



Prolactin

ELISA-Testkit zur
quantitativen Bestimmung
von Prolaktin
in humanem Blutserum
(Gebrauchsanweisung: Seite 3)

Enzyme immunoassay for
quantitative determination of
prolactin
in human serum
(Instructions for use: page 17)









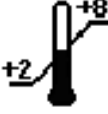












21-04



96 determinations

KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostikum In vitro diagnostic device		EG-Konformitätserklärung CE Declaration of conformity
	Katalognummer Catalogue number		Seriennummer Batch code
	Verwendbar bis Expiry date		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult instructions for use
	Bei der angegebenen Temperatur lagern Store at		Biologische Gefahr Biological risk
	Beiliegende Dokumente beachten Consult accompanying documents		Konjugat Conjugate
	Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microtiter plate (96 wells)		Tetramethylbenzidin-Lösung Substrate
	Waschpuffer Wash buffer		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Optische Dichte Optical density
	Kontrolle Control		

VERWENDUNGSZWECK

Der Prolactin-Testkit wird für die quantitative Bestimmung von Prolaktin in humanem Blutserum verwendet.

Das Prolaktin ist ein Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von ca. 23 000 Da. Es wird im Hypophysenvorderlappen gebildet. Die Bestimmung der Prolaktin-Konzentration ist für die Diagnose von Funktionsstörungen der Geschlechtsdrüsen beider Geschlechter wichtig. Bei Frauen mit Hyperprolaktinämie können Milchfluß, Amenorrhoe oder eine Reihe anderer Menstruationszyklusstörungen auftreten, während die Männer an Libidoverlust oder Impotenz leiden. Die Messung des zirkulierenden Prolaktins ist als primärer Unfruchtbarkeitstest einsetzbar.

Eine pathologische Hyperprolaktinämie ist beim Hyperthyreodismus, Niereninsuffizienz und bei Patienten mit einem Prolaktin-ausgescheidenden Hypophysen-Tumor (Prolaktinom) zu erwarten.

Das Prolaktin niveau steigt während der Schwangerschaftsperiode, der Laktation, des Schlafes und infolge der emotionalen Stresse und Körperüberbelastung.

TESTPRINZIP

Im Prolactin-Testkit wird bei der immunenzymatischen Festphasen-Analyse eine Sandwich-Technik verwendet. Dabei werden zwei monoklonale Antikörper benutzt, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des Prolaktin-Moleküls koppeln. Einer wird an die Festphase (Innerfläche der Mikrotiterplatten-Kavität) gebunden. Der zweite Antikörper wird mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert.

Nach dem Zusatz der zu testenden Probe und des Konjugats (Anti-Prolaktin-Peroxidase) in die Kavität wird das Prolaktin aus der zu untersuchenden Probe während der

Inkubationszeit gleichzeitig an das Konjugat gebunden und an der Festphase immobilisiert. Durch einen anschließenden Waschschrift wird das überschüssige, ungebundene Konjugat entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugats ist direkt proportional zur Prolaktin-Konzentration in der zu testenden Probe.

Durch die Inkubation mit Tetramethylbenzidin als Substrat für die Peroxidase wird die Lösung in der Kavität eingefärbt. Die Intensität der Färbung nimmt direkt proportional zur Menge des gebundenen Konjugats zu und wird durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) in der Kavität gemessen. Zur Berechnung der Prolaktin-Konzentration in der Probe wird eine Standardkurve verwendet. In dieser Standardkurve sind auf der X-Achse die Prolaktin-Konzentration der Kalibratoren und auf der Y-Achse die OD-Werte der entsprechenden Konzentrationen aufgetragen.

PROBEN

Entnahme und Lagerung der Proben:

Venenblut wird aseptisch entnommen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Blutplasma, hämolysiertes oder trübes Serum, sowie natriumazidhaltige Serumproben sind für die Analyse nicht geeignet.

Die Lagerung der Blutserumproben ist bis zu 2 Tage bei +2...8°C möglich. Darüber hinaus müssen die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und auftauen ist nicht zulässig.

