



DCM011-12
Ed. 01/2015

PROLACTIN ELISA

per analisi di routine

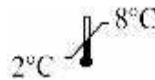
Determinazione immunoenzimatica diretta della Prolattina nel siero umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO011

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della Prolattina nel siero umano.

Il kit Prolactin ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La prolattina è un ormone polipeptidico sintetizzato e secreto dall'adeno-ipofisi (ghiandola pituitaria anteriore) e dalla placenta. Inoltre è prodotta in altri tessuti compresi il seno e la decidua. La secrezione pituitaria della prolattina è regolata dai neuroni neurosecretori della dopamina del nucleo arcuato, che inibiscono la secrezione della prolattina.

La prolattina è presente in parecchi fluidi fisiologici, compreso il plasma sanguigno, liquido amniotico, latte, secrezioni mucose e liquido cerebrospinale. La prolattina ha molti effetti, il principale è la stimolazione delle ghiandole mammarie per la produzione di latte (lattazione). Altre funzioni della prolattina includono la sintesi dell'agente tensioattivo dei polmoni fetali alla conclusione della gravidanza e dell'immuno-tolleranza del feto dall'organismo materno durante la gravidanza.

La prolattina può anche avere effetti inibitori sulla funzione gonadica una volta presente in alte concentrazioni.

La secrezione della prolattina presenta una regolarità ciclica giornaliera.

Durante la gravidanza, le alte concentrazioni di estrogeno circolante promuovono la sintesi della prolattina. Livelli elevati risultanti dalla secrezione della prolattina causano la maturazione delle ghiandole mammarie per la lattazione. Dopo il parto, i livelli della prolattina decadono poiché lo stimolo interno è rimosso.

Livelli elevati di prolattina tendono a sopprimere il ciclo ovulatorio inibendo la secrezione sia di FSH che di GnRH.

I livelli della prolattina possono essere controllati come componente di un workup degli ormoni sessuali, poiché la secrezione elevata di prolattina può sopprimere la secrezione di FSH e di GnRH, che conduce all'ipogonadismo ed, a volte, a disfunzioni erettili negli uomini.

Elevate concentrazioni di prolattina nel plasma si presentano durante ovulazione, la gravidanza e lo

sfuerzo. Livelli normali di prolattina nel plasma (iperprolattinemia) possono accadere come conseguenza degli adenomi pituitari, di altre anomalie anatomiche e traumatiche, in risposta a determinati agenti farmacologici e nell'ipotiroidismo.

L'ipoprolattinemia (bassi livelli della prolattina) è stata osservata in casi di ipopituitarismo.

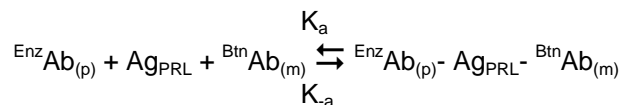
2. PRINCIPIO DEL METODO

I reagenti essenziali richiesti per il test immunoenzimatico includono anticorpi ad alta affinità e specificità (coniugati con enzima e immobilizzati) con riconoscimento di epitopi diversi e distinti, in eccesso, e antigene nativo.

In questo procedimento l'immobilizzazione si verifica durante il test sulla superficie dei pozzetti della micropietra attraverso l'interazione della streptavidina fissata sui pozzetti e dell'anticorpo anti-PRL biotinilato aggiunto.

Mescolando l'anticorpo biotinilato, l'anticorpo coniugato con enzima e un siero contenente l'antigene nativo, si verifica la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi, senza competizione e ingombro sterico, per formare un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

Ag_{PRL} = Antigene PRL nativo (quantità variabile)

$\text{Enz}^{\text{Ab}}_{(p)}$ = Anticorpo policlonale marcato con enzima (quantità in eccesso)

$\text{Enz}^{\text{Ab}}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Complesso sandwich Antigene-Anticorpi

K_a = Costante di associazione

K_{-a} = Costante di dissociazione

Contemporaneamente il complesso si fissa sul pozzetto tramite la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato.

