کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶تستی)

PROLACTIN

موارد استفاده :
تعیین کمّی Prolactin در سرم یا پلاسما

I. مقدمه

هورمون پرولاکتین، پلی پپتیدی با وزن مولکولی ۲۲kDa، از لوب قدامی هیپوفیز و بافت جفت ترشح می شود. کنترل سنتزاین مولکول تک زنجیره ای توسط فاکتورهای هیپوتالامیک انجام می گردد [۱-۲].

نقش اساسی پرولاکتین در رشد غدد پستانی، آغاز شیر دهی و تداوم آن پس از زایمان می باشد [۳]. علاوه بر تحریکات مرتبط با غدد پستانی، پرولاکتین در تنظیم فعالیت غدد جنسی مردان و زنان نقش دارد [۴-۵].

اندازه گیری میزان پرولاکتین در سرم یا پلاسما در تشخیص نارسایی های محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گنادها حائز اهمیت است . همچنین اندازه گیری پرولاکتین در تشخیص افتراقی بیماریهایی که با افزایش یا کاهش ان مرتبط هستند، مفید می باشد . افزایش پرولاکتین در تومورهای هیپوتالاموس و هیپوفیز ، استرس ، هیجان و عصبانیت ، جراحی ها ، کم کاری اولیه تیروئید ، دیده می شود [۶-۱۱].کاهش پرولاکتین در موارد هیپوفیزکتومی ، ادنکتومی ، و کم کاری هیپوفیز (مثل سندروم شی هان و ...) شایع است [۱۲-۱۳].

II. اصول اندازه گیری

کیت اندازه‌گیری کمّی پرولاکتین بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلنال موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول پرولاکتین شناسائی می‌کنند، استفاده شده است. ابتدا به حفره‌های پلی استرین پوشیده شده با آنتی بادی‌های منو کلنال پرولاکتین ، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، پرولاکتین موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد پرولاکتین متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد پرولاکتین که به آنزیم پراکسید از (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳و'۳-۵و'۵ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان پرولاکتین موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه یافته و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت پرولاکتین نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت پرولاکتین آنها رسم شده و سپس میزان غلظت پرولاکتین نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می گردد.

III. محتویات کیت :

محلولهای این کیت(Cat.No.P-PRI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

۱. پلیت: پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منوکلنال ضد پرولاکتین موش.

۲. استاندارد صفر: ۱ ویال ۴ میلی‌لیتری از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه‌ها نیز استفاده شود.

۳. استانداردها: ۵ ویال ۱/۰ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی پرولاکتین انسان. غلظت دقیق پرولاکتین استانداردها، که بر مبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (3rd IRP 84/500) کالیبر شده اند، بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. کنترل‌های سرمی: ۲ ویال ۱/۰ میلی لیتری سرم انسان. غلظت‌های دقیق پرولاکتین کنترل‌های سرمی بر روی برچسب کنترل‌ها درج شده است.

۵. ردیاب آنزیمی: یک ویال ۶ میلی لیتری آنتی‌بادی منوکلنال، ضد پرولاکتین متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. بافر رقیق کننده: یک ویال ۶ میلی لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال.

۷. محلول شستشوی غلیظ (x۲۰): یک ویال ۲۵ میلی لیتری PBS-Tween 20 و تیمروزال.

۸. محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر O_2H و TMB.

۹. محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱.دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰.

۲.میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف

۳.آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری پر ولاکتین ، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می‌باشد. این نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم نموده، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمائید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب نمود. برای اندازه‌گیری پرولاکتین نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده، سپس با حرکت دست یکنواخت نمائید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex نباید استفاده نمود. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هائی که میزان پرولاکتین آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با استاندارد صفر رقیق کرده، سپس اندازه‌گیری مجدد بعمل آورید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI. روش کار :

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است.در صورت مشاهدهٔ کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و سرم بیماران را در داخل حفره‌ها ریخته، و به آن ۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه کنید سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمائید.

۲. پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۴. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد پرولاکتین (HRP) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید.

۵. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB اضافه کنید.

