



PRL-ELISA

KAPD1291

LOT : 151208/1



PRL ELISA

en

KAPD1291

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA-Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium-Tel: +32 10 84 99 11-Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DIAsource Prolactin ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Prolactin in serum.

1.2 Summary and Explanation

Human prolactin (lactogenic hormone) is secreted from the anterior pituitary gland in both men and women (1). Human prolactin is a single chain polypeptide hormone with a molecular weight of approximately 23.000 daltons (2). The release and synthesis of prolactin is under neuroendocrinal control, primarily through Prolactin Releasing Factor and Prolactin Inhibiting Factor (3).

Women normally have slightly higher basal prolactin levels than men; apparently, there is an estrogen- related rise at puberty and a corresponding decrease at menopause. The primary functions of prolactin are to initiate breast development and to maintain lactation. Prolactin also suppresses gonadal function (4,5).

During pregnancy, prolactin levels increase progressively to between 10 and 20 times normal values, declining to non-pregnant levels by 3-4 weeks post- partum (4). Breast feeding mothers maintain high levels of prolactin, and it may take several months for serum concentrations to return to non-pregnant levels (3,4).

The determination of prolactin concentration is helpful in diagnosing hypothalamic- pituitary disorders (3,4). Microadenomas (small pituitary tumors) may cause hyperprolactinemia, which is sometimes associated with male impotence (6). High prolactin levels are commonly associated with galactorrhea and amenorrhea.

Prolactin concentrations have been shown to be increased by estrogens, thyrotropin- releasing hormone (TRH), and several drugs affecting dopaminergic mechanisms (7,8,9,10). Prolactin levels are elevated in renal disease and hypothyroidism, and in some situations of stress, exercise, and hypoglycemia. Additionally, the release of prolactin is episodic and demonstrates diurnal variation (11). Mildly elevated prolactin concentrations should be evaluated taking these considerations into account. Prolactin concentrations may also be increased by drugs such as chlorpromazine and reserpine, and may be lowered by bromocryptine and L-dopa (12).

The DIAsource Prolactin ELISA provides a rapid, sensitive, and a reliable assay. The antibodies developed for the test will determine a minimal concentration of human prolactin of 0.35 ng/mL. There is no cross-reactivity with hCG, TSH, LH, FSH, or hGH.

2 PRINCIPLE OF TEST

The DIAsource Prolactin ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards a unique antigenic site on a Prolactin molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous Prolactin is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-Prolactin antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of Prolactin in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of Prolactin in the patient sample.


3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.

16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DIAsource.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1.  **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells.
Wells coated with anti-Prolactin monoclonal antibody.
2.

CAL	N
-----	---

Prolactin Calibrators. N= 0 to 5, 6 vials (lyophilized), 1 mL
Concentrations : 0 ; 5; 20; 50; 100 ; 200 ng/mL
Conversion : 1 ng/mL = 21.1 mIU/L
The calibrators are calibrated against WHO 3rd International Calibrator for Prolactin IRP (84/500)
See "Preparation of Reagents"
Contain non-mercury preservative.
3.

Ab	HRP
----	-----

Enzyme Conjugate, 1 vial, 11 mL. Ready to use.
Anti-Prolactin antibody conjugated to horseradish peroxidase.
Contain non-mercury preservative.
4.

CHROM	TMB
-------	-----

Substrate Solution, 1 vial, 14 mL. Ready to use.
Tetramethylbenzidine (TMB)
5.

STOP	SOLN
------	------

Stop Solution, 1 vial, 14 mL. Ready to use.
Contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Note: Additional *Calibrator 0* for sample dilution is available on request.

4.2 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Aqua dest.
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagents Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use

Calibrators

Reconstitute the lyophilized contents of the calibrator vial with 1 mL Aqua dest.

Note: *The reconstituted calibrators are stable for 2 months at 2 °C - 8 °C. For longer storage freeze at -20°C.*

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DIAsource has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum should be used in this assay.

(The use of EDTA- or Heparin samples may lead to increased values while the use of citrate plasma may lead to decreased values.)

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C - 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Pipetting of all calibrators, samples, and controls should be completed within 6 minutes. (Note this especially for manual pipetting.)

6.2 Test Procedure

Each run must include a calibration curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **25 µL** of each *Calibrator*, *Control* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 5 times with distilled water (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL** of *Substrate Solution* to each well.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of *Stop Solution* to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted or reported as > 200 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/mL)	0.04
Calibrator 1 (5 ng/mL)	0.13
Calibrator 2 (20 ng/mL)	0.40
Calibrator 3 (50 ng/mL)	0.80
Calibrator 4 (100 ng/mL)	1.34
Calibrator 5 (200 ng/mL)	1.92

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DIAsource Prolactin ELISA the following values are observed:

Population	Mean (ng/mL)	S.D. (ng/mL)	5% Percentile (ng/mL)	95% Percentile (ng/mL)
Males	6.44	5.50	0.94	20.94
Females	14.27	5.88	2.39	25.15

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DIAsource directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.35 – 200 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Hormone Tested	Concentration	Produced Color Intensity Equivalent to Prolactin in Serum(ng/mL)
hCG (WHO 1 st IRP 75/537)	62,500 mIU/mL	0
	125,000 mIU/mL	0
	250,000 mIU/mL	0
	500,000 mIU/mL	0
TSH (WHO 2 nd IRP 80/558)	250 µIU/mL	0
	500 µIU/mL	0
LH (WHO 1 st IRP 68/40)	500 mIU/mL	0
	1000 mIU/mL	0
FSH (WHO 2 nd IRP-HMG)	250 mIU/mL	0
	500 mIU/mL	0
hGH (WHO 1 st IRP 66/217)	1000 µg/mL	2.5

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DIAsource ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of *Calibrator 0* and was found to be 0.35 ng/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	1	2	3
Mean (ng/mL)	6.16	14.10	32.48
SD (ng/mL)	0.28	0.41	1.91
CV (%)	4.58	2.91	5.87
n =	10	10	10

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	1	2	3
Mean (ng/mL)	5.96	12.64	25.99
SD (ng/mL)	0.37	0.71	1.53
CV (%)	6.22	5.64	5.90
n =	12	12	12

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Prolactin solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Endogenous Prolactin ng/mL	Added Prolactin ng/mL	Measured Conc. Prolactin ng/mL	Expected * Prolactin ng/mL	Recovery (%)
1 Serum	8.4	0.0	8.4		
		10.0	13.8	14.2	97.4
		25.0	29.9	29.2	102.6
		50.0	51.5	54.2	95.1
		100.0	90.0	104.2	86.4
2 Serum	20.0	0.0	20.0		
		10.0	22.0	20.0	110.2
		25.0	34.3	35.0	98.1
		50.0	52.2	60.0	87.0
		100.0	94.9	110.0	86.3
3 Serum	31.8	0.0	31.8		
		10.0	26.2	25.9	101.3
		25.0	40.4	40.9	98.7
		50.0	58.3	65.9	88.4
		100.0	103.7	115.9	89.4

(* Endogenous Prolactin / 2 + added Prolactin because of a 1:1 dilution of serum with spike material.)

