PRL (IRMA)

کیت تشخیصی رادیوایمونومتریک اسی پرولاکتین

مقدمه :

پرولاکتین هورمونی پروتئینی است که در جانوران مختلف تنوع زیادی دارد مثلا در ماهی ها **پرولاکتین** *A* و *B* وجود دارد. این هورمون توسط سلولهای لاکتوتروف در قسمت قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. هر چند در میومتر رحم ، پستان، گلبولهای سفید و پروستات نیز تولید می شود. ترشح ضربانداز پرولاکتین با آزاد شدن هورمون هایی از هیپوتالاموس تنظیم می‌شود. به نظر می‌رسد دوپامین با اثر بر گیرنده های *D2* عامل مهارکننده اصلی ترشح پرولاکتین است. هورمون آزادکننده تیروتروپین *(TRH)* ، غذا خوردن و درمان با استروژن موجب تحریک ترشح پرولاکتین می شوند. در کم‌کاری تیروئید افزایش تولید پرولاکتین دیده می‌شود. مانند سایر هورمون‌های مترشحه از آدنوهیپوفیز، ترشح پرولاکتین نیز طی شبانه روز تغییر دارد **(حداکثر ترشح آن طی خواب و حداقل آن بین *10* صبح تا *12* ظهر است).**

اساس روش اندازه گیری :

کیت رادیوایمونومتریک اسی سنجش *PRL* بر اساس واکنش غیر رقابتی تک مرحله ای می باشد. در این آزمایش از دو آنتی بادی *PRL* مونوکلونال بسیار اختصاصی با توانایی تشخیص دو ملکول اپیتوپ متفاوت استفاده می شود. یک آنتی بادی که بصورت فاز جامد *COAT* شده در لوله و دیگری بعنوان *TRACER* استفاده می شود. هر دوی این آنتی بادی ها همزمان با آنتی ژن های *PRL* موجود در استاندارد، سرم کنترل و نمونه واکنش می دهند. مواد غیر اختصاصی در مرحله شستشو از واکنش خارج می شوند میزان فرم اکتیویته موجود در لوله با غلظت *PRL* نمونه رابطه مستقیم دارد. استانداردهای*PRL* با غلظت مشخص همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش در مقابل غلظت *PRL* ، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

محتویات کیت :

Kit Contents	*Quantity (100T)*
1.Coated Tubes *Main : Anti – PRL monoclonal antibody* *Diluent solution : PBS* *Protein Stablizer : BSA*	*100 Tubes* *(50EA/Rack×2)*
2. I 125 Tracer *Main: Anti – PRL monoclonal antibody* *Labelled with I 125* *Diluent solution : BSA – PBS* *Preservative : %0.1 Sodium Azide*	*20ml×1vial* *Radioactivity 814 KBq* *(Ready to use)*
3.Standards : *(Range: 0, 2.5 ,5 ,25 ,50 ,100 ,200 ng/ml)* *Main : PRL of each concentration* *Diluent solution : BSA – PBS* *Preservative : %0.1 Sodium Azide*	*1 ml × 7 vials* *(Ready to use)*
4.Control Serum *Main : PRL of 8.7-12.4 ng/ml* *Diluent solution : BSA – PBS* *Preservative : %0.1 Sodium Azide*	*1 ml × 1 vials* *(Ready to use)*

نکات قابل توجه :

۱- **در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر *HBS AG* و *HIV* منفی می باشند.**

۲- **از استفاده مواد بعد از تاریخ انقضاء خود داری فرمائید.**

۳- **از مخلوط کردن با کیت های تاریخ گذشته اجتناب ورزید.**

۴- **درب ظروف را بدرستی بر روی ویال خود ببندید.**

۵- **از لباس و دستکش یکبار مصرف برای کار با مواد رادیو اکتیو استفاده کنید.**

۶- **لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیویته را بوسیله روش های مراقبت در برابر اشعه و روش های ایمن شستشو و پسماند نمایید.**

۷- **معرف ها باید قبل از مصرف به دمای اتاق یا محیط برسند.**

۸- **هرگز محلول کیت هایی که دارای *LOT* متفاوتی هستند با هم مخلوط نکنید.**

تهیه و جمع آوری نمونه :

این تست را می توان مستقیم بر روی نمونه های سرم انسانی یا پلاسما انجام داد ولی تأکید می شود. اگر قرار است آزمایش در طی ۳-۲ روز بعد انجام شود بهتر است در یخچال در دماهای **۸-۲ درجه** سانتیگراد و اگر برای اهداف طولانی مدت ۱۵-۱۰ روز می باشد باید در دمای **۲۰- درجه** سانتیگراد نگهداری شود. از انجماد و ذوب مکرر خودداری شود. برای جلوگیری از ایجاد واکنش های تداخل گر برای هر تست از یک سمپلر استفاده کنید معرف ها باید قبل از آزمایش به مدت **۳۰ دقیقه** در دمای محیط قرار بگیرند. بهتر است که برای انجام آزمایش بصورت دوبل یا دوتایی استفاده شود و از میانگین آنها به جواب صحیح برسید .