۷. پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

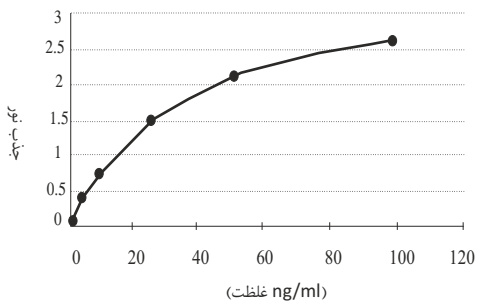
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید. میزان جذب نوری حفره‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده ، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت پرولاکتین بیماران قابل محاسبه است. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای پرولاکتین در طول موج ۴۵۰nm و محور X شاخص غلظت استانداردهای پرولاکتین برحسب ng/ml می‌باشد. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی به عنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

غلظت پرولاکتین (ng/ml)	جذب نور	نمونه	
۰/۰	۰/۰۳	استاندارد	A
۵	۴۷/۰	استاندارد	B
۱۰	۰/۷۸	استاندارد	C
۲۵	۱/۴۸	استاندارد	D
۵۰	۲/۱۳	استاندارد	E
۱۰۰	۲/۶۱	استاندارد	F
۴۶	۲/۰۰	سرم	

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



VIII. مقادیر طبیعی :

در افراد طبیعی بالاترین میزان پرولاکتین سرم در حدود ۳۰ng/ml میباشد [۱۴]. مقادیر مندرج در جدول زیر با استفاده از روش کمی لومینسانس تعیین و به عنوان یک راهنمای کلی ارائه شده است [۱۵].توصیه میشود که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت پرولاکتین بیماران خود، دامنهٔ آن را تعیین نموده و از آن به عنوان مبنای مقایسهٔ خود استفاده نماید.

دامنه (ng/ml)	میانگین (ng/ml)	تعداد	
۲/۸-۲۹/۲	۹/۶	۲۰۷	زنان طبیعی
۲/۱-۱۷/۷	۷/۰	۱۴۱	زنان یائسه
۱/۸-۲۰/۳	۶/۹	۱۰۴	مردان طبیعی

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. **حساسیت:** به حداقل غلظت پرولاکتین که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی‌دار باشد حساسیت کیت گفته می‌شود. این مقدار برای کیت پرولاکتین ۰/۵ ng/ml است.

۲. **اختصاصی بودن:** اختصاصی بودن تست پرولاکتین با اندازه گیری غلظت پرولاکتین بعد از افزودن مقادیر بالایی از هورمون های (LH)IU/L۵۰۰، (FSH)IU/L۵۰۰، (TSH)IU/L۱۰۰، (GH)ng/ml۵۰۰، (HCGß)IU/L۱۰۰,۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این آزمایشات تداخلی در جدول زیر نشان داده شده است:

هورمون		Prolactin (ng/ml)	
نام	غلظت	غلظت اندازه گیری	غلظت پیش بینی شده
LH۵۰۰	IU/L	۲۳/۸	۲۲/۰
FSH۵۰۰	IU/L	۲۲/۰	۲۲/۰
TSH ۱۰۰	IU/L	۲۲/۸	۲۲/۰
GH۵۰۰	ng/ml	۲۴/۵	۲۲/۰
HCGß ۱۰۰,۰۰۰	IU/L	۲۴/۲	۲۲/۰
hPL	ND	ND	ND

۳. **اثر Hook:** در کیت EIA پادتن علم برای نمونه های رقیق نشده تا غلظت تقریبی ۱۰۰,۰۰۰ ng/ml اثر Hook مشاهده نشده است.