9.6 Linearity

Sample	Dilution	Measured Conc. (ng/mL)	Expected Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	None	8.40	8.38	
	1:2	4.22	4.19	100.8
	1:4	1.98	2.09	94.4
	1:8	1.15	1.05	109.9
	1:16	0.58	0.52	111.0
2	None	20.0	19.96	
	1:2	10.74	9.98	107.6
	1:4	5.56	4.99	111.4
	1:8	2.75	2.49	110.2
	1:16	1.28	1.25	102.2
3	None	31.80	31.81	
	1:2	14.35	15.91	90.2
	1:4	6.95	7.95	87.4
	1:8	3.55	3.98	89.2
	1:16	1.76	1.99	88.7

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (**up to 0.9 mg/mL**) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Prolactin in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 2000 ng/mL of Prolactin.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national calibrators and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DIAsource.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

1. Shome, B. and Parlow, A.F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45, 1112-1115, (1977).
2. Niall, M.D. et al, "The Chemistry of Growth Hormone and the Lactogenic Hormones"; *Recent Progr. Horm. Res.* 29, 471 (1974)
3. Friesen, H. and Hwang, P., *Ann. Rev. Medicine*, 24, 251-270, (1973)
4. Cowden, E.A., Ratcliffe, W.A., Beastall, G.H., and Ratcliffe, J.G., *Annals Clin. Biochem.*, 16, 113-121, (1979).
5. Frantz, A.G., *N. Engl. J. Med.*, 298, 201-207 (1978)
6. Thorner, M.O., Edwards, C.R.W., Haker, J.P., Abraham, G., and Besser, G.M., "The Testes in Normal and Infertile Men", Troen, P. and Nankin, H.R. (eds.), Raven Press, New York, 351-366, (1977).
7. Daughday, W.H., "The Adenohypophysis, Textbook of Endocrinology"; Williams, 6th Ed., Chapter 3, 87-87, (1981)
8. Tyson, J.E., Hwang, P., Guyela, H. Friesen, H.G., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 113, 14-20, (1972).
9. Aubert, M.I., Grumbach, M.M. and Kaplan, S.L., *Acta Endocrin.* 77, 460-476 (1974)
10. Jacobs, L., Snyder, P., Wilber, J., Utiger, R., and Daughday, W., *J. Clin. Endocrin.* 33, 996, (1978).
11. Frantz, A.G., *N. Engl. J., Med.*, 298, 201-207, (1978).
12. Cowden, E.A., Ratcliffe, W.A., Beastall, G.H., and Ratcliffe, J.G., *Annals Clin. Biochem.*, 16, 113-121, (1979).
13. Engvall, E., "Methods in Enzymology", Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.), Academic Press, New York, NY, 419-492, (1980).
14. Uotila, M., Ruuslahti, E. and Engvall, E., *J. Immunol. Methods*, 42, 11-15, (1981).

Revision date : 2015-12-08



PRL ELISA

es

KAPD1291

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIASource ImmunoAssays SA-Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium-Tel: +32 10 84 99 11-Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Uso previsto

El **Kit de inmunoensayo enzimático DIASource Prolactin ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del prolactina en suero .

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

1.2 Resumen y explicación

La prolactina humana (hormona lactogénica) es una hormona segregada por la glándula pituitaria anterior tanto de hombres como de mujeres (1). La prolactina es una hormona peptídica de cadena única cuyo peso molecular es de aproximadamente 23.000 daltons (2). La liberación y la síntesis de la prolactina están bajo control neuroendocrino, principalmente a través del factor de liberación de prolactina y del factor de inhibición de prolactina (3).

Normalmente, las mujeres tienen unos niveles basales de prolactina ligeramente más altos que los hombres; parece ser que durante la pubertad estos niveles sufren un aumento relacionado con los estrógenos y que durante la menopausia disminuyen de forma equivalente. Las principales funciones de la prolactina son iniciar el desarrollo de las mamas y mantener la lactancia. La prolactina también inhibe la función gonadal (4,5).

Durante el embarazo, los niveles de prolactina aumentan progresivamente hasta entre 10 y 20 veces los valores normales, y a las 3 o 4 semanas del parto, regresan a los valores normales (4). Las madres lactantes mantienen niveles altos de prolactina, y es posible que las concentraciones en suero tarden varios meses en regresar a los niveles normales (3,4).

