



DCM011-14

Ed. 03/2025

PROLACTIN ELISA

Determinazione immunoenzimatica diretta della Prolattina nel siero umano**per analisi di routine**

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test**REF** DKO11

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro***Per uso professionale in laboratorio**

Il dosaggio Prolactin ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa della Prolattina nel siero umano da una popolazione adulta.

2. SIGNIFICATO CLINICO

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

La prolattina è presente in parecchi fluidi fisiologici, compreso il plasma sanguigno, liquido amniotico, latte, secrezioni mucose e liquido cerebrospinale.

La prolattina ha molti effetti, il principale è la stimolazione delle ghiandole mammarie per la produzione di latte (lattazione). Altre funzioni della prolattina includono la sintesi dell'agente tensioattivo dei polmoni fetali alla conclusione della gravidanza e dell'immuno-tolleranza del feto dall'organismo materno durante la gravidanza.

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

La secrezione della prolattina presenta una regolarità ciclica giornaliera.

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

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

Elevate concentrazioni di prolattina nel plasma si presentano durante ovulazione, la gravidanza e lo sforzo. Livelli normali

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

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

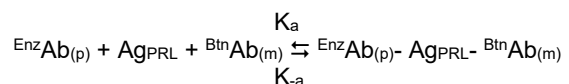
3. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

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

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



$\text{BtAb}_{(m)}$ = Anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

AgPRL = Antigene PRL nativo (quantità variabile)

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

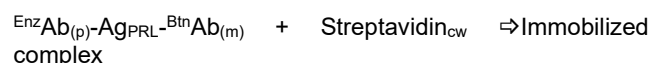
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{AgPRL} - \text{BtAb}_{(m)}$ = Complesso sandwich Antigene-Anticorpi

K_a = Costante di associazione

K_a = Costante di dissociazione

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

Questa interazione è descritta di seguito:



Streptavidin_{cw} = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Immobilized complex = Complesso sandwich Antigene-Anticorpi

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

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL)

ProClin >0,0015%, Sodium Azide <0,1% e BSA 8%

CAL0 REF DCE002/1106-0

CAL1 REF DCE002/1107-0

CAL2 REF DCE002/1108-0

CAL3 REF DCE002/1109-0

CAL4 REF DCE002/1110-0

CAL5 REF DCE002/1111-0

2. Controlli (1 flacone, 1 mL)

ProClin >0,0015%, Sodium Azide <0,1% e BSA 8%

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

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Coniugato anti prolattina con perossidasi di rafano (HRP) e anti- prolattina biotinilato, ProClin >0,0015% e BSA 0,1%

REF DCE002/1102-0

4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastre

REF DCE002/1103-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

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

ProClin <0,0015% REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M (*evitare il contatto con la pelle*)

REF DCE005-0

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

Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (calibrators, controllo, conjugate e wash solution) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.

- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori e controllo) contengono piccole quantità di l'azoturo di sodio <0,1% può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.

- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, i calibratori sono stabili a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero.

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	2 giorni
Cicli di congelamento/scongelamento	1 ciclo

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il **WHO 4th IS 83/573** ed hanno le seguenti concentrazioni:

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

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

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

Non sono necessari campioni a digiuno e non sono richieste preparazioni speciali dei campioni.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per il controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione / Controllo		50 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.			
Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiettando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.			
Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando

rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi¹¹.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) o Sigmoidale **che includa il calibratore 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

Per campioni con concentrazione superiore a C₅, diluite il campione 1:2 con il C₀.

12. VALORI ATTESI

I valori serici di Prolattina sono compresi nei seguenti intervalli:

	Valori attesi (ng/mL)
Uomini	1,8 – 17,0
Donne	
Ciclo mestruale	1,2 – 19,5
Menopausa	1,5 – 19,5

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

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

13. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

13.1. Precisione

13.1.1. Intra-Assay

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

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

13.1.2. Inter-Assay

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

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

13.2. Sensibilità

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

13.3. Accuratezza

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

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

13.4. Specificità

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

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

13.5. Correlazione

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

La curva di regressione è:

n	Pendenza	Intercetta (ng/mL)	R ²
37	1,01	1,94	0,957

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

La curva di regressione è:

n	Pendenza	Intercetta (ng/mL)	R ²
37	0,85	2,58	0,937

13.6. Effetto Hook

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

14. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*¹². I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

15. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. and Parlow, A.F.,
3. J. Clin. Endocr. Metab., 39, 199 - 202 (1974).
4. Shome, B. and Parlow, A.F.,
5. J. Clin. Endocr. Metab., 39, 203 - 205 (1974).
6. Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E.,
7. J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981)
8. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L.,
9. Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
10. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
11. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
12. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. Clin Chem, 34, 1988, pp 27-33

17. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

18. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo

al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 03/2025

DCM011-14



DCM011-14

Ed. 03/2025

PROLACTIN ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Prolactin in human serum.

