

مقدمه

پرولاکتین پلی پپتیدی با وزن مولکولی ۲۳۰۰۰ دالتون است که توسط سلول های لاکتوتروپ هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می شود. سنتز و ترشح پرولاکتین توسط هورمون های هیپوتالاموسی ه ورمون رها کننده تیروتروپین (TRH) و فاکتور مهارکننده پرولاکتین (PIF) کنترل می شود. TRH با تحریک و PIF با مهار ترشح پرولاکتین عمل می کند.

پرولاکتین در سرم مردان و زنان طبیعی و برخی از مایعات بدن نظیر مایع مغزی نخاعی، منی و مایع آمنیوتیک وجود دارد. عملکرد فیزیولوژیک اصلی پرولاکتین تحریک رشد پستان و تولید شیر در زنان باردار است. در سه ماهه سوم بارداری غلظت پرولاکتین بطور قابل توجهی افزایش می یابد و بعد از زایمان تا پایان شیردهی نوزاد در سطح بالا باقی می ماند. شیردهی ترشح پرولاکتین را تحریک می کند که باعث تداوم تولید شیر و توقف شروع مجدد عادت ماهیانه می شود. سطوح بالای پرولاکتین با گالاکتوره (جریان خودبخودی شیر از پستان) و آمنوره (فقدان عادت ماهیانه) همراه است. در غیاب بارداری، هیپرپرولاکتین میا، گالاکتوره و آمنوره نشانه وجود یک فرایند پاتولوژیک است. شایع ترین علت این علائم تومورهای تولید کننده پرولاکتین هیپوفیز می باشد.

اساس روش اندازه گیری

کیت IRMA Prolactin موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو ساندویچی تهیه شده است. پرولاکتین موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (لوله ها) پوشش داده شده است و دیگری به ید- ۱۲۵ متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای پرولاکتین است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به ید-۱۲۵ اضافی خارج گردد. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور مستقیم با غلظت پرولاکتین در نمونه ها متناسب است. استانداردهای پرولاکتین با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش مقابل غلظت پرولاکتین، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

- ۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد پرولاکتین پوشش داده شده اند.
- ۲- ردیاب (آنتی بادی علیه پرولاکتین نشاندار شده با ید- ۱۲۵): یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استاندارد ها: ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد پرولاکتین با غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر (ng/ml) که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیمورسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.
- ۴- سرم کنترل: یک ویال آماده مصرف
- ۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X): یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

- ۱- سرپلر ۱۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه شمارنده گاما
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HIV و HbsAg منفی بوده اند.
- ۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.
- ۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- ۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسمایی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- ۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.
- ۴- در مواردی که مقدار پرولاکتین نمونه بیش از ۱۰۰ ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمایید.
- ۵- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.
- ۶- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته نمایید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

روش انجام آزمایش

- ۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.
- ۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.
- ۳- ۱۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.
- ۴- لوله ها بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.
- ۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمایید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن

لوله ها بر روی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم بر روی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۶- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

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

۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر شمارش ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (ng/ml)	شمارش (n=3)	B/T(%)
0	شمارش تام	220536	----
1	0	421	0.20
2	5	7477	3.61
3	10	14429	6.96
4	25	33289	16.07
5	50	65431	31.58
6	100	91701	44.26

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرم ال که توسط آزمایشات مکرر به روش IRMA بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

مردان	1.8 – 19.4 ng/ml
زنان قبل از یائسگی	2.6 – 20.5 ng/ml
زنان بعد از یائسگی	1.5 – 18.5 ng/ml
حاملگی	35 – 600 ng/ml

برای تبدیل واحدها به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$\text{ng/ml} = 0.0472 \times \text{mIU/L}$$

$$\text{mIU/L} = 21.2 \times \text{ng/ml}$$

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۵ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار پرولاکتین برابر ۱ ng/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	2.8	0.18	6.4
2	20	16.4	1.00	6.1
3	20	38.5	1.96	5.1

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	3.2	0.24	7.6
2	10	10.5	0.76	7.2
3	10	41.5	2.66	6.4

۳- ویژگی

واکنش متقاطع آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای hTSH، hLH و hFSH به ترتیب ۰/۱۳، ۰/۱۷ و ۰/۰۴ درصد بدست آمد. این مطالعه با اضافه کردن این پروتئین ها به استاندارد صفر به صورت دوتایی و در دو سری کاری تعیین گردید.

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت پرولاکتین در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	8.7	108	109	110
2	19.2	104	106	106
3	51.6	102	104	104

۵- اثر هوک

در این کیت، پدیده اثر هوک تا غلظت ۲۰۰۰ ng/ml دیده نشد.