Probenvorbereitung:

Vor dem Gebrauch müssen die zu testenden Proben zur Raumtemperatur (+18...25°C) gebracht und gründlich, unter Vermeidung von Schaumbildung, vermischt werden.

PAKUNGSINHALT (FÜR 96 TESTS)

MP	Mikrotiterplatte mit: Zwölf Streifen, jeder Streifen besteht aus acht Kavitäten, auf deren Innerfläche monoklonale Prolaktin-Antikörper immobilisiert sind	1 Platte
CONJ	Konjugat aus monoklonalen Prolaktin-Antikörpern und Meerrettichperoxidase	14 ml (gebrauchsfertig)
0-5 CAL	Kalibratoren mit definierter Prolaktin-Konzentration  (Protein-Puffer mit definierter Prolaktin-Menge). Die Kalibratoren wurden gegen den dritten internationalen Standard WHO 84/500 kalibriert. Die genauen Prolaktin-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen je 0,5 ml (gebrauchsfertig)
CONTROL	Kontrolle (Protein-Puffer, mit definierter Prolaktin-Menge). Die Prolaktin-Konzentration ist auf dem Flaschenetikett angegeben. 	0,5 ml (gebrauchsfertig)
WASHB	Waschpuffer-Konzentrat , ausreichend für die Vorbereitung von 280 ml Lösung.	14 ml (konzentriert)
SUB	Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB): 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml (gebrauchsfertig)
STOP	Stopplösung: 1N HCl - Lösung	14 ml (gebrauchsfertig)

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- verstellbare halbautomatische Einkanal-Pipetten (5 µl bis 5 ml);
- verstellbare halbautomatische 8-Kanal-Pipette (bis 0,3 ml);

- thermostatischer Schüttler (500–800 RPM) für den Temperaturbereich +37°C und +18...25°C;
- Mikrotiterplatten-Waschgerät;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 450 nm;
- Messzylinder, 200 ml;
- Becherglas, 300 ml;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Handschuhe;
- separate Behälter für Konjugat, Tetramethylbenzidin und Stopplösung.

HINWEISE ZUR LAGERUNG UND ANWENDUNG DER REAGENZIEN

Der Prolactin-Testkit ist für die 96 Tests bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung der optischen Dichte der Tetramethylbenzidin-Lösung (Leerwert).

Bei einer teilweisen Nutzung des Testkits muß für jeden unabhängigen Versuch eine neue Standardkurve erstellt werden. Außerdem wird empfohlen, die Konzentration von Prolaktin in der Kontrolle neu zu bestimmen.

Anmerkung: der angebrochene Testkit muß innerhalb 1 Monats nach Öffnung verbraucht werden.

Das Verfallsdatum des kompletten, ungeöffneten Reagenziensatzes ist auf dem Außenetikett des Testkits angegeben. (Haltbarkeitsdauer 12 Monate.) Die Verfallsdaten der einzelnen Testkomponenten sind auf den jeweiligen Reagenzienetiketten angegeben.

Bis zur Verwendung sind alle Reagenzien des Prolactin-Testkits bei +2...8°C in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25°C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die nicht gebrauchten Testreagenzien müssen auf folgende Weise gelagert werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen sind in die Originalverpackung zu legen und dicht zu verschließen. Sie können auf diese Weise bei einer Temperatur von +2...8°C innerhalb der Haltbarkeitsdauer gelagert werden;
- Das Konjugat und die Tetramethylbenzidin-Lösung sind bei einer Temperatur von +2...8°C zu lagern und dürfen noch maximal 1 Monat nach Öffnung verwendet werden;
- Die Kalibratoren und die Kontrolle sind bei einer Temperatur von +2...8°C zu lagern und dürfen noch maximal 1 Monat nach Öffnung verwendet werden;
- Das Waschpuffer-Konzentrat ist bei einer Temperatur von +2...8°C zu lagern und kann so innerhalb der gesamten Haltbarkeitsdauer des Testkits verwendet werden;
- Der verdünnte Waschpuffer ist in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...25°C) maximal 5 Tagen haltbar;
- Die Stopplösung ist bei einer Temperatur von +2...8°C zu lagern und kann so innerhalb der gesamten Haltbarkeitsdauer des Testkits verwendet werden.