۴. **دقت:** شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است:

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی		
%CV	SD	میانگین (ng/ml)	%CV	SD	میانگین (ng/ml)
۱/۸	۰/۲	۱۱/۲	۱/۷	۰/۲	۱۲/۰
۳/۴	۱/۰	۲۹/۳	۶/۴	۰/۲	۲۹/۰
۲/۷	۱/۷	۶۳/۶	۱/۲	۰/۸	۶۷/۸
۵/۲	۶/۷	۱۲۹/۰	۲/۵	۳/۰	۱۲۱/۴

۵. **ریکاوری و رقت:** ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای پرولاکتین به نمونه سرمی که غلظت پائینی از پرولاکتین دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت پیش بینی شده (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۷/۵ تا ۱۰۴/۷ می‌باشد.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش بینی شده (ng/ml)	غلظت افزوده شده (ng/ml)
-	۱۷/۱	-	-
۹۷/۵	۳۵/۵	۳۶/۴	۱۹/۳
۱۰۲/۵	۵۳/۲	۵۱/۹	۳۴/۸
۱۰۴/۷	۷۸/۶	۷۵/۱	۵۸/۰
۱۰۰/۶	۹۲/۲	۹۱/۶	۷۴/۵

برای بررسی خطی بودن رقتهای پرولاکتین بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه بعنوان مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۶/۲ تا ۱۰۳/۳ می‌باشد.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش بینی شده	رقت
-	۹۵/۷	-	-
۱۰۳/۱	۴۹/۴	۴۷/۹	۱:۲
۹۶/۲	۲۳/۰	۲۳/۹	۱:۴
۹۹/۲	۱۱/۹	۱۲/۰	۱:۸
۱۰۳/۳	۶/۲	۶/۰	۱:۱۶

۶. **مقایسه با کیت Roche Elecsys:** برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت الکترو کمی لومینسانس Roche، غلظت Prolactin۵۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۵ را نشان می دهد.

X.References

1. Ashby C.D. Prolactin. In: Kaplan L. A., Pesce A. J., Methods in clinical chemistry. St. Louis, CV Mosby: 258-265, 1987.

2. Vander A. J., Sheman J. H., Luciano D. S. Human physiology: the mechanisms of body function. New York, McGraw-Hill Inc: 589-591, 1985.

3. Liwnicz BH, Liwnicz RG. The hypothalamoputuitary system. In: Kaplan L. A., Pesce A. J., Clinical Chemistry: theory, analysis, and correlation. St. Louis, CV Mosby: 613-619, 1989.

4. Albertsen P. C., Chang T. S. K. Hormone measurements in the assessment of male infertility. J Clin Immunoassay. 6(1): 51-56, 1983.

5. Owens O. Steroidal hormonal evaluation for common gynecological and teticular disorders. In: Kaplan, L. A., Pesce A. J., Methods in clinical chemistry. St.. Louis, CV Mosby: 216-217, 1987.

6. Board J. A, Bhatnagar A. S. Serum Prolactin levels Galactorrhea. Am. J. Obster. Gynecol. 123:41. 1976.

7. Gomez F. Reyes F. I. Fairman C. Non-Puerperal Galactorrhea and Byperprolactinemia. Am. J. Med. 62: 648, 1977.

8. Sassin J. F., Frantz A. G. Wertzman E. G. Kapen S. Human Prolactin: 24-Hour pattern with increased release during sleep. Science 177: 1205, 1972.

9. Gangemim. Hyperprolactinemic Amenorrhea. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 11: 110, 1984.

10. Martin J. B. Reichlin Seymour, Brown G. M. Regulation of Prolactin Secretion and its disorders. In: C linical Neuroendocrinlogy. Contemporary Neurology Series. F. A. Davis company Philadelphia: 129, 1978.

11. Turkington R. W. Secretion of Prolactin by patients with Pituitary and Hypothalamic Tumours. J. Clin. Endo. 34: 159, 1972.

12. Woodhouse, N. J. Y., Miles, N., McDonald, D. Mc Corkell, S. Prolactin levels in Pregnancy: comparison of normal subjects with patients having Micro or Macroadenomas after early bromocryptive withdrawal. Hormone Res. 21: 1, 1985.

13. Frantz, A. G. The regulation of Prolactin secretion in humans. In: Frontiers in Neuroendocrinology. (eds. Gangong, W. F. & Martini, L.) Oxford press, 1973.

14. Burtis, C. A., Ashwood, E. R. Fundamentals of clinical chemistry, 4th edition: 789, 1999.

15. Chiron Diagnostics. Prolactin. Automated Chemiluminescence System. ACS: 180, 1996.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV ، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)