راهنمای کیت

PRL

مقدمه:

ساختمان ومتابولیسم : پرولاکتین یک زنجیره پلی پپتیدی متشکل از 198 اسید آمینه با 3 پل دی سولفیدی داخل مولکولی است. وزن مولکولی آن 22000 دالتون است و از سلولهای لاکتوتروپیک هیپوفیز ترشح می شود که اسیدوفیل هستند. مولکول Big prolactin با وزن مولکولی بالا و از نظر بیولوژیک غیر فعال توسط آدنوما تولید می شود. اختلاف جنس تا سن بلوغ تاثیری روی میزان پرولاکتین ندارد. وقتی تولید استروژن بالا می رود تولید پرولاکتین در زنان بالا می رود. تغییرات غلظت پرولاکتین در بالغین با نوسانات اپی زودیک و بعد ازخواب یک پیک نزولی دارد. سنتز و ترشح PRL با فاکتورهای هیپوتالامیک تنظیم می شود. مثل TRH که نقش تحریک کننده بر پرولاکتین و دوپامین دارد.نقش اصلي و بيولوژيک پرولاکتين در زنان تحريک و نکامل غدد شيري و ترشح شير بعد از زايمان است.

معرفي آزمايش و کاربرد باليني:

انجام آزمايش در تشخيص و رديابي تومورهاي ترشح کننده پرولاکتين موثر است.آمنوره ثانويه يا گالاکتوره را مي توان با اين آزمايش حدس زد.در هيپر لاکتينميا نيز افزايش سطح پرولاکتين ديده مي شود. براي بيماري هاي هيپوتالاموس، تاثير جراحي ، شيمي درماني و پرتودرماني در تومورهاي مترشحه، پرولاکتين مفيد است. در موارد بيماري هيپوتالاموس يا هيپوفيز،آکرومکالي ،هيپوتيروئيديسم اوليه، بيماري هاي کليوي، آنورکسي و هيپو کليسمي وابسته به انسولين افزايش پرولاکتين ديده مي شود. همچنين افزايش فيزيولوژيک پرولاکتين در جنين و نوزادان ديده مي شود. در سندرم sheeha (apoplexy هيپوفيز) کاهش پرولاکتين وجود دارد.آزمايش تضعيف يا L-dopa وتحريک با TRH يا Chlorpromasine براي بررسي موارد غير طبيعي ترشح پرولاکتين از هيپوفيز انجام مي شود.

اساس آزمايش :

اساس این کیت به روش ساندویچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک PRL , Coat میشوند. نمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت PRL در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

محدوده طبيعي:

مقادير نرمال PRL در سرم افراد طبيعي که توسط تست هاي مکرر به روش الايزا بدست آمده به شرح زير می باشد ولي پيشنهاد مي گردد تا هر آزمايشگاه مقادير نرمال خود را بدست آورد:

زنان غير باردار	110-555
مردان	30-435
بچه ها	424-67
در 3 ماهه سوم بارداري	>720
بعد از يايسگی	30-420

واحد اندازه گیری PRL ، mIu/Lit می باشد، که برای تبدیل آن به ng/ml از فرمول زیر استفاده میگردد:

mIu/L=21.2 ng/ml
ng/ml=0.0472 mIu/L

جمع آوري و آماده سازي نمونه :

سرم بعد از 3-4 ساعت بعد از بيداري گرفته شود ودر 4 درجه به مدت 24 ساعت و براي نگهداري طولاني در 20- نگهداري شود. در نمونه بايد ناشتا گرفته شود، سرم به شدت همولیز و لیپمیک باید حذف شود.

واکنش تداخلی:

استرس - حاملگي - خواب - تحريک نوک پستان و شير دهي افزايش دهنده پرولاکتين مي باشند. داروهائي مثل استروژن، متيل دوپا، آنتي ديپرسانتهاي Tri cyclic و فنو تيازين ها و ضد فشار خون ها بالا برنده پرولاکتين هستند. داروهائي مثل دوپامينرژيک از ترشح پرولاکتين ممانعت مي کند و L-Dopa در گالاکتوره ميتواند ترشح پرولاکتين نرمال را سبب شود.

محتويات کيت :

1- يک عدد پليت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد PRL (Anti -PRL Coated Plate) دارای 96 چاهک.
2- سری استاندارد (Standard Set) : 6 ويال استاندارد دارای غلظت های mIu/ml صفر، 50،100، 500، 1000، 2000 که هر ويال محتوی 1 ميلی ليتر می باشد.
3- سرم کنترل (Control Serum) : يک ويال حاوی 1 ميلی ليتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ويال
4- محلول رقيق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : يک ويال حاوی 1 ميلی ليتر برای رقيق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترين استاندارد کيت را دارا می باشند.
5- محلول آنزيم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : يک ويال حاوی 12 ميلی ليتر محلول حاوی PRL کنژوکه شده با HRP .
6- محلول شستشو (Washing Solution) : يک ويال حاوی 40 ميلی ليتر محلول شستشوی غليظ (25 X) که برای تهيه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غليظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقيق کنيد.
7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : يک ويال محتوی 12 ميلی ليتر و آماده برای مصرف.
8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :يک ويال محتوی 12 ميلی ليتر.
9- بر چسب مخصوص پليت (Card Board Sealer)

مواد و وسايل مورد نياز که در کيت موجود نمی باشد:

1- دستگاه خوانش الايزا (Eliza Reader) دارای فيلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فيلتر رفرانس.