اثر هوک :

زمانیکه نمونه های حاوی غلظت های بالای آنتی ژن *PRL* بصورت رقیق نشده با این روش آزمایش می شوند در اثر پدیده هوک مقادیر پائین تر از غلظت حقیقی بدست می آید. در این کیت پدیده هوک تا میزان *2000 ng/ml* دیده نشد .

محاسبه نتایج :

۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (**محور***Y*) و غلظت مشخص آنها (**محور***X*) بر روی کاغذ میلیمتری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورید و روی **محور** *Y* جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی استاندارد وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر **محور** *X* ها ایجاد می شود که بیانگر میزان غلظت نمونه است.

مقادیر طبیعی :

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایش های مکرر به روش رادیو ایمونومتریک اسی بدست آمده است به قرار زیر است :

PRL	*Median (ng/ml)*	*Central 95% Range (ng/ml)*	*NO.*
Adult Male	*3.5*	*1.1 - 13*	*200*
Adult Female	*6.8*	*3.5 - 17.9*	*200*

حساسیت :

حداقل غلظت سرمی قابل اندازه گیری با این روش در مقایسه با استاندارد *0* میزان *0.022 ng/ml* است .

اختصاصی بودن :

در این تست علامت مشخصی از واکنش متقاطعی بین میزان بالای ***FSH –LH*** و ***TSH*** مشاهده نشده است.

دقت :

برای ارزیابی دقت تست اعم از تکرارپذیری و تولید دوباره (***inter and intra Assay***) روی **۳ سرم** با غلظت مشخص *PRL* انجام می شود.

Sample	*Intra assay*		*Inter assay*		*n*
	Mean ± SD (ng/ml)	*C.V (%)*	*Mean ± SD (ng/ml)*	*C.V (%)*	
1	*7.99 ± 0.11*	*1.34*	*8.02 ± 0.14*	*1.73*	*10*
2	*49.76 ± 0.68*	*1.38*	*49.70 ± 0.70*	*1.41*	
3	*129.46 ± 2.12*	*1.64*	*129.63 ± 1.79*	*1.38*	

****C.V(%) = S.D of Sample(ng/ml) / Mean of Sample(ng/ml) × 100***

ریکاوری:

برای بازیابی دو نمونه سرم با غلظت مشخص را به سه استاندارد مختلف (*5 –50 – 200 ng/ml*) اضافه می کنیم.

دو نمونه سرم : **حداقل غلظت *10 ng/ml* و غلظت بالا *175 ng/ml***

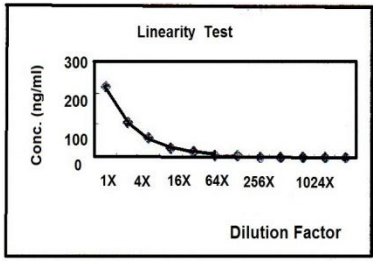
Sample (ng/ml)	*Added (ng/ml)*	*Expected Value (ng/ml)*	*Calculated Value (ng/ml)*	*Recovery (%)*
10.07	*5*	*7.53*	*7.76*	*103.05*
	50	*30.03*	*29.84*	*99.37*
	200	*105.03*	*104.40*	*99.40*
173.10	*5*	*89.05*	*89.19*	*100.15*
	50	*111.55*	*114.66*	*102.79*
	200	*186.55*	*183.03*	*98.11*

****Recovery = Calculated Value(ng/ml) / Expected value(ng/ml) × 100***

آزمایش خطی بودن :

با رقیق سازی یک نمونه سرم با محلول *BSA* به میزان ۵٪ نتایج زیر بدست آمده است:

Dilution Factor	*Conc. (ng/ml)*
Undiluted	*220.9*
1:2	*108.3*
1:4	*56.6*
1:8	*27.1*
1:16	*13.9*
1:32	*6.8*
1:64	*3.5*
1:128	*1.7*
1:256	*0.8*
1:512	*0.4*
1:1024	*0.2*
1:2048	*0.1*



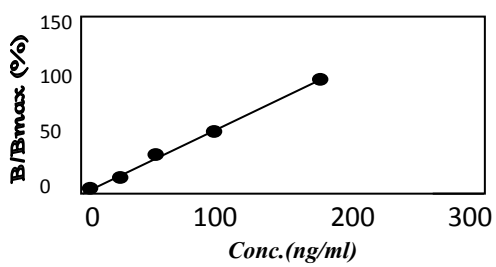
ng/ml × 100 = ng/dl

نمودار استاندارد :