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C $\Sigma = 96$ tests

REF DKO011

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

Prolactin ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of Prolactin in human serum from an adult population.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

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

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

Prolactin may also have inhibitory effects on gonadal function when present in high concentrations. There is a diurnal cycle in prolactin secretion.

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

High prolactin levels also tend to suppress the ovulatory cycle by inhibiting the secretion of both FSH and GnRH. Prolactin levels may be checked as part of a sex hormone workup, as elevated prolactin secretion can suppress the

secretion of FSH and GnRH, leading to hypogonadism, and sometimes causing erectile dysfunction in men.

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

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

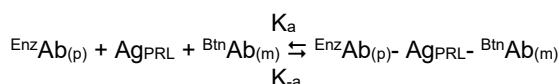
3. PRINCIPLE OF THE METHOD

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

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

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

The interaction is illustrated by the following equation:



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

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

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

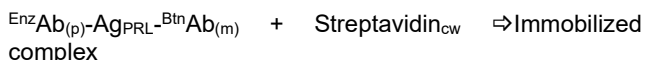
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Antigen-Antibodies Sandwich complex

K_a = Rate constant of association

K_{-a} = Rate constant of disassociation

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

This interaction is illustrated below:



Streptavidin_{cw} = Streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = Antibodies-Antigen sandwich bound.

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

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

ProClin >0.0015%, Sodium Azide <0.1% and BSA 8%

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

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis. ProClin >0.0015%, Sodium Azide <0.1% and BSA 8%

REF DCE045/1103-0

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Anti- Prolactin antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and Anti Prolactin biotinylated antibody. ProClin >0.0015% and BSA 0.1%

REF DCE002/1102-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Streptavidin adsorbed on microplate

REF DCE002/1103-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

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

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4. ProClin >0.0015%

REF DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.

- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.

-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.

- Some reagents (calibrators, control, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.

- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators and control) contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) <0.1% which may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through with large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 – 8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 – 28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the calibrators are stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	2 days
Freeze/thaw cycles	1 cycle

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The Calibrators are ready to use, are calibrated against WHO 4th IS 83/573 and have the following concentrations:

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

The control is ready to use; the concentration is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, on a roller mixer.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial “10X Conc. Wash Solution” with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of Prolactin can be performed in human serum samples. **Do not use plasma for this assay – plasma sample may lead to false results.**

Fasting samples are not necessary and no special sample preparations are required.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 – 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 – 8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 – 8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for the Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample/ Control		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	

Incubate 1h at room temperature (22 – 28 °C).
Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 15 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake gently the microplate.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit control provided in the kit should be tested as unknown and is intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of the control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories¹¹.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) or Sigmoid curve fit, **including Calibrator 0 is required.**

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

NOTE: If the absorbance of a sample exceeds that of C₅, the sample should be diluted 1:2 in C₀ and re-analysed.

12. EXPECTED VALUES

The serum Prolactin values are comprised in the following intervals:

Adults	Expected values (ng/mL)
Males	1.8 – 17.0
Females	
Premenopausal	1.2 – 19.5
Postmenopausal	1.5 – 19.5

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

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

13.1. Precision

13.1.1. Intra Assay Variation

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

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

13.1.2. Inter Assay Variation

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

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

13.2. Sensitivity

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

13.3. Accuracy

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

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

13.4. Specificity

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

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

13.5. Correlation

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

The linear regression curve was calculated:

n	Slope	Intercept (ng/mL)	R ²
37	1.01	1.94	0.957

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

The linear regression curve was calculated:

n	Slope	Intercept (ng/mL)	R ²
37	0.85	2.58	0.937

13.6. Hook Effect

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

14. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays¹². Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

15. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

16. BIBLIOGRAPHY

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

11. Basic QC Practices On-line Course;
<http://www.Westgard.com>.
12. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

17. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

18. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its

authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 03/2025

DCM011-14



DCM011-14

Ed. 03/2025

PROLACTIN ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la prolactina en suero humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO011

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El ensayo Prolactin ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la concentración de prolactina en suero humano de una población adulta.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

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

La prolactina está presente en varios fluidos fisiológicos, incluyendo el plasma sanguíneo, el líquido amniótico, la leche, las secreciones mucosas y el líquido cefalorraquídeo.

La prolactina tiene numerosos efectos, el principal es la estimulación de las glándulas mamarias para la producción de leche (lactancia). Entre otras funciones de la prolactina se incluyen la síntesis del agente tensioactivo de los pulmones fetales al final del embarazo y de la inmunotolerancia del feto del organismo materno durante el embarazo.

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

La secreción de la prolactina presenta una regularidad cíclica diaria.

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

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

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

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

Se ha observado hipoprolactinemia (bajos niveles de prolactina) en casos de hipopituitarismo.

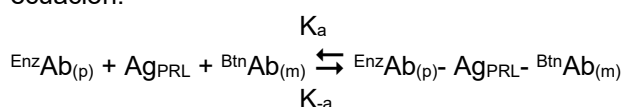
3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

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

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



$\text{BtAb}_{(m)}$ = anticuerpo biotinilado monoclonal (cantidad en exceso)

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

EnzAb_(p) = anticuerpo policlonal marcado con enzima (cantidad en exceso)

EnzAb_(p)-Ag_{PRL}-B_{tn}Ab_(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

K_a = constante de asociación

K_{-a} = constante de disociación

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

Esta interacción se describe a continuación:

EnzAb_(p)-Ag_{PRL}-B_{tn}Ab_(m) + estreptavidina_{cw} → complejo inmovilizado

Estreptavidina_{cw} = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

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

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

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

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

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

ProClin >0,0015%, NaN₃ <0,1 % y BSA 8%

CAL0 **REF DCE002/1106-0**

CAL1 **REF DCE002/1107-0**

CAL2 **REF DCE002/1108-0**

CAL3 **REF DCE002/1109-0**

CAL4 **REF DCE002/1110-0**

CAL5 **REF DCE002/1111-0**

2. Control (1 frascos, 1 mL)

ProClin >0,0015%, NaN₃ <0,1 % y BSA 8%

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis) **REF DCE045/1103-0**

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti-prolactina conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti-prolactina biotinilado. ProClin >0,0015% y BSA 0,1% **REF DCE002/1102-0**

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca **REF DCE002/1103-0**

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel). ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**

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

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) **REF DCE005-0**

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

Tampón fosfato 0.2M pH 7.4. ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (calibradores, control, conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores y control) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN₃) <0,1% que puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.

- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo

de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- Los calibradores son estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero.

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	2 días
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al WHO 4th IS 83/573, y tienen las siguientes concentraciones:

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

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para usar. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «10X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de la prolactina se realiza en suero humano. **No utilizar plasma para este ensayo – la muestra de plasma puede dar lugar a resultados falsos.**

Las muestras en ayunas no son necesarias ni se requieren preparaciones especiales de las muestras.

Almacenar la muestra a –20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2- 8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Muestra / Controles		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (22- 28 °C). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente. Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL

Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
Agite suavemente la microplaca. Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.			

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control¹¹.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL) o sigmoideo, **incluido el calibrador 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de

analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

NOTA: Si la absorbancia de una muestra excede la de C₅, la muestra debe diluirse 1:2 en C₀ y volver a analizarse.

12. VALORES ESPERADOS

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

	Valores Esperados (ng/mL)
Hombres	1,8 – 17,0
Mujeres	
Ciclo menstrual	1,2 – 19,5
Menopausia	1,5 – 19,5

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

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

13.1. Precisión

13.1.1. Intraensayo

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

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

13.1.2. Interensayo

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

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

13.2. Sensibilidad

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

13.3. Exactitud

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

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

13.4. Especificidad

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

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

13.5. Correlación

El kit Prolactin ELISA (Dia.Metra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 37 muestras de suero. La curva de regresión es:

n	Pendiente	Intersección (ng/mL)	R ²
37	1,01	1,94	0,957

El kit Prolactin ELISA Dia.Metra (Y) se ha comparado con el kit Prolactin ELISA Dia.Metra del método anterior (X). Se probaron 37 muestras de suero. La curva de regresión es la siguiente:

n	Pendiente	Intersección (ng/mL)	R ²
37	0,85	2,58	0,937

13.6. Efecto "Hook"

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

14. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*¹². Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

15. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. and Parlow, A.F.,
3. J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 202 (1974).
4. Shome, B. and Parlow, A.F.,
5. J. Clin. Endocr. Metab.,39, 203 – 205 (1974).
6. Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E.,
7. J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
8. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L.,

9. Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
10. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
11. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
12. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

17. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

18. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 03/2025

DCM011-14

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