2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نکات قابل ذکر براي مصرف کنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .
3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .
4- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از5دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

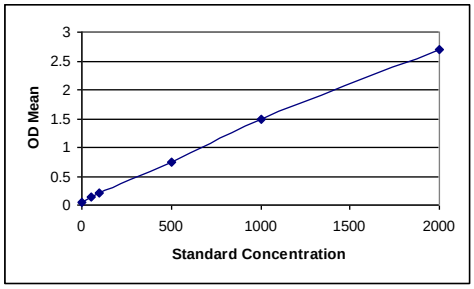
1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 50 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، سپس 100 ميكروليتر محلول آنزيم كونزوگه (Enzyme Conjugate) به هرچاهك اضافه نمائيد. پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد سپس چاهكها را به مدت 60 دقيقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه سانتيگراد) انكوبه نمائيد .
3- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كاناله استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
4- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
5- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين 2-8 C' مي باشد و بهتراست كه در 4C ' نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن كيت يک ماه پايدار می باشد .
3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .
4- **توجه :** درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
3- 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 کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه 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
St 1	0	0.04
St 2	50	0.13
St 3	100	0.2
St 4	500	0.75
St 5	1000	1.5
St 6	2000	2.7

توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :

براساس جذب نوري استاندارد صفر و سه برابر انحراف معيار (SD)حداقل غلظت PRL قابل تشخيص در اين كيت 15 mIU/L مي باشد .

2- دقت آزمايش :

آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از4 استاندارد با غلظتهاي مختلف PRL انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين mIU/L	SDmIU/L	CV%
1	12	50	4/63	3/0
2	12	100	5/8	1/7
3	12	500	39/6	4/0
4	12	1000	45/9	1/49

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين mIU/L	SD mIU/L	CV%
1	5	50	5/2	4/4
2	5	100	5/16	3/2
3	5	500	40/39	4/6
4	5	1000	50/94	3/5

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- خطي بودن آزمايش :

به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه استاندارد با غلظت مشخص از PRL تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول زير نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار PRLموجود در سرم رقيق نشده (mIU/L)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	100%
1	100	98	91	102	94
2	500	93	95	96	92
3	1000	95	98	99	90.5

4- ريكاوري آزمايش :

مقادير معلومي از HCG به 4 سرم با غلظتهاي مشخص PRL افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول صفحه بعد آمده است .

جدول ريكاوري :

ريكاوري (%)	مقدار بدست آمده (mIU/L)	مقدار مورد انتظار (mIU/L)	مقدار افزوده شده PRL (mIU/L)	مقدار PRL موجود درسرم (mIU/L)	نمونه
110	110	100	50	150	1
97.6	122	125	100	150	1
96.6	314	325	500	150	1
95.9	211	220	100	340	2
101	425	420	500	340	2
96.2	645	670	1000	340	2
96.5	444	460	100	820	3
97.7	645	660	500	820	3
100	911	910	1000	820	3
98.4	714	725	100	1350	4
101	940	925	500	1350	4
91.4	1075	1175	1000	1350	4

5- اختصاصيت آزمايش :

اختصاصيت اين آزمايش به كمك سرمهايي با غلظتهاي مختلف human LH, human FSH, human TSH, HCG جهت بررسي واكنشهاي متقاطع با PRL بررسي شد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول اختصاصيت (واكنش متقاطع) :

غلظت ظاهري PRL (mIU/L)	غلظت	آناليت
<15 <15 <15	500 250 100	hFSH(IU/L)
<15 <15 <15	500 250 100	hLH(IU/L)
<15 <15 <15	500 250 100	TSH(mIU/L)
<15 <15 <15	100000 10000 1000	HCG(IU/L)

6- اثر هوك (Hook Effect)

آزمايش PRL جهت سرمهايي با غلظت بسيار بالا از اين آناليت (50000 mIU/L) صورت گرفت كه پديده هوك مشاهده نشد .

References

1. Bergh T., Nillius S.H., Wide L. 1977. Hyperprolactinemia in amenorrhea incidence and clinical significance. Acta. Endocrinol 86:683-694.
2.Seppala, M. 1978. Prolactin and female reproduction. Ann. Clin. Res. 10:164-170.
3.Thorner, M.O., McNeilly, A.S., Hagan C. 1974. Long-term treatment of galactorrhea and hypogonadism with bromocriptine. Br. Med. J.

Adress :
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485