Questa interazione è descritta di seguito:

$\text{EnzAb}_{(p)}\text{-Ag}_{\text{PRL}}\text{-}^{\text{Bln}}\text{Ab}_{(m)} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \Rightarrow \text{Immobilized complex}$

$\text{Streptavidin}_{\text{CW}} = \text{Streptavidina immobilizzata sul pozzetto}$

$\text{Immobilized complex} = \text{Complesso sandwich Antigene-Anticorpi}$

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione di Antigene legata all'anticorpo viene separata dall'antigene libero per decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica della frazione legata è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo. Utilizzando diversi sieri di riferimento con valori noti di antigene è possibile costruire una curva dose-risposta sulla quale determinare la concentrazione dell'antigene di campioni ignoti.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

| | | |
|------|------------|----------------------|
| CAL0 | REF | DCE002/1106-0 |
| CAL1 | REF | DCE002/1107-0 |
| CAL2 | REF | DCE002/1108-0 |
| CAL3 | REF | DCE002/1109-0 |
| CAL4 | REF | DCE002/1110-0 |
| CAL5 | REF | DCE002/1111-0 |

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del controllo è riportata sul Certificato di Analisi **REF** **DCE045/1103-0**

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpi Anti Prolattina coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e Anti Prolattina biotinilato

REF **DCE002/1102-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastra

REF **DCE002/1103-0**

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF **DCE004-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF **DCE005-0**

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF** **DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 20°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Prolattina da 5,0 ng/mL a 100,0 ng/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si

raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 3rd IS 84/500 ed hanno le seguenti concentrazioni:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 0 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti, i Calibratori sono stabili per 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni. Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.3. Preparazione del campione

La determinazione della Prolattina si effettua su siero umano. **Non utilizzare plasma per questo dosaggio** (l'utilizzo di plasma può portare a valori alterati del dosaggio).

Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici. Per ottenere il siero, raccogliere il sangue venoso, far coagulare, infine separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata.

I campioni possono essere conservati per brevi periodi (massimo due giorni) a 2-8°C. Per periodi di conservazione più lunghi congelare a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento. I campioni congelati devono essere miscelati molto bene prima dell'uso.

Per campioni con concentrazione superiore a 100 ng/mL diluire il campione 1:2 con il Calibratore 0. Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

| Reagenti | Calibratore | Campioni/ Controllo | Bianco |
|---|-------------|------------------------|--------|
| Campioni/ Controllo | | 50 µL | |
| Calibratore C ₀ -C ₅ | 50 µL | | |
| Coniugato | 100 µL | 100 µL | |
| Incubare 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. | | | |
| Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. | | | |
| Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi. | | | |
| TMB Substrato | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22±28°C), al riparo dalla luce. | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti. | | | |

7. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Prolattina per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i

limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti del kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza (Em) in funzione delle concentrazioni degli calibratore (C₀-C₅) (es: Four Parameter Logistic o Sigmoide).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio range basandosi sulla popolazione dei pazienti.

I valori serici di Prolattina sono compresi nei seguenti intervalli:

| Campioni | | Range ng/mL |
|----------|-----------------|-------------|
| Uomini | | 1,8 - 17,0 |
| Donne: | ciclo mestruale | 1,2 - 19,5 |
| | Menopausa | 1,5 - 18,5 |

Alcuni campioni femminili testati in questo gruppo probabilmente usano contraccettivi orali, che possono aver influenzato i risultati.

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo.

| Sample | N | X | σ | C.V. |
|---------|----|-------|------|-------|
| Level 1 | 20 | 5,33 | 0,15 | 2,78% |
| Level 2 | 20 | 18,21 | 0,73 | 4,03% |
| Level 3 | 20 | 37,20 | 1,38 | 3,71% |

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi.

| Sample | N | X | σ | C.V. |
|---------|----|-------|------|-------|
| Level 1 | 10 | 5,46 | 0,30 | 5,49% |
| Level 2 | 10 | 17,72 | 0,91 | 5,16% |
| Level 3 | 10 | 36,29 | 1,67 | 4,60% |

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di Prolattina misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,12 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 3,13 - 6,25 - 12,50 - 25,00 - 50,00 ng/mL di Prolattina, ha dato un valore medio (±SD) di 102,52% ± 9,75%.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 - 16 volte ha dato un valore medio (± SD) di 102,19% ± 9,80%.

