risk Management . 3(5), 2007.
5. Wange T., *et al*. Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation. Diabetes Care. 36, 2013.
6. Torner L. Actions of prolactin in the brain: from physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology. Frontiers in Endocrinology. 7, 2016.
7. Ben- Jonathann N., *et al*. Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. Endocrine Reviews. 22(6), 2001.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition NCCLS Document EP25-A. 2009.
9. Wu AHB. Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests. Saunders, Philadelphia 3rd edition, p. 594, 1995.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۰۲۱-۷۲۴۵۷
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Dec. 2018