La determinación de la concentración de prolactina puede ayudar a diagnosticar trastornos hipotálamo-pituitarios (3,4). Los microadenomas (pequeños tumores pituitarios) pueden causar hiperprolactinemia, que en ocasiones conduce a la impotencia masculina (6). Los niveles altos de prolactina normalmente conducen a la galactorrea y la amenorrea.

Se ha demostrado que las concentraciones de prolactina aumentan a causa de los estrógenos, la hormona liberadora de tirotropina (HLT) y varios fármacos que afectan a los mecanismos dopaminérgicos (7,8,9,10). Los niveles de prolactina también aumentan en caso de enfermedad renal e hipotiroidismo, así como en situaciones de estrés, ejercicio excesivo e hipoglucemia. Además, la liberación de prolactina es episódica y muestra variaciones diurnas (11). Las concentraciones ligeramente elevadas de prolactina deben evaluarse teniendo todo esto en cuenta. Las concentraciones de prolactina también pueden aumentar a causa de fármacos como la clorpromazina y la reserpina, y pueden disminuir a causa de la bromocriptina y la levodopa (12).

El ensayo Prolactin ELISA de DIASource ImmunoAssays es un ensayo rápido, sensible y fiable. Los anticuerpos desarrollados para la prueba determinan una concentración mínima de prolactina humana de 0,35 ng/ml. No existe reacción cruzada con hCG, TSH, LH, FSH o hGH.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DIASource Prolactin ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único foco antigénico en una molécula de prolactina. Se incubaba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene prolactina endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti-prolactina conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido.

La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de prolactina en la muestra.

Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de prolactina en la muestra del paciente.


3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este kit es solo para uso en diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
2. Todos los reactivos de esta prueba que contienen suero o plasma humano se han analizado y han dado negativo en VIH I/II, HBsAg y VHC en procedimientos aprobados por la FDA. No obstante, todos los reactivos deben utilizarse y eliminarse como posibles riesgos biológicos.
3. Antes de iniciar el ensayo, lea las instrucciones por completo y con atención. Utilice la versión válida de las instrucciones de uso suministradas con el kit. Asegúrese de que lo ha comprendido todo.
4. La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben guardarse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en la bolsa de aluminio sellada y utilizarse en el marco suministrado.
5. El pipeteo de las muestras y los reactivos debe realizarse lo más rápido posible y en la misma secuencia para cada paso.
6. Utilice los depósitos solo para los reactivos individuales. Esto es especialmente importante en el caso de los depósitos de sustrato. Si se utiliza un depósito para distribuir una solución de sustrato que se ha utilizado anteriormente para la solución de conjugado, la solución puede colorearse. No vierta los reactivos de nuevo en los viales, podría contaminar los reactivos.
7. Mezcle el contenido de los pocillos de la microplaca completamente para asegurarse de que los resultados de la prueba salgan bien. No reutilice los pocillos.
8. No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; añada reactivos inmediatamente después de finalizar los pasos de enjuagado.
9. Antes de iniciar la prueba, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 21 °C y 26 °C). La temperatura afecta a las lecturas de absorbancia del ensayo. No obstante, los valores de las muestras del paciente no se ven afectadas.
10. Nunca pipeteo con la boca; evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas.
11. No fume, coma, beba o aplique cosméticos en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
12. Cuando manipule muestras y reactivos, utilice guantes de látex desechables. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede arrojar resultados falsos.
13. La manipulación debe realizarse de acuerdo con los procedimientos definidos por las directrices o normativas de seguridad nacionales adecuadas sobre riesgos biológicos.

14. No reutilice los reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit.
15. Todos los volúmenes indicados deben realizarse de acuerdo con el protocolo. Solo obtendrá resultados óptimos si utiliza pipetas calibradas y lectores de placas microtituladoras.
16. No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes números de lote. Se recomienda no intercambiar los pocillos de placas diferentes, aunque sean del mismo lote. Es posible que los kits se hayan enviado o almacenado en condiciones diferentes y que las características obligatorias de las placas sean ligeramente diferentes.
17. Evite el contacto con la Solución de parada, contiene 0,5 M de H₂SO₄ y puede provocar irritación en la piel y quemaduras.
18. Algunos reactivos contienen Proclin 300, BND y/o MIT como conservantes. En caso de contacto con los ojos o la piel, lávelos inmediatamente con agua.
19. El sustrato de TMB tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de contacto, lave los ojos con agua abundante y la piel con agua y jabón abundantes. Antes de reutilizar los objetos contaminados debe lavarlos. En caso de inhalación, lleve a la persona a un lugar descubierto.
20. Las sustancias químicas y los reactivos preparados o utilizados deben tratarse como residuos peligrosos y de acuerdo con las directrices o normativas de seguridad nacionales sobre riesgos biológicos.
21. Para más información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte las fichas de seguridad. Puede solicitar las fichas de seguridad de este producto directamente a DIAsource ImmunoAssays.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1.  **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-prolactina (monoclonal).
2.

CAL	N
-----	---

Calibrador (Calibrador 0-5), 6 viales (liofilizados), 1 mL; Concentraciones: 0; 5; 20; 50; 100; 200 ng/mL; Conversión: 1 ng/mL = 21,1 mIU/L. *Los calibradores están calibrados según WHO 3rd International Calibrador para prolactina IRP (84/500).* Ver "Preparación de los Reactivos"; Contiene conservante sin mercurio.
3.

Ab	HRP
----	-----

Enzyme Conjugate (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, Anticuerpo anti- prolactina conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
4.

CHROM	TMB
-------	-----

Substrate Solution (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
5.

STOP	SOLN
------	------

Stop Solution (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.

Nota: Se puede solicitar el *Calibrador 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DIAsource Microtiter Plate Reader).
 Micropipetas de precisión variable calibradas.
 Papel absorbente.
 Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2°C-8°C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.
 Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2°C-8°C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2°C-8°C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.
 Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Calibradores

Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los calibradores con 1 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar varias veces antes de usar.

Nota: Los calibradores reconstituidos son estables durante 2 meses a 2°C-8°C. Para períodos más largos congelar a -20°C.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DIAsource, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Sólo debe utilizarse suero en este ensayo.

(El empleo de plasma EDTA- o heparina puede llegar a valores aumentados y el empleo de plasma citrato a valores reducidos.)

No usar muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2°C a 8°C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a -20°C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el calibrador mas concentrado, ha de diluirse con *Calibrador 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada calibrador, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- El pipeteo de todos los calibradores, muestras y controles debe estar completado en 6 minutos. (Tenerlo en cuenta especialmente para el pipeteo manual).

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de calibradores.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada **Calibrador, Control y muestras con puntas nuevas** en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
4. Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
5. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
6. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
7. Lavar los pocillos **5 veces** con agua destilada (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

Nota importante: La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

8. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
9. Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente.
10. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
11. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la **Stop Solution**.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de calibradores, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva calibrador mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada calibrador frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva calibrador.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de calibradores. Las muestras con concentraciones superiores al mayor calibrador han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Calibrador Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Calibrador	Unidades Ópticas (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	0,04
Calibrador 1 (5 ng/mL)	0,13
Calibrador 2 (20 ng/mL)	0,40
Calibrador 3 (50 ng/mL)	0,80
Calibrador 4 (100 ng/mL)	1,34
Calibrador 5 (200 ng/mL)	1,92

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DIAsource Prolactin ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	Media (ng/mL)	Desviación calibrador (ng/mL)	Percentil 5% (ng/mL)	Percentil 95% (ng/mL)
Hombres	6,44	5,50	0,94	20,94
Mujeres	14,27	5,88	2,39	25,15