10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

| | |
|------------|------|
| hProlactin | 100% |
| LH | N.D. |
| FSH | N.D. |
| hCG | N.D. |
| TSH | N.D. |
| hGH | N.D. |

10.5. Correlazione

Il kit Prolactin ELISA Diametra (y) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (x). Sono stati testati i campioni di siero di 37 soggetti.

La curva di regressione è:

$$y = 1,01 x + 1,94$$

$$r^2 = 0,957$$

Il nuovo kit Prolactin ELISA Diametra (y) è stato comparato con il vecchio kit Prolactin Diametra (x). Sono stati testati i campioni di siero di 37 soggetti.

La curva di regressione è:

$$y = 0,85 x + 2,58$$

$$r^2 = 0,937$$

10.6. Effetto Hook

Il kit Prolactin ELISA Diametra non presenta effetto Hook fino a 200 ng/mL.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 203 (1974).
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 203 – 205 (1974).
- Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981)
- Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
- Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)

Ed. 01/2015

DCM011-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM011-12
Ed. 01/2015

PROLACTIN ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Prolactin in human serum.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO011

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Prolactin concentration in human serum.

Prolactin ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Prolactin is a polypeptide hormone synthesized and secreted by the Adenohypophysis (anterior Pituitary gland) and the placenta. It is also produced in other tissues including the breast and the decidua. Pituitary prolactin secretion is regulated by neuroendocrine neurons in the hypothalamus, most importantly by neurosecretory dopamine neurons of the arcuate nucleus, which inhibit prolactin secretion.

Prolactin is present in several body fluids, including blood plasma, amniotic fluid, milk, mucosal secretions and cerebrospinal fluid.

Prolactin has many effects, the most important of which is to stimulate the mammary glands to produce milk (lactation). Other possible functions of prolactin include the surfactant synthesis of the fetal lungs at the end of the pregnancy and immune tolerance of the foetus by the maternal organism during pregnancy.

Prolactin may also have inhibitory effects on gonadal function when present in high concentrations.

There is a diurnal cycle in prolactin secretion.

During pregnancy, high circulating concentrations of estrogen promote prolactin production. The resulting high levels of prolactin secretion cause maturation of the mammary glands, preparing them for lactation. After childbirth, prolactin levels fall as the internal stimulus for them is removed.

High prolactin levels also tend to suppress the ovulatory cycle by inhibiting the secretion of both FSH and GnRH.

Prolactin levels may be checked as part of a sex hormone workup, as elevated prolactin secretion can suppress the secretion of FSH and GnRH, leading to hypogonadism, and sometimes causing erectile dysfunction in men.

Elevations in plasma prolactin concentrations occur during ovulation, pregnancy, nursing and stress. Abnormal elevations in plasma prolactin levels (hyperprolactinemia) can occur as a result of pituitary adenomas, other anatomic and traumatic

abnormalities, in response to certain pharmacologic agents and in hypothyroidism.

Hypoprolactinemia (low prolactin levels) are observed in cases of hypopituitarism.

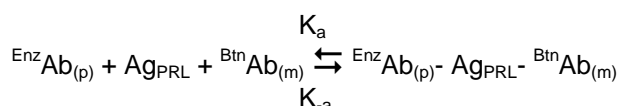
2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this procedure the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti-PRL antibody.

Upon mixing monoclonal biotinylated antibody, the enzyme labeled antibody and a serum containing the native antigen, a reaction results between the native antigen and the antibodies without competition or steric hindrance to form a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess quantity)

Ag_{PRL} = Native PRL antigen (variable quantity)

$\text{EnzAb}_{(p)}$ = Enzyme labeled polyclonal antibody (Excess quantity)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Antigen-Antibodies Sandwich complex

K_a = Rate constant of association

K_a = Rate constant of disassociation

Simultaneously the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:



Streptavidin_{cw} = Streptavidin immobilized on well
Immobilized complex = Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. By using several different serum references of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

| | | |
|------|------------|----------------------|
| CAL0 | REF | DCE002/1106-0 |
| CAL1 | REF | DCE002/1107-0 |
| CAL2 | REF | DCE002/1108-0 |
| CAL3 | REF | DCE002/1109-0 |
| CAL4 | REF | DCE002/1110-0 |
| CAL5 | REF | DCE002/1111-0 |

2. Control (1 vial, 1 mL)

Control Concentration is indicated on the Certificate of Analysis **REF** **DCE045/1103-0**

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibodies Anti Prolactin conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) and Anti Prolactin biotinylated **REF** **DCE002/1102-0**

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Streptavidin adsorbed on microplate **REF** **DCE002/1103-0**

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact) **REF** **DCE004-0**

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact) **REF** **DCE005-0**

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4 **REF** **DCE054-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Prolactin from 5.0 to 100.0 ng/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.

- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against WHO 3rd IS 84/500 and have the following concentrations:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 0 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.3. Preparation of the Sample

Prolactin determination can be done on human serum. **Do not use plasma for this assay** (plasma samples can lead to false results).

Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.

To obtain the serum, collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred.

Specimen can be stored at 2÷8°C for at short time (max two days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

For sample with concentration over 100 ng/mL dilute the sample 1:2 with Calibrator 0.

The Control is ready for use.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.

- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

| Reagent | Calibrator | Sample/Control | Blank |
|--|------------|----------------|--------|
| Sample/Control | | 50 µL | |
| Calibrator C ₀ -C ₅ | 50 µL | | |
| Conjugate | 100 µL | 100 µL | |
| Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hours. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times. | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark. | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes. | | | |

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Prolactin for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (Em) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (Es: Four Parameter Logistic or Sigmoide).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9. REFERENCE VALUES

Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population.

The serum Prolactin values are comprised in the following intervals:

| Sample | | Range ng/mL |
|---------|-----------------|-------------|
| Male | | 1.8 - 17.0 |
| Female: | menstrual cycle | 1.2 - 19.5 |
| | menopause | 1.5 - 18.5 |

Some of the female population tested in this group were probably using oral contraceptives, which may affect results.

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in one assay.

| Sample | N | X | σ | C.V. |
|---------|----|-------|------|-------|
| Level 1 | 20 | 5.33 | 0.15 | 2.78% |
| Level 2 | 20 | 18.21 | 0.73 | 4.03% |
| Level 3 | 20 | 37.20 | 1.38 | 3.71% |

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera with kits of different lots.

| Sample | N | X | σ | C.V. |
|---------|----|-------|------|-------|
| Level 1 | 10 | 5.46 | 0.30 | 5.49% |
| Level 2 | 10 | 17.72 | 0.91 | 5.16% |
| Level 3 | 10 | 36.29 | 1.67 | 4.60% |

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Prolactin that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.12 ng/mL at the 95 % confidence limit.

10.3. Accuracy

The recovery of 3,13 - 6,25 - 12,50 - 25,00 - 50,00 ng/mL of Prolactin added to sample gave an average value (±SD) of 102.52% ± 9.75% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 - 16 times gave an average value (±SD) of 102.19% ± 9.80%.

10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

| | |
|------------|------|
| hProlactin | 100% |
| LH | N.D. |
| FSH | N.D. |
| hCG | N.D. |
| TSH | N.D. |
| hGH | N.D. |

10.5. Correlation

Diametra Prolactin ELISA kit (y) was compared to another commercially available Prolactin assay (x). Serum samples of 37 subjects were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.01 x + 1.94$$

$$r^2 = 0.957$$

The new Diametra Prolactin ELISA kit (y) was compared to the old Diametra Prolactin ELISA kit (x). Serum samples of 37 subjects were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.85 x + 2.58$$

$$r^2 = 0.937$$

10.6. Hook Effect

Diametra Prolactin assay shows no Hook effect up to 200 ng/mL.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 202 (1974).
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 203 – 205 (1974).
- Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E., J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
- Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
- Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)

Ed. 01/2015

DCM011-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM011-12
Ed. 01/2015

PROLACTIN ELISA

para análisis de rutina

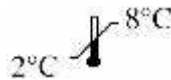
Determinación inmunoenzimática directa de la prolactina en suero humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO011

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de prolactina en suero humano.

El kit Prolactin ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La prolactina es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por la adenohipófisis (glándula pituitaria anterior) y la placenta. También se produce en otros tejidos, incluyendo el pecho y la decidua. La secreción pituitaria de prolactina está regulada por las neuronas neurosecretoras de dopamina del núcleo arqueado, que inhiben la secreción de prolactina.