REAGENZIVORBEREITUNG

Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Die **Mikrotiterplatte** besteht aus teilbaren Streifen und einem Rahmen in einer Plastikverpackung. Die Verpackung darf erst geöffnet werden, wenn sie mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...25°C) gelagert wurde. Nach Öffnung der Packung kann die notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen eingesetzt werden. Die nicht gebrauchten Streifen müssen in die Originalverpackung zurück gelegt und dicht verschlossen werden. Die Streifen können auf diese Weise bei

der Temperatur von +2...8°C bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum gelagert werden.

WASHB Für die Vorbereitung des **Waschpuffers** muss die benötigte Menge des Puffer-Konzentrats 20-fach mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt werden.

Zum Beispiel:

5 ml Pufferkonzentrat+ 95 ml destilliertes Wasser.

Gründlich vermischen, dabei Schaumbildung vermeiden.

Der auf diese Weise vorbereitete Waschpuffer ist in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur maximal 5 Tage haltbar.

Das nicht verwendete Puffer-Konzentrat kann in einem dicht verschlossenen Behälter bei der Temperatur von +2...8°C bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

CONJ Das Konjugat mit 1 ml pro zu verwendendem Streifen in einer Pipettier-Schale vorlegen.

SUB Kurz vor der Verwendung die Tetramethylbenzidin-Lösung mit 1 ml pro zu verwendendem Streifen in einer weiteren Pipettier-Schale vorlegen.

Die TMB-Lösung ist lichtempfindlich.

STOP Kurz vor dem Gebrauch das Stopp-Reagens ebenfalls mit 1 ml pro zu verwendendem Streifen in einer weiteren Pipettier-Schale vorlegen.

TESTDURCHFÜHRUNG

Für alle Proben sollte eine Doppelbestimmung durchgeführt werden.

1. Vor dem Verwenden müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden, dabei Schaumbildung vermeiden. Auf Seite 16 ist ein Testschema dargestellt.

2. In alle Kavitäten je **100 µl Konjugat** **CONJ** pipettieren. **2 Kavitäten beleiben frei («Blank»).**

3. In die jeweils dafür vorgesehenen Kavitäten jeweils folgende Ansätze pipettieren:

20 µl Kalibratoren **CAL** (0 bis 5);

20 µl Kontrolle **CONTROL**;

20 µl der zu untersuchenden Blutserumprobe.

Anmerkung: die gesamte Pipettierzeit der Kalibratoren, Kontrollen und zu testenden Proben darf nicht länger als 15 Minuten betragen, da sich sonst die Inkubationszeit für die verschiedenen Proben wesentlich unterscheidet, was zu falschen Ergebnissen führen kann.

4. Streifen **1 Stunde bei +37°C unter schütteln** (500 bis 800 RPM) inkubieren.

5. Nach der Inkubationszeit Kavitäteninhalt dekantieren und Kavitäten fünfmal mit je **300 µl Waschpuffer** (vorbereitet aus dem **WASHB**) waschen. Dabei muß der Waschpuffer jeweils 5–10 Sek. geschüttelt werden, bevor er wieder abdekantiert wird. Nach dem letzten Waschschrift müssen alle Flüssigkeitsreste vollständig aus den Kavitäten entfernt werden.

6. Sofort je **100 µl Tetramethylbenzidin-Lösung (SUB)** in jede Kavität pipettieren.

7. Die Streifen **bei Raumtemperatur (+18...25°C) im Dunkeln innerhalb von 15–30 Minuten**, je nach der Intensität des Färbungsprozesses, inkubieren.

8. In alle Kavitäten je **100 µl Stopplösung (STOP)** hinzufügen und gründlich für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur (+18...25°C) schütteln.

