

اهمیت بالینی

پرولاکتین یک هورمون پپتیدی با حدود ۲۰۰ آمینواسید است. این هورمون یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای با ساختاری شبیه به هورمون رشد می‌باشد که توسط سلول‌های لاکتوتروپ در هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می‌شود. مهمترین نقش پرولاکتین در غدد پستان، رشد این غدد و تولید شیر می‌باشد. افزایش میزان پرولاکتین خون منجر به کاهش میزان تولید هورمون‌های جنسی (استروژن در زنان و تستوسترون در مردان) و همچنین کاهش میزان تولید FSH و LH در هیپوفیز قدامی می‌گردد. مقدار این هورمون در بیماری جوع (Bulimia) و افزایش دوپامین کاهش می‌یابد. همچنین مقادیر بالای پرولاکتین در خون می‌تواند به دنبال افزایش هورمون آزاد کننده تیروتروپین TRH در مراحل اولیه هیپوتیروئیدیسم و یا به دنبال اثرات جانبی داروهای روان درمان باشد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی پرولاکتین در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش

این تست براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش با اضافه کردن نمونه‌ها و کونژوگه آنزیمی، کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شود که اتصال آن‌ها به کف چاهک توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه ضد PRL صورت می‌گیرد. پس از انجام شستشو و افزودن محلول سوبسترای آنزیم HRP به چاهک‌ها، رنگ آبی ایجاد می‌شود که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد. شدت رنگ به

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

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators):

شامل شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ng/mL. تهیه شده از سرم انسان.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (PRL Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر.

۳) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (PRL Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۹) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

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.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.

- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری‌ساخت‌ها خودداری فرمایید.

- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.

- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه‌ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

- 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.

آماده سازی محلول‌ها

محلول شستشو: کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

محلول سوبسترا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، کنترل و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و نمونه‌های بیمار را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را با برچسب مخصوص پلیت ببخشایید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی یا وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

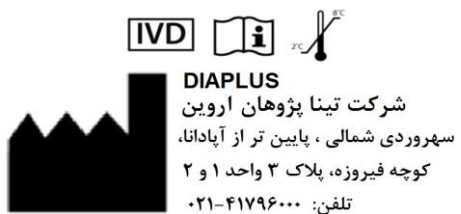
۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌منظور تخلیه کامل مایعات، پلیت را به آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

منابع

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. 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 با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.



Linearity

در این تست، غلظت پرولاکتین در رت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	12.1	1.3	-3.1	1.6	2.6
2	23.4	-2.8	1.7	-1.3	3.1
3	32.9	2.4	2.9	1.1	1.5

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز پرولاکتین مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت 0.2 ng/mL می‌باشد.

Stability

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت 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.

مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده 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

Intra - Assay

دقت درون‌تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/mL)	4.11	26.32	36.25
SD (ng/mL)	0.23	1.32	1.87
CV (%)	5.6	5	5.1

Inter - Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/mL)	6.28	19.44	27.11
SD (ng/mL)	0.38	1.12	1.54
CV (%)	6	5.8	5.7

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار پرولاکتین در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	3.57	20.18	11.87	11.96	100.7
2	14.21	4.91	9.56	9.41	98.4
3	21.33	11.42	16.37	16.19	98.9

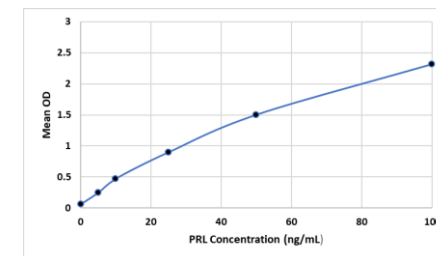
(۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (به بخش آماده سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

(۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

(۹) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول‌موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). 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	0.056	0.06	0
	B1	0.064		
Cal. B	C1	0.223	0.247	5
	D1	0.271		
Cal. C	E1	0.419	0.468	10
	F1	0.517		
Cal. D	G1	0.871	0.901	25
	H1	0.931		
Cal. E	A2	1.493	1.501	50
	B2	1.509		
Cal. F	C2	2.401	2.314	100
	D2	2.227		



نکته: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.