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DIAsource directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,35 – 200 ng/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones calibrador de veinte (20) réplicas del *Calibrador 0* y resultó ser 0,35 ng/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (**hasta 0,9 mg/mL**) no influyen los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de prolactina en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 2000 ng/mL de prolactina.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros calibradores y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DIAsource.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

Última revisión : 2015-12-08



PRL ELISA

IT

KAPD1291

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIASource ImmunoAssays SA-Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium-Tel: +32 10 84 99 11-Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUZIONE

1.1 Destinazione d'uso

Il test immuno-enzimatico **DIASource Prolactin ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di prolattina in siero. **Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

1.2 Riassunto e spiegazione

La prolattina umana (ormone lattogeno) è secreta dalla ghiandola pituitaria (ipofisi) anteriore sia nell'uomo che nella donna (1). La prolattina umana è un ormone polipeptidico a catena singola di peso molecolare pari a circa 23.000 Dalton (2). Il rilascio e la sintesi della prolattina sono sotto il controllo neuroendocrino, principalmente tramite il fattore di rilascio della prolattina e il fattore inibente la prolattina (3).

Le donne normalmente presentano livelli basali di prolattina leggermente superiori rispetto agli uomini; apparentemente, si ha un aumento correlato agli estrogeni al momento della pubertà e una corrispondente diminuzione nella menopausa. Tra le funzioni primarie della prolattina vi sono l'induzione dello sviluppo mammario e il mantenimento della lattazione. La prolattina sopprime inoltre la funzione gonadica (4,5).

Durante la gravidanza, i livelli di prolattina aumentano progressivamente fino a raggiungere 10–20 volte i valori normali, per tornare ai livelli pre-gravidanza entro 3–4 settimane dal parto (4). Nelle donne che allattano, i livelli di prolattina si mantengono elevati e possono essere necessari molti mesi prima che la concentrazione sierica ritorni ai livelli pre-gravidanza (3,4).

La determinazione della concentrazione di prolattina è utile nella diagnosi dei disturbi ipotalamo-ipofisari (3,4). I microadenomi (piccoli tumori ipofisari) possono causare iperprolattinemia, talvolta associata a impotenza maschile (6). Livelli elevati di prolattina sono comunemente associati a galattorrea e amenorrea.

È stato osservato che la concentrazione di prolattina viene aumentata dagli estrogeni, dall'ormone di rilascio della tireotropina (TRH) e da molti dei farmaci che influiscono sui meccanismi dopaminergici (7,8,9,10). Livelli elevati di prolattina si riscontrano nelle patologie renali e nell'ipotiroidismo, nonché in alcune situazioni di stress, esercizio fisico e ipoglicemia. Il rilascio di prolattina è episodico e soggetto a variazione diurna (11). Concentrazioni di prolattina lievemente elevate vanno analizzate tenendo in considerazione quanto sopra. La concentrazione di prolattina può aumentare in seguito all'assunzione di farmaci come clorpromazina o reserpina oppure diminuire in seguito all'assunzione di bromocriptina o L-dopa (12).

Il test DIASource ImmunoAssays Prolactin ELISA costituisce un'analisi rapida, sensibile e affidabile. Gli anticorpi sviluppati per il test permettono di rilevare concentrazioni minime di prolattina di 0,35 ng/mL. Inoltre il test non presenta reattività incrociata con hCG, TSH, LH, FSH o hGH.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DIASource Prolactin ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico su una molecola prolattina. Un'aliquota di un campione di paziente contenente prolattina endogena viene incubato nel pozzetto ricoperto dell'enzima coniugato, che è un anticorpo anti-prolattina monoclonale coniugato alla perossidasi di rafano. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è eliminato attraverso lavaggi.

La quantità della perossidasi legata è proporzionale alla concentrazione prolattina nel campione.

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di prolattina nel campione del paziente.


3 PRECAUZIONI

1. Questo kit è solo per uso diagnostico in vitro ed esclusivamente per uso professionale.
2. Tutti i reagenti di questo kit di analisi contenenti siero o plasma umano sono stati analizzati mediante procedure approvate dalla FDA e sono risultati negativi per HIV I/II, HBsAg e HCV. Tuttavia tutti i reagenti vanno utilizzati e smaltiti come potenziali materiali a rischio biologico.
3. Prima di iniziare l'analisi, leggere le istruzioni attentamente e fino alla fine. Utilizzare la versione valida delle istruzioni per l'uso fornita insieme al kit. Accertarsi che sia tutto chiaro.
4. La micropiastra contiene strisce staccabili. I pozzetti non utilizzati vanno conservati a 2-8 °C nella busta laminata sigillata e usati entro il periodo indicato.
5. La pipettatura di campioni e reagenti va eseguita il più rapidamente possibile e nella stessa sequenza in ogni fase.
6. Per ogni singolo reagente va usato un contenitore diverso. Ciò vale in particolare per i contenitori del substrato. Se un contenitore già usato in precedenza con la soluzione del coniugato viene utilizzato per erogare una soluzione di substrato, la soluzione può colorarsi. Non rimettere i reagenti nei flaconi poiché si può verificare una contaminazione.
7. Miscelare bene il contenuto dei pozzetti della micropiastra per garantire la buona riuscita del test. I micropozzetti non vanno riutilizzati.
8. Non lasciare asciugare i pozzetti durante l'analisi; i reagenti vanno aggiunti subito dopo aver completato le fasi di risciacquo.
9. Prima di iniziare il test, portare i reagenti a temperatura ambiente (21-26 °C). La temperatura influisce sulle letture dell'assorbanza previste dall'analisi. Tuttavia, la temperatura non influisce sui valori dei campioni dei pazienti.
10. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le membrane mucose.

11. Non fumare, mangiare, bere né usare cosmetici nelle aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
12. Quando si manipolano i campioni e i reagenti, indossare sempre guanti di lattice monouso. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può portare a risultati errati.
13. La manipolazione va eseguita in conformità con le procedure definite nelle linee guida o nelle normative nazionali in merito alla sicurezza nell'uso di materiali a rischio biologico.
14. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza impressa sulle etichette del kit.
15. Tutti i volumi indicati devono essere preparati seguendo il protocollo. L'ottimale riuscita del test si ottiene solo usando pipette e lettori di piastre per microtitolo correttamente tarati.
16. Non miscelare né usare componenti di kit con numero di lotto diverso. Si raccomanda di non scambiare i pozzetti di piastre diverse, nemmeno se appartenenti allo stesso lotto. I kit potrebbero essere stati spediti o conservati in condizioni diverse e le caratteristiche di legame della piastre possono risultare leggermente differenti.
17. Evitare il contatto con la Soluzione di blocco contenente H₂SO₄ 0,5 M. Può causare irritazione cutanea e ustioni.
18. Alcuni reagenti contengono Proclin 300, BND e/o MIT come conservanti. In caso di contatto con occhi o cute, risciacquare abbondantemente con acqua.
19. Il substrato TMB ha un effetto irritante sulla cute e sulle mucose. In caso di contatto, lavare gli occhi con molta acqua e la cute con sapone e molta acqua. Lavare gli oggetti contaminati prima di riutilizzarli. Se inalato, accompagnare la persona all'aria aperta.
20. I composti chimici e i reagenti preparati o usati vanno trattati come rifiuti pericolosi secondo le linee guida o le normative nazionali in merito alla sicurezza nell'uso di materiali a rischio biologico.
21. Per informazioni sulle sostanze pericolose incluse nel kit consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza dei materiali, disponibili su richiesta inoltrata direttamente a DIAsource ImmunoAssays.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1.  **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti.
Pozzetti ricoperti con l'anti-prolattina anticorpo (monoclonale)
 2.

CAL	N
-----	---

PRL Calibratori N= 0 to 5, 6 flaconi (liofilizzati), 1 mL
Concentrazione : 0; 5; 20; 50; 100 ; 200 ng/mL
Conversione : 1 ng/mL = 21.1 mIU/L
Gli calibratore sono calibrati contro lo Calibratore Internazionale WHO 3rd per prolattina IRP (84/500)
Vedi "preparazione dei reagenti".
Contiene conservante senza mercurio.
 3.

Ab	HRP
----	-----

Enzyme Conjugate (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso
Anti-prolattina anticorpo conjugate alla perossidasi di rafano
Contiene conservante senza mercurio.
 4.

CHROM	TMB
-------	-----

Substrate Solution (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso.
TMB (benzidine tetrametilico)
 5.

STOP	SOLN
------	------

Stop Solution (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso.
Contiene 0.5 M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Nota: Ulteriore *Calibratore 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C - 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data. Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere chiusi accuratamente. Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Calibratori

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli calibratore con 1 mL acqua distillata.

Nota: Gli calibratore ricostituiti sono stabili per 2 mesi a 2 °C - 8 °C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DIAsource, al piu' tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Nel test deve essere utilizzato solo siero.

I risultati Citrate Plasma sono diminuiti, mentre del EDTA e Heparin sono molto aumentati.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezione sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 °C - 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo calibratore piu' alto, questo campione può essere diluito con lo *Calibratore 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

a) diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Calibratore 0* (agitare bene)

b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Calibratore 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, calibratore, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
- Il pipettare degli calibratore, controlli e campioni deve essere eseguito entro 6 minuti. (Fare attenzione soprattutto quando è eseguito manualmente.)

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva calibratore.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni *Calibratore*, *Control* e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL** *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti. Lavare i pozzetti **5 volte** con acqua distillata (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.

Importante:

La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!

6. Aggiungere **100 µL** della *Substrate Solution* ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della *Stop Solution* ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastrine **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di calibratore, controlli e campioni.
2. Costruire una curva calibratore: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni calibratore contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva calibratore.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva calibratore. Campioni con una concentrazione più elevata dello calibratore più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva calibratore

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Calibratore	Densità ottiche (450 nm)
Calibratore 0 (0 ng/mL)	0,04
Calibratore 1 (5 ng/mL)	0,13
Calibratore 2 (20 ng/mL)	0,40
Calibratore 3 (50 ng/mL)	0,80
Calibratore 4 (100 ng/mL)	1,34
Calibratore 5 (200 ng/mL)	1,92

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DIAsource Prolactin ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	Valore medio (ng/mL)	S.D. (ng/mL)	5% Percentile (ng/mL)	95% Percentile (ng/mL)
Uomini	6,44	5,50	0,94	20,94
Donne	14,27	5,88	2,39	25,15

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati. È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati. Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DIAsource.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,35 – 200 ng/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni calibratore di venti (20) repliche dello *Calibratore 0* ed erano 0,35 ng/mL.

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1 Interfering Substances

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL) e trigliceridi (**fino a 0,9 mg/mL**) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Drug Interferences

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di Prolactin nel campione.

10.3 High-Dose-Hook Effect

Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 2000 ng/mL di prolattina.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DIAsource.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

Data di revisione : 2015-12-08

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC AGENT	Precipitating Agent
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Símbolos utilizados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
μ	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
PREC AGENT	Agente de precipitación
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado

	Simboli utilizzati
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluite campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluite calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
UUT	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
PREC AGENT	Agente precipitante
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante
DIST	Distributore
TRAY	Vassoi di incubazione
PMSF	Soluzione di PMSF
	Proteggere dalla luce
STRIP	Dot strip
SUB	Substrato
EXTR SOLN CONC	Concentrato del tampone di estrazione
CART	Cartuccia
SAV HRP	HRP coniugata a streptavidina
PIPETTE	Pipetta
WASH SOLN	Tampone di lavaggio