9. Messen der Optischen Dichte in den Kavitäten bei einer Wellenlänge von **450 nm**. Die Färbung bleibt bei Raumtemperatur innerhalb von 20 Minuten stabil.

Berechnung der Ergebnisse

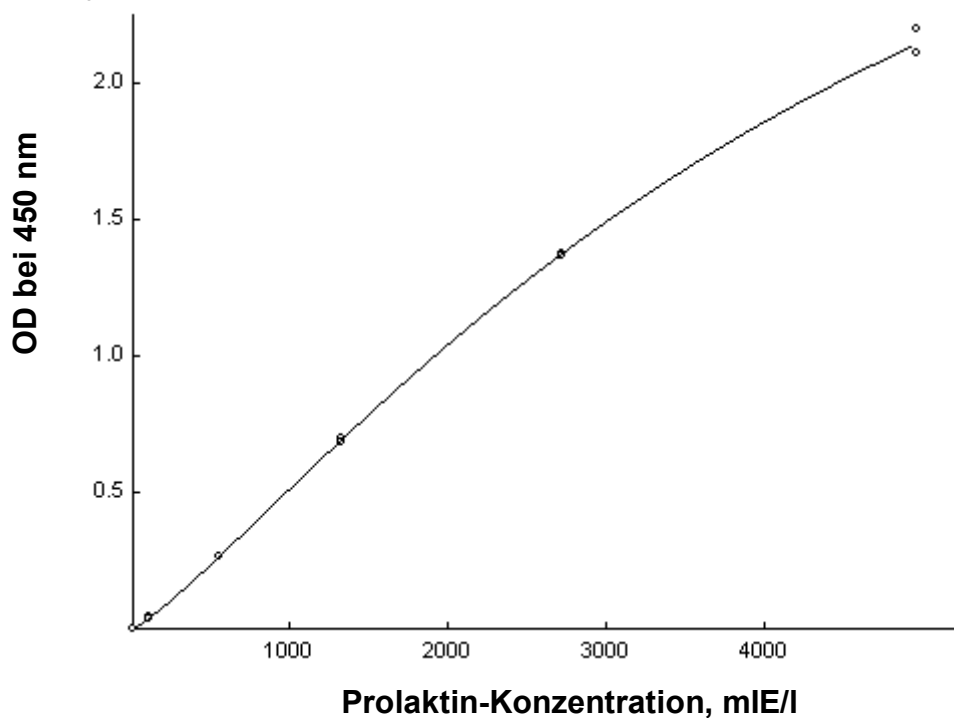
Der Test wird mit Hilfe einer Standardkurve ausgewertet. Die Standardkurve wird aus den Prolaktin-Konzentrationen in den Kalibratoren und den Mittelwerten aus der OD-Messung

(450 nm) erstellt. Zur Darstellung der Standardkurve wird eine spezielle Software mit 4PL oder 5PL Näherung verwendet (siehe Abbildung einer typischen Standardkurve). Für das Nullstellen des Gerätes wird der Mittelwert der OD in den leeren Kavitäten «Blank» (Leerwert) benutzt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für Prolaktin-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten, ist nicht zulässig.

TYPISCHE STANDARDKURVE

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen



REFERENZWERTE

Mit Hilfe des Prolactin-Testkits wurden Blutserumproben von 120 gesunden Blutspendern untersucht. Die ermittelten Werte sind in folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Gruppe	N	Prolaktin-Konzentrationsbereich (mIE/l)
<i>Frauen</i>	120	67-726
<i>Männer</i>		105-540

Es wird ausdrücklich empfohlen, daß jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die Prolaktin-Normkonzentrationen bestimmt.

TESTCHARAKTERISTIKA

Eichen:

Der Prolactin - Testkit wurde gegen den dritten internationalen Standard WHO 84/500 kalibriert.

Spezifität:

Es wurde keine Kreuzreaktion der monoklonalen Prolaktin-Antikörper mit Wachstumshormon (hGH), Plazentammamogen, thyreotropen, follikelstimulierenden und luteinisierenden Hormonen des Menschen nachgewiesen.

Der **High-Dose-Hook-Effekt** wurde bis zu einer Prolaktin-Konzentration von 100 000 mIE/l nicht nachgewiesen. Der **High-Dose-Hook-Effekt** wurde mit Hilfe der Bestimmung unterschiedlicher Prolaktin-Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe auf Basis der Kalibrierprobe 0 ermittelt.

Analytische Empfindlichkeit:

Die untere Nachweisgrenze des Prolactin - Testkits beträgt 50 mIE/l (minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt).

Zur Ermittlung der analytischen Empfindlichkeit wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der Optischen Dichte des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+2 SD) gebildet.

Intra-assay und Inter-assay Varianz:

Um einen **intra-assay** Variationskoeffizienten festzulegen, wurden 7 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Probe	Prolaktin Mittelkonzentrationswert, mIE/l	Intra-assay Varianz	
		SD	VK
BP 1	155	21,7	14,0%
BP 2	432	26,8	6,2%
BP 3	513	29,2	5,7%
BP 4	660	33,7	5,1%
BP 5	1234	55,5	4,5%
BP 6	1546	94,3	6,1%
BP 7	2567	179,7	7,0%

Um einen **inter-assay** Variationskoeffizient festzulegen, wurden 8 Blutserumproben drei Mal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Probe	Prolaktin Mittelkonzentrationswert, mIE/l			Inter-assay Präzision	
	1. Untersuchung	2. Untersuchung	3. Untersuchung	SD	VK
BP 1	154	139	144	7,6	5,4%
BP 2	218	202	195	11,8	5,9%
BP 3	302	278	262	20,1	7,5%
BP 4	324	301	281	21,5	7,4%
BP 5	348	311	308	22,3	7,2%
BP 6	470	432	431	22,2	5,2%
BP 7	958	840	851	65,2	7,7%
BP 8	2410	2409	2049	208,1	9,3%

GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um die zuverlässigen Testergebnisse zu erhalten, ist der Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Das Mischen von Testkitkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt. Dieses gilt auch für die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testkits.

- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muß ebenfalls berücksichtigt werden.

- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Tetramethylbenzidin, Stopplösung und Waschpuffer, ist nicht gestattet.

- Die Stopplösung ist eine 1N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.

- Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

- Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- Schutzhandschuhe verwenden;
- Nie mit dem Mund pipettieren;
- Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.

- Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) beachtet werden.

TESTSCHEMA

Kavitäten	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
Reagenzien			
CONJ	–	100 µl	100 µl
CAL CONTROL	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
Inkubieren	60 Min, +37°C, 500–800 RPM		
WASHB (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubieren	15–30 Min, +18...25°C, im Dunkeln		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Mischen	1–2 Min, +18...25°C		
Messen der optischen Dichte	450 nm		
Testergebnis berechnen	spezielle Software		

INTENDED USE

The Prolactin kit is intended for the quantitative determination of prolactin in human serum.

Prolactin is a single-chain protein hormone with a molecular weight of about 23 000 Da. It is synthesized in the frontal lobe of pituitary gland. The determination of prolactin is a valuable tool in diagnostics of testicular and ovarian dysfunctions. Hyperprolactinemia in women may lead to galactorrhea, amenorrhea and other distortions in menstrual cycle. In men it may result in impotence or loss of libido. Measurement of circulating prolactin is used as a primary test for barrenness.

Pathological hyperprolactinemia takes place in the case of hypothyroidism, renal insufficiency and in patients with a pituitary gland tumor - prolactinoma. Physiological increase of prolactin level takes place during the gestation, lactation, in sleep and after physical and emotional stress.

PRINCIPLE OF TEST

The Prolactin kit is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of prolactin molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase; the other is immobilized on the inner surface of microwells. Prolactin molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-prolactin-peroxidase conjugate. Then the wells are washed with wash buffer to remove any material not bound on the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to the prolactin level in sample.

During the incubation with substrate colour development occurs in microwells. Optical density of the solution in the wells is directly proportional to the quantity of the bound conjugate. The standard curve is plotted by using the prolactin concentrations in the calibrators (x-axis) and their corresponding OD values (y-

axis). The prolactin concentration of the specimen is directly read off from the standard curve.

PATIENTS' SERUM SAMPLES

Specimen collection and storage:

Blood is taken aseptically by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation. Do not use plasma, hemolysed or lipemic serum and serum with sodium azide added as preservative.

Store specimens at +2...8°C for no more than 2 days; for longer storage it is recommended to aliquote and freeze them at -20°C or below. Avoid repeated freezing.

Preparation before use:

Prior to assay, allow the samples to reach room temperature (+18...25°C). Take care to agitate specimens gently in order to ensure homogeneity.

MATERIAL PROVIDED

MP	Microtiter plate: 12 breakable strips of 8 wells each (total 96 wells), coated with anti-prolactin monoclonal antibodies	1 plastic bag
CONJ	Conjugate. Contains anti-prolactin monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 ml, ready to use
0-5 CAL	Prolactin calibrators (protein-based buffer containing known prolactin concentrations). Calibrators were standardized against 3 rd WHO International Standard 84/500. For exact prolactin concentrations, see vial labels.	6 vials , 0,5 ml each. Ready to use
CONTROL	Prolactin control (protein-based buffer containing known prolactin concentration). For exact range of prolactin concentration, see vial label.	0,5 ml, ready to use
SUB	TMB Substrate: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 ml, ready to use
WASHB	Concentrated wash buffer, enough for 280 ml of solution	14 ml, concentrated
STOP	Stop reagent: 1N HCl solution	14 ml, ready to use

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- a set of digital variable pipettes that cover volume range from 5 μ l to 5 ml, with appropriate disposable tips;
- 8-channel digital variable pipette that covers volume range up to 0.3 ml, with appropriate disposable tips;
- microplate shaker-incubator, which is able to maintain temperature +37°C and room temperature (+18...25°C) and shaking speed 500 to 800 rpm;
- microplate washer;
- automatic microplate reader with optical filter for 450 nm;
- volumetric cylinder, 200 ml;
- volumetric beaker, 300 ml;
- distilled or deionized water;
- gloves (rubber or plastic);
- trays for conjugate, substrate and stop-reagent.

APPLICATION AND STORAGE

Prolactin kit is designed for 96 determinations. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 substrate (control of OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

Please take into consideration that calibrators should be measured in each separate run. It is also recommended to measure each time prolactin concentration in the control.

NOTE: If used partially, kit should be used within a month after opening.

The expiry date of the kit (12 months) is reported on the box label, expiry date for each component is indicated on the respective label.

Upon receipt, Prolactin kit should be stored at +2...8°C, preferably in the original kit box. Kit storage is permissible at the most +25°C for no more than 5 days.

If used for separate experiments, kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in the original plastic bag with ziplock closure and close firmly. Store at +2...8°C until expiry date;
- opened vials with conjugate: at +2...8°C for no more than 1 month;
- calibrators and control: at +2...8°C for no more than 1 month after opening;
- opened vials with substrate: at +2...8°C for no more than 1 month;
- concentrated wash buffer: at +2...8°C until expiry date;
- wash buffer prepared for use: at room temperature (+18...25°C) for no more than 5 days, in a firmly closed container;
- stop-reagent: at +2...8°C until expiry date.

PREPARATION OF REAGENTS

Before the assay, allow all the kit components to reach room temperature and stir thoroughly.

MP The **microtiter plate** consists of a holder and breakable strips, packed in the plastic bag. Before opening, keep the bag at room temperature for at least 30 minutes. Open the bag and place required number of strips on holder. Put remaining strips back in the original plastic bag with ziplock closure and close firmly. Keep at +2...8°C until expiry date stated on the label.

WASHB Prepare the necessary volume of **wash buffer** by dilution the 20-fold concentrate with distilled or deionized water.

For example:

5 ml of concentrate + 95 ml of distilled water.

Mix thoroughly, avoiding foaming. Store at room temperature for no more than 5 days. Keep the prepared wash buffer firmly closed.

The rest of the concentrated wash buffer should be stored firmly closed at +2...8°C until expiry date.

CONJ Transfer conjugate into the tray at 1 ml per strip.

SUB Transfer substrate into the tray at 1 ml per strip directly before dispensing.

Substrate is sensitive to light.

STOP Transfer stop-reagent into the tray at 1 ml per strip before dispensing.

ASSAY PROCEDURE

All samples should be tested in duplicates.

1. Bring all the reagents to room temperature (+18...25°C) before use. Stir gently, avoid foaming. Assay scheme is on page 27.

2. Dispense **100 µl** of conjugate **CONJ** into each well, **except two wells «Blank»**.

3. Dispense

20 µl of prolactin **calibrators CAL** (0 to 5);

20 µl of prolactin **control CONTROL**;

20 µl of patients' samples into the respective wells.

Note: Total time of dispensing should not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.

4. Incubate strips for **1 hour while shaking (500–800 rpm)** at **+37°C**.

5. Decant, then wash each well 5 times with **300 µl** of **wash buffer (prepared from WASHB)**. Shake strips during 5–10 seconds each time before decanting. Make sure that after the last washing cycle the residual buffer is thoroughly aspirated from the wells.

6. Immediately add **100 µl** of **substrate SUB** into each well.

7. Incubate strips at **room temperature (+18...25°C)** in the **dark for 15–30 minutes**, depending on the color intensity.

8. Add **100 µl** of **stop-reagent STOP** to all the wells and shake well for **1–2 minutes** at a room temperature.

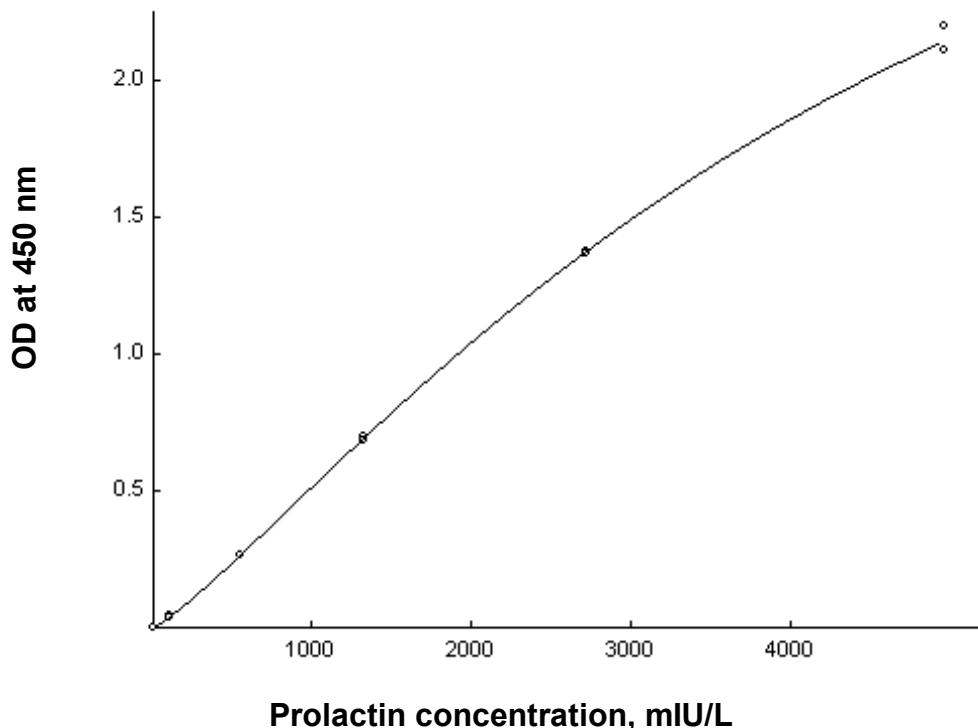
9. Read the optical density at a wavelength of **450 nm**. Colouring is stable at a room temperature in the course of 20 minutes.

DATA PROCESSING

Data processing is done by a computer-assisted analysis by plotting the mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective prolactin concentrations using 4PL or 5PL fit (see typical standard curve). Arithmetical mean OD of the two «Blank» wells is used for zero setting of device.

Any extrapolation of the standard curve to prolactin concentration above the nominal value of calibrator 5 is not permitted.

TYPICAL EXAMPLE OF STANDARD CURVE *Do not use for evaluation of real assay data!*



EXPECTED VALUES

Serum samples of 120 apparently healthy people were assayed with Prolactin kit. The results are shown in the table. These limits should be considered as guidelines only.

Group	n	Prolactin concentration range (mIU/L)
Female	120	67-726
Male		105-540

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of prolactin concentrations.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

Calibration:

Prolactin test kit was calibrated against the 3rd WHO International Standard 84/500.

Specificity:

No cross-interaction of both anti-prolactin monoclonal antibodies with LH, FSH, TSH, placental lactogen, and hGH was detected

Prolactin kit shows no **high dose hook effect** for prolactin concentrations up to 100 000 mIU/L. **High dose hook effect** was determined by spiking Calibrator 0 matrix with antigen.

Analytical sensitivity:

Analytical sensitivity of Prolactin assay, or the lowest detectable concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 50 mIU/L. It is defined as mean OD of 10 replicates of Calibrator 0 plus two standard deviations.

Intra- and inter-assay variation:

To determine **intra-assay CV** 7 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Sample	Mean prolactin concentration, mIU/L	Intra-assay CV	
		SD	CV
HS 1	155	21,7	14,0%
HS 2	432	26,8	6,2%
HS 3	513	29,2	5,7%
HS 4	660	33,7	5,1%
HS 5	1234	55,5	4,5%
HS 6	1546	94,3	6,1%
HS 7	2567	179,7	7,0%

To determine **inter-assay CV** 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Sample	Mean prolactin concentration, mIU/L			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV
HS 1	154	139	144	7,6	5,4%
HS 2	218	202	195	11,8	5,9%
HS 3	302	278	262	20,1	7,5%
HS 4	324	301	281	21,5	7,4%
HS 5	348	311	308	22,3	7,2%
HS 6	470	432	431	22,2	5,2%
HS 7	958	840	851	65,2	7,7%
HS 8	2410	2409	2049	208,1	9,3%

LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. To state a diagnosis, the physician is supposed to consider all the available clinical and laboratory findings.



SAFETY PRECAUTIONS


- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** To obtain the reliable data an operator should thoroughly follow the instruction for use. This instruction for use is valid only for the present kit with the listed composition. Any exchange of kit components is not allowed by CE regulations.

- Do not use kits or components after expiry date stated on the label. Take into consideration stability period for reconstituted reagents.

- Do not mix or use together reagents from different lots, except substrate, stop-reagent and wash buffer.

- Stop-reagent is 1N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected region thoroughly with plenty of water and seek medical advice.

- Source materials of human origin that were used  in preparation of this kit were tested and found negative  for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, no known laboratory test guarantees the absence of these viral agents. Therefore, the kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.

- As the kit contains potentially hazardous material,  the following precautions should be observed:

- wear disposable gloves when handling reagents and specimens;

- do not pipette by mouth;

- in the case of spilling, wipe up the spills promptly and wash the affected area thoroughly with decontaminant

- do not smoke, eat or drink while performing the assay.

- GLP with all general and individual regulations should be applied to the use of the kit.

ASSAY SCHEME

Wells	«Blank»	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div>	Samples
Reagents			
CONJ	–	100 µl	100 µl
CAL CONTROL	–	20 µl	–
Samples	–	–	20 µl
Incubation №1	60 min, +37°C, 500–800 rpm		
WASHB (diluted)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Incubation №2	15–30 min, +18...25°C, in the dark		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Stirring	1–2 min, +18...25°C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

December, 15, 2010



Astra Biotech GmbH
Im Biotechnologiepark, TGZ I
14943 Luckenwalde, Germany
Telefon: +49 (0) 3371 / 681-450
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de