

کیت اندازه‌گیری هورمون PRL در سرم انسان
PRL ELISA Kit 96t
Cat. No: 0624-96 / Rev: C3 (1403/07/22)

مقدمه:

هورمون پرولاکتین (PRL) یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای حاوی ۱۹۸ اسید آمینه با ساختاری شبیه به هورمون رشد است که توسط سلول‌های لاکتوتروف در هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می‌شود و در تنظیم تولید هورمون‌های جنسی (استروژن در زنان و تستوسترون در مردان)، LH، FSH، رشد پستان و تولید شیر نقش دارد. در دوران بارداری میزان بالای پروژسترون مانع از ترشح شیر می‌شود ولی بلافاصله پس از زایمان و خروج جفت، با کاهش پروژسترون تولید شیر آغاز می‌گردد. از نظر بالینی، اندازه‌گیری PRL در تشخیص هایپرپرولاکتینمی و پیگیری درمان آن اهمیت دارد. مقادیر غیر طبیعی PRL در بیماری Bulimia، افزایش دوپامین، افزایش هورمون آزاد کننده تیروتروپین TRH در مراحل اولیه هیپوتیروئیدسم و یا به دنبال اثرات جانبی داروهای روان درمان مشاهده می‌شود. حیطة کاربرد PRL ELISA Kit اندازه‌گیری کمی پرولاکتین در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الیزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی‌حرکت سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد PRL صورت می‌گیرد. با قرار گرفتن نمونه سرم در معرض آنتی‌بادی متصل به بیوتین و آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ به سطح پلیت متصل می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوسیترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت پرولاکتین سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت پرولاکتین سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورهای (PRL Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) کونژوگه آنزیمی (PRL Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
- ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
- ۸) محلول کنترل (PRL Control): ویال‌های (۰/۵ میلی‌لیتری). برچسب مخصوص پلیت: ۱ ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
- ۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.
- ۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
 - ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
 - ۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
- آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:**
- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن‌را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

- ۲) آماده سازی محلول رنگزا: 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.






روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- ۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت^۱ اقدام نمایید.
- ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

¹ <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

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

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- 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 خواهشمند است با شماره‌های مندرج در روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

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

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸ کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹-۲۳

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

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

No.	Sample (ng/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	19.3	99.3	98.4	98	97.6
2	26.8	98.5	97.2	98.6	99.3
3	37.9	97.4	102.4	98	98

۵) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز PRL مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب تعیین گردیده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

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

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با 0.2 ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

غلظت PRL تا 2200 ng/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

۸) بررسی پایداری (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.

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

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within-Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/mL)	5.33	11.82	23.40
SD (ng/mL)	0.29	0.57	0.87
CV (%)	5.4	4.8	3.7

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین دور (Between-Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PRL (ng/mL)	4.91	14.56	29.47
SD (ng/mL)	0.29	0.75	1.28
CV (%)	5.9	5.1	4.3

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به عنوان یک نمونه، غلظت PRL در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش تغییر کمتر از ۱۰ درصد نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

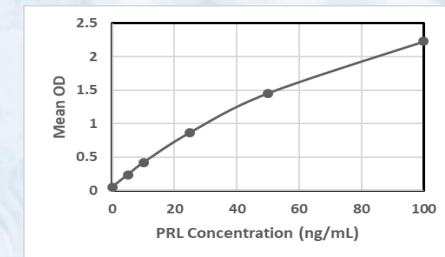
No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	3.42	19.20	11.31	11.96	105.7
2	8.73	19.20	13.96	13.74	98.4
3	3.42	8.73	6.07	6.15	101.3

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان آنکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) 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 طول موج رفرانس 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	0.049	0.05	0
	B1	0.051		
Cal. B	C1	0.231	0.234	5
	D1	0.237		
Cal. C	E1	0.409	0.416	10
	F1	0.423		
Cal. D	G1	0.857	0.866	25
	H1	0.875		
Cal. E	A2	1.448	1.454	50
	B2	1.460		
Cal. F	C2	2.219	2.231	100
	D2	2.243		



مقادیر مورد انتظار برای تست PRL به روش الیزا

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.