برای محاسبه درصد اتصال رادیو اکتیویته کنترل، استاندارد و نمونه ها از فرمول زیر محاسبه می شوند:

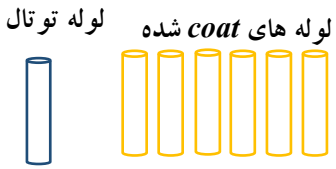
Description	*CPM*	*B/Bmax(%)*	*Conc. (ng/ml)*
Total Activity	*401171*		
Std 1 0 ng/ml	*192*	*0.1*	
Std 2 2.5 ng/ml	*1674*	*1*	
Std 3 5 ng/ml	*3915*	*2.4*	
Std 4 25 ng/ml	*19307*	*11.9*	
Std 5 50 ng/ml	*39649*	*24.5*	
Std 6 100 ng/ml	*84144*	*52.5*	
Std 7 200 ng/ml	*161967*	*100*	
Control Serum	*7856*	*4.9*	*10.12*

****B/Bmax = Solid phase CPM/ Standard 200(ng/ml) CPM × 100(%)***

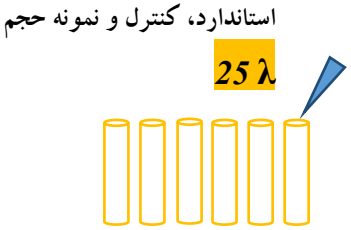


روش کار :

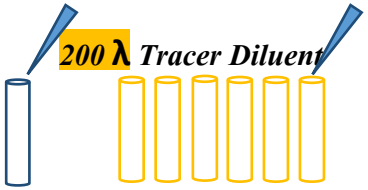
۱ تعداد لوله های کوت شده را برای استاندارد، کنترل و نمونه دوبل یا دوتایی قرار دهید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده می شود.



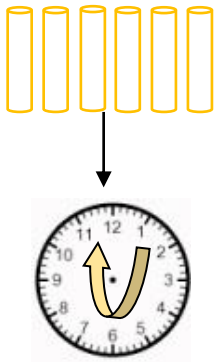
۲ 25λ از استانداردها، کنترل سرم و نمونه بیمار را به داخل هر لوله اضافه می کنیم. (به جز لوله توتال).



۳ 200 λ از ردیاب یا Tracer Diluent را به تمام لوله ها اضافه می کنیم.

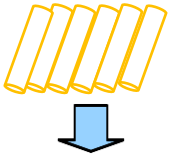


۴ حبابگیری : لوله ها را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده تا محتویات به خوبی مخلوط شوند و سپس لوله ها را روی شیکر rpm300 به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه نمایید.

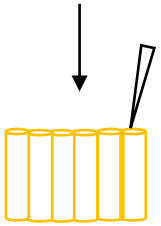


۶۰ دقیقه بر روی شیکر 300 RPM

۵ ابتدا محتویات لوله را تخلیه و سپس شستشو با حجم 2cc آب مقطر در دو نوبت انجام می شود.(به غیر از لوله توتال)



ابتدا تخلیه محتویات لوله



مرحله شستشو (۲ مرتبه)

۶ با استفاده از دستگاه گاماکانتر ظرف مدت ۱ دقیقه اکتیویته موجود در لوله ها خوانده می شود.

Gamma Counter Machine

برای تبدیل واحدها :

$ng/ml \times 100 = ng/dl$

$ng/ml \times 1.536 = nmol/l$

$nmol/l \times 0.651 = ng/ml$

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. 2:4.

	Used by	LOT	Batch code
	Temperature limitation Store between 2-8 °C	CONTROL	Control
	Caution, consult accompanying documents	CAL	Standard
	Biological risk	CT	Coated Tube
	Consult instructions for use	TRAC	Tracer
IVD	*In vitro* diagnostic medical device	WASHB	Wash Buffer
	Manufacturer		Radioactive material
REF	Catalogue number		

آدرس کارخانه :

شهرک صنعتی اشتهارد – بلوار ابوریحان بیرونی – بلوار غزالی غربی– لادن۲ – شرکت پادیاب طب

تلفن : ۹-۳۷۷۷۵۵۳۲ - ۰۲۶

فکس : 026 - 37775529

پشتیبانی فنی : ۰۹۱۲۸۹۳۰۰۴۸

دفتر مرکزی: تهران – ۲۴ متری سعادت آباد- خیابان یکم شرقی- خیابان شب بو شرقی- پلاک ۱۷- طبقه ۲

آدرس اینترنتی : www.padyabteb.com

ایمیل شرکت : info@padyabteb.com

Padyab Teb Diagnostics

شرکت پادیاب طب

تلفن سوالات فنی : ۰۹۱۲۸۹۳۰۰۴۸