La prolactina está presente en varios fluidos fisiológicos, incluyendo el plasma sanguíneo, el líquido amniótico, la leche, las secreciones mucosas y el líquido cefalorraquídeo. La prolactina tiene numerosos efectos, el principal es la estimulación de las glándulas mamarias para la producción de leche (lactancia). Entre otras funciones de la prolactina se incluyen la síntesis del agente tensioactivo de los pulmones fetales al final del embarazo y de la inmunotolerancia del feto del organismo materno durante el embarazo.

La prolactina también puede tener efectos inhibidores sobre la función de las gonadas cuando está presente en altas concentraciones.

La secreción de la prolactina presenta una regularidad cíclica diaria.

Durante el embarazo, las altas concentraciones de estrógeno circulante promueven la síntesis de prolactina. Los niveles elevados resultantes de la secreción de prolactina causan la maduración de las glándulas mamarias para la lactancia. Después del parto, los niveles de prolactina disminuyen puesto que el estímulo interno desaparece.

Los niveles elevados de prolactina tienden a suprimir el ciclo ovulatorio inhibiendo la secreción de FSH o de GnRH.

Los niveles de prolactina se pueden controlar como componente de un diagnóstico diferencial de las hormonas sexuales, puesto que la secreción elevada de prolactina puede suprimir la secreción de FSH y de GnRH, dando lugar a hipogonadismo y, en ocasiones, a disfunción eréctil en los hombres.

Se presentan altas concentraciones de prolactina en el plasma durante la ovulación, el embarazo y el estrés. Niveles normales de prolactina en plasma (hiperprolactinemia) pueden aparecer como consecuencia de adenomas pituitarios, de otras anomalías anatómicas y traumáticas, como respuesta a determinados agentes farmacológicos y en el hipotiroidismo. Se ha observado hipoprolactinemia (bajos niveles de prolactina) en casos de hipopituitarismo.

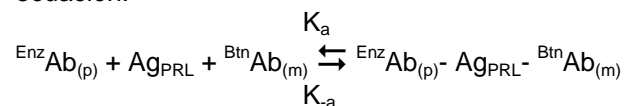
2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los reactivos esenciales requeridos para el ensayo inmunoenzimático incluyen anticuerpos con alta afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados) con reconocimiento de epítopos distintos, en exceso, y antígeno nativo.

En este procedimiento, la inmovilización se produce durante el ensayo en la superficie de los pocillos de la microplaca mediante la interacción de la estreptavidina fijada en los pocillos y el anticuerpo anti-PRL biotinilado añadido.

Mezclando el anticuerpo biotinilado, el anticuerpo conjugado con enzima y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = anticuerpo biotinilado monoclonal (cantidad en exceso)

Ag_{PRL} = antígeno PRL nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAb}_{(p)}$ = anticuerpo policlonal marcado con enzima (cantidad en exceso)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

K_a = constante de asociación

K_{-a} = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se fija en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado.

Esta interacción se describe a continuación:

$\text{EnzAb}_{(p)}\text{-Ag}_{\text{PRL}}\text{-}^{\text{Btn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{estreptavidina}_{\text{cw}} \Rightarrow \text{complejo inmovilizado}$

$\text{Estreptavidina}_{\text{cw}} = \text{estreptavidina inmovilizada en el pocillo}$

$\text{Complejo inmovilizado} = \text{complejo sándwich antígeno-anticuerpos}$

Tras lograr el equilibrio, la fracción de antígeno unida al anticuerpo se separa del antígeno libre mediante decantación o aspiración.

La actividad enzimática de la fracción unida es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo.

Usando distintos sueros de referencia con valores conocidos de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración del antígeno de muestras desconocidas.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

| | |
|------|-------------------|
| CAL0 | REF DCE002/1106-0 |
| CAL1 | REF DCE002/1107-0 |
| CAL2 | REF DCE002/1108-0 |
| CAL3 | REF DCE002/1109-0 |
| CAL4 | REF DCE002/1110-0 |
| CAL5 | REF DCE002/1111-0 |

2. Control (1 frascos, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/1103-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti-prolactina conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti-prolactina biotinilado

REF DCE002/1102-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/1103-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0.2M pH 7.4 REF DCE054-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 20±8°C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura

ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de prolactina de 5,0 ng/mL a 100,0 ng/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los

sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.

- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al WHO 3rd IS 84/500, y tienen las siguientes concentraciones:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 0 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los calibradores permanecen estables al menos 6 meses a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.3. Preparación de la muestra

La determinación de la prolactina se realiza en suero humano. **No utilizar plasma.**

No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas. La obtención de la muestra es por extracción de sangre venosa, dejar

coagular y separar por centrifugado, recuperar el suero.

Si la dosificación no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20°C. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para muestras con una concentración superior a 100 ng/mL, diluir 1:2 la muestra con Calibrador 0.

El Control está listo para usar.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

| Reactivos | Calibrador | Muestras /Control | Blanco |
|--|------------|-------------------|--------|
| Muestras /Control | | 50 µL | |
| Calibrador C ₀ -C ₅ | 50 µL | | |
| Conjugado | 100 µL | 100 µL | |
| Incubar 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéeela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces. | | | |
| Substrato TMB | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28°C), protegida de la luz. | | | |
| Solución de parada | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos. | | | |

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de prolactina para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (Em) en función de las concentraciones de los calibradores (C₀-C₅) (p. ej.: logística de cuatro parámetros o sigmoideo).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

Los valores séricos de prolactina se incluyen en los siguientes intervalos:

| Muestras | Rango ng/mL |
|-----------------|----------------------------|
| Hombres | 1,8 - 17,0 |
| Mujeres: | ciclo menstrual 1,2 - 19,5 |
| | Menopausia 1,5 - 18,5 |

Algunas muestras femeninas comprobadas en este grupo probablemente usan anticonceptivos orales que pueden haber influido en los resultados.

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos.

| Muestra | N | X | σ | C.V. |
|---------|----|-------|------|-------|
| Nivel 1 | 20 | 5.33 | 0.15 | 2.78% |
| Nivel 2 | 20 | 18.21 | 0.73 | 4.03% |
| Nivel 3 | 20 | 37.20 | 1.38 | 3.71% |

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos.

| Muestra | N | X | σ | C.V. |
|---------|----|-------|------|-------|
| Nivel 1 | 10 | 5.46 | 0.30 | 5.49% |
| Nivel 2 | 10 | 17.72 | 0.91 | 5.16% |
| Nivel 3 | 10 | 36.29 | 1.67 | 4.60% |

10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de prolactina medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,12 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.3. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 3.13 - 6.25 - 12.50 - 25.00 - 50.00 ng/mL de prolactina ha dado un valor medio (±DE) de 102.52% ± 9.75%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces dio una media (± DE) de 102.19% ± 9.80%.

10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

| | |
|---------------|------|
| h. prolactina | 100% |
| LH | N.D. |
| FSH | N.D. |
| hCG | N.D. |
| TSH | N.D. |
| hGH | N.D. |

10.5. Correlación

El kit Prolactin ELISA (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 37 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 1.01 * (\text{ensayo comercial}) + 1.94$$
$$r^2 = 0,957$$

El kit Prolactin ELISA Diametra (Y) se ha comparado con el kit Prolactin ELISA Diametra del método anterior (X). Se probaron 37 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0,85 * X + 2.58$$
$$r^2 = 0,937$$

10.6. Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 200 mIU/mL.

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 205 (1974).
- Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E., J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
- Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
- Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)

Ed. 01/2015

DCM011-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

| | | | | | |
|--|----------------------------------|---|--|----------------------------------|--|
|  | DE ES FR GB IT PT | In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro |  | DE ES FR GB IT PT | Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por |
|  | DE ES FR GB IT PT | Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento |  yyyy-mm | DE ES FR GB IT PT | Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção |
|  yyyy-mm-dd | DE ES FR GB IT PT | Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês) |  | DE ES FR GB IT PT | Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico |
|  | DE ES FR GB IT PT | Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso | LOT | DE ES FR GB IT PT | Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote |
|  $\Sigma = xx$ | DE ES FR GB IT PT | Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes | CONT | DE ES FR GB IT PT | Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit |
|  Max Min | DE ES FR GB IT PT | Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação | REF | DE ES FR GB IT PT | Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo |
|  | DE ES FR GB IT PT | Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar | | | |

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs