

# Prolactin kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung von Prolaktin in humanem Blutserum  
*(Gebrauchsanweisung: Seite 4)*

Enzyme immunoassay for quantitative determination of prolactin in human serum  
*(Instructions for use: page 30)*

Manueller Test / Manual test  
 Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 13*  
*Abschnitt / Section 14*

**IVD**

Prolactin Kit (Manueller Test)  
 Prolactin kit (manual test)



96 Untersuchungen  
 96 tests

**21-04**

**REF**

Prolactin Kit (Automatisierter Test für "Alisei")  
 Prolactin kit (automated test for "Alisei")



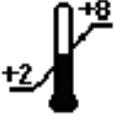
96 Untersuchungen  
 96 tests

**21-04 A**

**REF**



## 1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Kontrolle Control		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Optische Dichte Optical density
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests
	Reizend Irritant		

**Warning**

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Prolactin Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung von Prolaktin in humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

**REF 21-04** Für den manuellen Gebrauch

**REF 21-04A** Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei"

**Anmerkung 1:** *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

**Anmerkung 2:** *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits*

**REF 21-04 A** nur für ELISA-Automat "Alisei"

**REF 21-04** nur für den manuellen Gebrauch.

*Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.*

Das Prolaktin ist ein einkettiges Peptid-Hormon mit einer Molekularmasse von ca. 23.000 Da. Es wird im Hypophysen-Vorderlappen gebildet. Die Bestimmung der Prolaktin-Konzentration ist ein wichtiges Werkzeug bei der Diagnostik von Funktionsstörungen von Hoden oder Eierstock. Bei Frauen mit Hyperprolaktinämie können Milchfluß, Amenorrhoe oder andere Zyklusstörungen auftreten, während Männer an Libidoverlust oder Impotenz leiden.

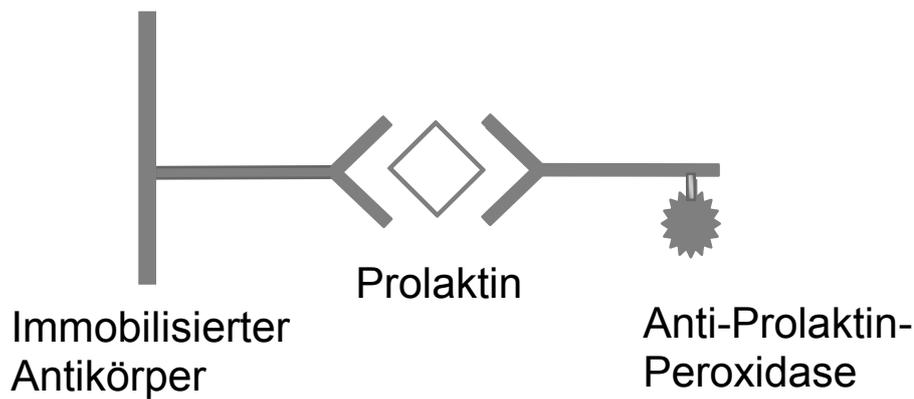
Die Messung des zirkulierenden Prolaktins ist als primärer Unfruchtbarkeitstest einsetzbar.

Eine pathologische Hyperprolaktinämie tritt bei Hypothyreodismus, Niereninsuffizienz und bei Patienten mit einem Hypophysen-Tumor (Prolaktinom) auf.

Eine Erhöhung des Prolaktin-Niveaus findet sich während der Schwangerschaft, der Laktation, des Schlafes und infolge von emotionellen Stress und Körperüberbelastung.

### 3. TESTPRINZIP

Der **Prolactin Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des Prolaktin-Moleküls binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden. Die Prolaktin-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-Prolaktin-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1). Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur Prolaktin-Konzentration in der Probe.



*Abb. 1 Testschema*

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbtintensität ist direkt proportional zur Prolaktin-Konzentration der Probe. Die Prolaktin-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

#### 4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben. Der **Prolactin Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Verfallsdatum zu lagern.

Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt wie folgt zu lagern aber die

Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei einer Temperatur von +2...+8 °C für maximal 6 Monate nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen konzentrierter Trial-Lösung, Waschlösung-Konzentrat und Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

### **Beschädigte Testkits**

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

## 5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 5 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von  $\leq -20$  °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

## 6. REFERENZWERTE

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

<b>Gruppe</b>	<b>n</b>	<b>Prolaktin-Konzentrationsbereich (mIU/l)</b>
<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.

## 7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

## 8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

### **MP** Mikrotiterplatte

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

### **CAL CONTROL** Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle

pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.

- Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

### **WASH P** Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P** **20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

**SUB** **Substrat** vor direktem Licht schützen.

## **9. PROBEN VORBEREITUNG**

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

## **10. TESTCHARAKTERISTIKA**

### **10.1 Kalibrierung:**

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

### **10.2 Spezifität:**

Es wurde keine Kreuzreaktivität der beiden monoklonalen Anti-Prolaktin-Antikörper mit LH, FSH, TSH, Plazenta-Lactogen und hGH nachgewiesen.

### **10.3 Analytische Sensitivität:**

Die analytische Sensitivität des **Prolactin Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 50 mIU/l. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

### **10.4 Messbereich:**

Der **Prolactin Testkit** (Manuelles Testkit und Alisei Testkit) ist validiert für die Detektion eines Prolaktin-Konzentrationsbereiches von 50- 4500 mIU/l validiert.

### **10.5 Hook-Effekt:**

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde bei Prolaktin-Konzentrationen bis zu 100.000 mIU/l nicht beobachtet. Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken des Kalibrators 0 mit Antigen bestimmt.

## 10.6 Intra-Assay und Inter-Assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 7 Blutserumproben (Manuelles Testkit) und 8 Blutserumproben (Alisei Testkit), jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

### Manuelles Testkit

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

### Alisei Testkit

Probe	Mittlere Prolaktin-Konzentration, mIU/l	Intra-Assay Varianz	
		SD	VK, %
1	125	9,9	7,9
2	362	15,9	4,4
3	498	23,0	4,6
4	772	17,9	2,3
5	1240	76,8	6,2
6	1718	92,9	5,4
7	2004	66,0	3,3
8	2757	112,7	4,1

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

## Manuelles Testkit

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

## Alisei Testkit

Probe	Mittlere Prolaktin-Konzentration, mIU/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	125	145	140	10,4	7,6
2	362	379	344	17,5	4,8
3	498	439	468	29,5	6,3
4	772	861	769	52,3	6,5
5	1240	1334	1272	47,8	3,7
6	1718	1900	1803	91,1	5,0
7	2004	2175	2184	101,4	4,8
8	2757	2513	2499	145,1	5,6

## 11. 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.

## 12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech–Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Kontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
  - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
  - Kontamination der Lösungen vermeiden;

- Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben,
  - Nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
  - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
  - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
  - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
  - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
  - Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die Prolaktin-Konzentration der Kontrolle immer zu bestimmen.
  - Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- 
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
  -  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 und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.
-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
  - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
  - 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.

- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

## 13. MANUELLER TEST (REF 21-04)

### 13.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Prolaktin-Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus monoklonalen Anti-Prolaktin-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5</b> <b>CAL</b>	<b>Prolaktin Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Prolaktin-Konzentration - 0; 100; 500; 1200; 2500; 4500 mIU/l. (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen Prolaktin-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben..	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Prolaktin Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Prolaktin-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische Prolaktin-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig

<b>WASH P</b> <b>20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x, konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	<b>Klebeschutzfolie</b>	2x1 Folie (optional)

### 13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

## 13.3 Testablauf

Der **Prolactin Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

### 13.3.1 Assay-Durchführung

**Anmerkung:** Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

#### Assay-Protokoll 1

(siehe: Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

**Für alle Proben sollte eine Zweifachbestimmung durchgeführt werden.**

**Anmerkung:** Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

**A. 100 µl Konjugat CONJ in alle Kavitäten außer A1-A2 pipettieren.**

**B. 20 µl Kalibratoren [CAL], Kontrolle [CONTROL] und die vorbereiteten Serumproben** in Zweifachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren. **Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).**

**Anmerkung:** Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

**Anmerkung:** Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

**C. 60 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren.**

**Anmerkung:** Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

**D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.**

**E. 100 µl Substrat [SUB] in jede Kavität pipettieren; Streifen entweder bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) im Dunkeln für 15–30 Minuten (abhängig von der Farbintensität) oder für 10 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.**

**F. 100 µl Stopplösung [STOP] in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.**

**G. Messen der Optischen Dichte bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.**

### 13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5-10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

### 13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet =  $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$

#### 13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD<sub>450 nm</sub>)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2)  $\leq 0,100$ ;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5  $\geq 1,5$  (nach Blank Subtraktion);

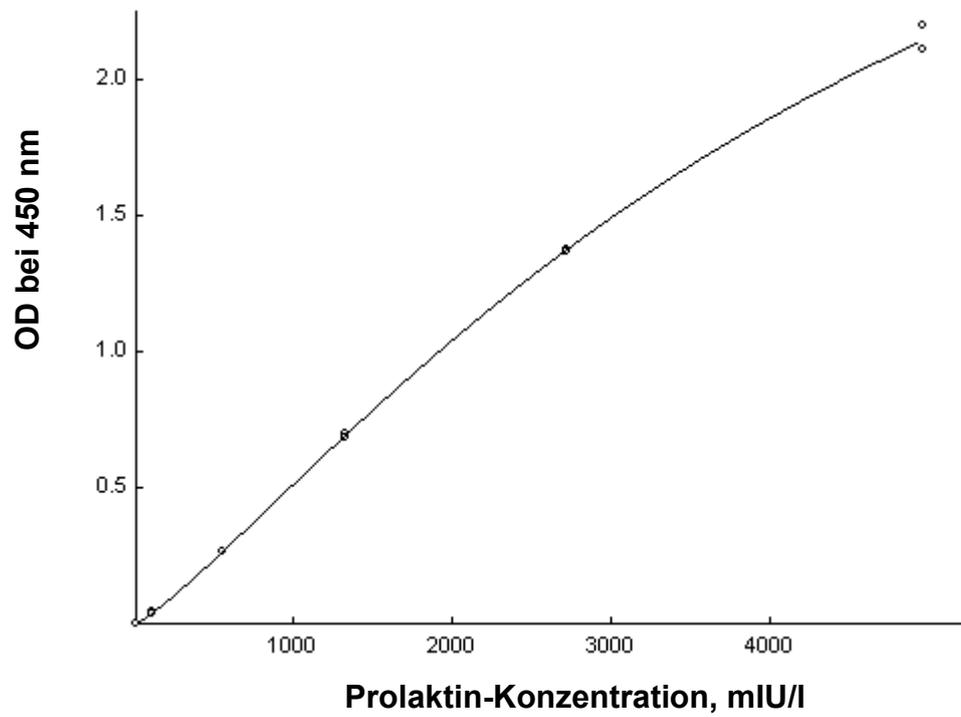
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

### **13.4.2 Quantitative Bestimmung**

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren bei 450 nm werden gegen deren jeweilige Prolaktin-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Der Mittelwert der OD der «Blank»-Kavitäten wird zur Nullstellung des Photometers benutzt.

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



*Abb.2 Typische Standardkurve*  
**Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen**

### 13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
	<b>CONJ</b>	–	100 µl
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
Inkubation No. 1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	5 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No. 2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 21-04 A)

### 14.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Prolaktin-Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung mit monoklonalen Anti-Prolaktin-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>Prolaktin Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Prolaktin-Konzentration-0; 100; 500; 1200; 2500; 4500 mIU/l. (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische Prolaktin-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen mit je 0,5 ml, <b>CAL</b> 1, 4 – 2 × 0,5 ml; <b>CAL</b> 0, 2, 3, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Prolaktin Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Prolaktin-Konzentration. Der Prolaktin-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Ist separat zu bestellen

**Anmerkung:** Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt.

*Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.*

## **14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment**

- ELISA-Automat "Alisei"
- Polypropylen Röhren 12x75, Volumen: 5,5 ml
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert<sup>1</sup>
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Laborhandschuhe

## **14.3 Testverfahren**

Der **Prolactin Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

### **14.3.1 Reagenzienvorbereitung**

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

**Anmerkung:** *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

---

<sup>1</sup> Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

**TRIAL** Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

### **14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests**

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden. Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der Prolaktin-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4 Datenverarbeitung**

### **14.4.1 Daten Verlässlichkeit (OD<sub>450 nm</sub>)**

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

## **14.5 Vorsichtsmaßnahmen**

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust

durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.

- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

## 2. INTENDED USE

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

This test has 2 complete sets:

**REF 21-04** for manual use,  
**REF 21-04 A** must be used with ELISA automatic instrument "Alisei" manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser "Alisei".

Instructions for use:

Section 13 for manual test,  
Section 14 for *analyser* "Alisei".

**Note 1:** *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

**Note 2:** *We guarantee applications of test*

**REF 21-04 A** *only on analyser "Alisei",*  
**REF 21-04** *only for manual use.*

*While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

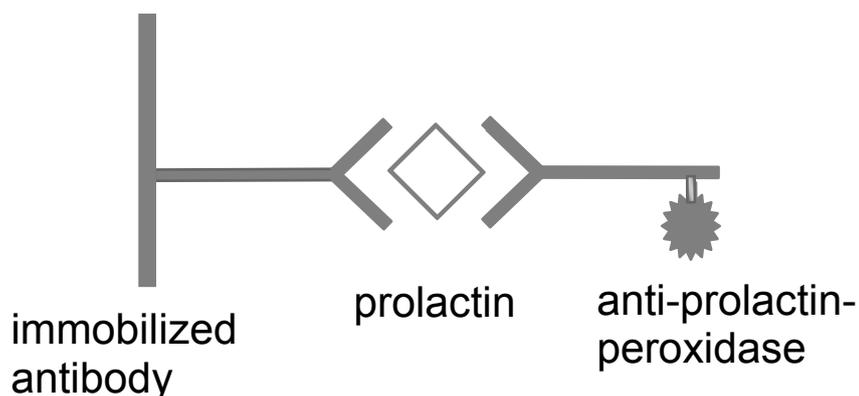
Prolactin is a single-chain protein hormone with a molecular mass of about 23,000 Da. It is synthesized in the frontal lobe of pituitary gland. The determination of prolactin is a valuable tool in diagnostics of testicular and ovarian dysfunctions. Hyperprolactinemia in women may lead to galactorrhea, 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.

### 3. 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 (HRP); the other is coated onto 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 solution to remove any material not bound on the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to prolactin level in sample.

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to prolactin concentration in specimens. Prolactin concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.



*Fig. 1 Assay scheme*

#### **4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT**

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

The **Prolactin kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening, the kit is stable for 12 month if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): for 12 month;
- vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 6 months after opening;

- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

### **Damaged Test Kits**

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

## **5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE**

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 5 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage ( $\leq -20$  °C). Avoid repeated freezing.

## 6. 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.

## 7. QUALITY CONTROL

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.

## 8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

### **MP** Microplate

Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

### **CAL** **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry

surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

### **WASH P** Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P** **20X** + 95 mL water.

Mix thoroughly, avoid foaming.

### **SUB** Substrate

Protect **substrate** from direct light.

## **9. SAMPLE PREPARATION**

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

## **10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY**

### **10.1 Calibration - Traceability**

The **Prolactin kit** was calibrated against the 3<sup>rd</sup> WHO International Standard 84/500.

## 10.2 Specificity

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

## 10.3 Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of **Prolactin kit** i.e. 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.

## 10.4 Measurement Range

The Prolactin kits (manual and Alisei kit) were validated for measurement of prolactin concentration within the concentration diapason of 50 – 4500 mIU/L.

## 10.5 Hook Effect

The **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.

## 10.6 Intra- and Inter-Assay Variation

For **Intra-Assay CV** determination, 7 serum samples (manual kit) and 8 serum samples (Alisei kit) were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

## Manual kit

Sample	Mean prolactin concentration, mIU/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	155	21.7	14.0
2	432	26.8	6.2
3	513	29.2	5.7
4	660	33.7	5.1
5	1234	55.5	4.5
6	1546	94.3	6.1
7	2567	179.7	7.0

## Alisei kit

Sample	Mean prolactin concentration, mIU/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	125	9.9	7.9
2	362	15.9	4.4
3	498	23.0	4.6
4	772	17.9	2.3
5	1240	76.8	6.2
6	1718	92.9	5.4
7	2004	66.0	3.3
8	2757	112.7	4.1

For **Inter-Assay CV** determination, 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.

## Manual kit

Sample	Mean prolactin concentration, mIU/L			Inter-Assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	154	139	144	7.6	5.4
2	218	202	195	11.8	5.9
3	302	278	262	20.1	7.5
4	324	301	281	21.5	7.4
5	348	311	308	22.3	7.2
6	470	432	431	22.2	5.2
7	958	840	851	65.2	7.7
8	2410	2409	2049	208.1	9.3

## Alisei kit

Sample	Mean prolactin concentration, mIU/L			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	125	145	140	10.4	7.6
2	362	379	344	17.5	4.8
3	498	439	468	29.5	6.3
4	772	861	769	52.3	6.5
5	1240	1334	1272	47.8	3.7
6	1718	1900	1803	91.1	5.0
7	2004	2175	2184	101.4	4.8
8	2757	2513	2499	145.1	5.6

## 11. LIMITATION OF THE METHOD

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

## 12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
  - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
  - avoid contamination of the solutions;
  - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
  - do not pour unused reagents back into the original vials;
  - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
  - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;

- the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
- do not touch the bottom of the wells.
- calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time prolactin concentration in the control.
- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.

-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
  - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
  - always use protective gloves;
  - never pipette material by mouth;
  - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

### 13. MANUAL TEST (REF 21-04)

#### 13.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells), coated with anti-prolactin monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-prolactin monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>0-5</b> <b>CAL</b>	<b>Prolactin calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known prolactin concentrations – 0; 100; 500; 1200; 2500; 4500 mIU/L. (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific Prolactin concentrations see values in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each, ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Prolactin control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known prolactin concentration. The range of concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of Prolactin concentrations see values in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate solution containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>WASH P</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered	2x14 mL, concentrated

<b>20X</b>	saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
	<b>Adhesive foil</b>	2x1 foil (optional)

### 13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

### 13.3 Test Procedure

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

#### 13.3.1 Assay Procedure

**Note:** *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

#### Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

**Note:** *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

**All samples should be tested in duplicates.**

- A.** Pipette **100  $\mu$ L conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2 (blank)**;
- B.** Pipette **20  $\mu$ L calibrators** **CAL**, control **CONTROL** and prepared patient's samples in duplicates, into the respective wells.

**Leave wells A1-A2 empty for blank!**

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

**Note:** *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C. Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm)**.
- D. **Note:** *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.* Wash 5 times, as described in section 13.3.2.
- E. Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature (+18...+25 C) in the dark for 15-30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C**.
- F. Pipette **100 µL stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. Shake for 1–2 min at room temperature.
- G. Read **OD at 450 nm within 20 min**.

### 13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;

- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

### 13.4 Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

*Example:*

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated =  $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

#### 13.4.1 Data Reliability (OD<sub>450 nm</sub>)

The data should meet the following criteria:

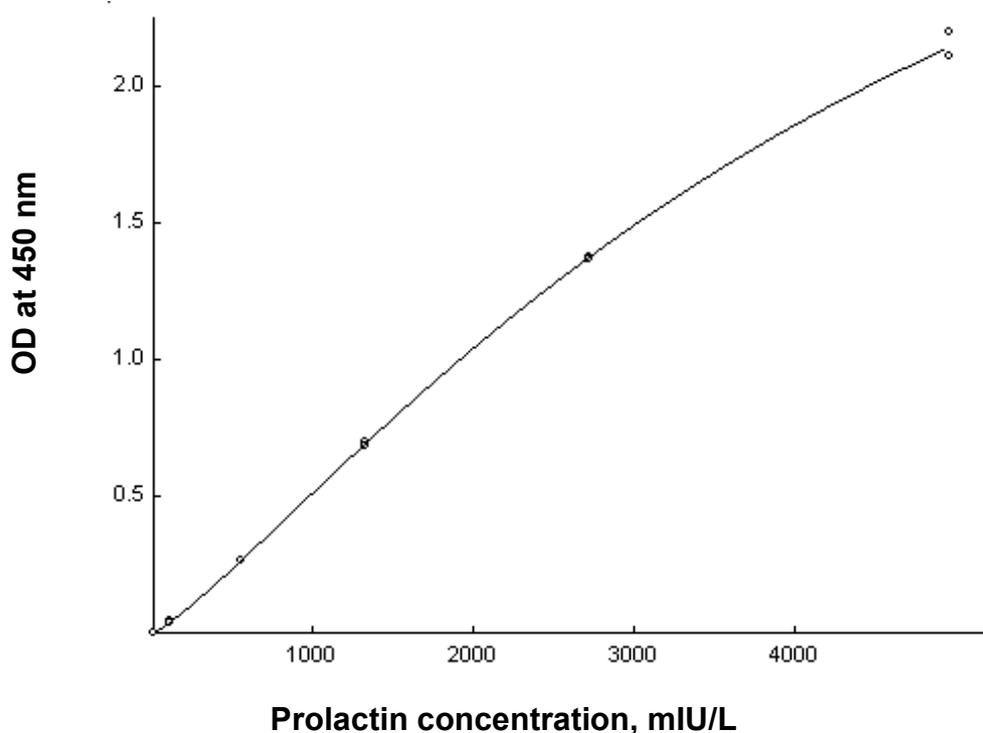
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 5  $\geq 1.5$  (after blank subtraction);
  - control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

### 13.4.2 Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective prolactin concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). The arithmetical mean OD of the two «Blank» wells is used for zero setting of device.

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



*Fig. 2 Example of typical standard curve*  
**Do not use for evaluation of real assay data!**

### 13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells		
	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Samples
<b>CONJ</b>	–	100 µL	100 µL
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	20 µL	–
Samples	–	–	20 µL
Incubation No. 1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (diluted)	5 x 300 µL		
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No. 2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

## 14. AUTOMATIC TEST (REF 21-04 A)

### 14.1 Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-Prolactin monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-Prolactin monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Prolactin calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known prolactin concentrations – 0; 100; 500; 1200; 2500; 4500 mIU/L. (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific Prolactin concentrations see values provided in the Quality Control Sheet.	<b>8 vials,</b> 0.5 mL each: <b>CAL</b> 1, 4 – 2 × 0.5 mL; <b>CAL</b> 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Prolactin control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known prolactin concentration. For lot specific ranges of Prolactin concentrations see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial solution, 5000X concentrated:</b> solution of detergent	It is delivered by separate order.

**Note:** Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser "Alisei".

## 14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated<sup>2</sup>;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

## 14.3. Test Procedure

The **Prolactin kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 14.3.1 Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

**Note:** *Preparation of other reagents see in section 8.*

**TRIAL** Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”. Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

---

<sup>2</sup> Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

### **14.3.2 Assay Procedure for Automatic Test**

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation Prolactin concentration is hardwired in analyser memory.

## **14.4 Data Processing**

### **14.4.1 Data Reliability (OD<sub>450 nm</sub>)**

See criteria in section **13.4.1**.

## **14.5 Safety precautions**

- If kit for automatic analyser is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from automatic analyser immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August 23, 2019,



Astra Biotech GmbH  
Rudower Chaussee 29,  
12489 Berlin, Germany  
Telefon: +49 (0) 30 74696509  
E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)