

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЛАКТИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ПРОЛАКТИН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации пролактина в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пролактин представляет собой полипептид из 198 аминокислот с молекулярной массой около 22500 Да, секретируемый эозинофилами передней доли гипофиза. Одной из основных причин бесплодия являются гиперплазия и аденомы гипофиза. Кроме того, функциональные изменения в регуляции репродуктивной функции также связаны с нарушениями в секреции гипофизарных гормонов. Одним из маркеров этих нарушений является нарушенная секреция пролактина. В связи с этим ВОЗ рекомендовала использовать определение уровня пролактина в крови в качестве скринингового теста при первичном обследовании супругов, обращающихся в медицинские учреждения по поводу бесплодия. До наступления менархе уровень пролактина в крови низкий и повышается в пубертатный период. В это время пролактин стимулирует развитие молочных желез. В течение менструального цикла уровень пролактина непостоянен. Он повышается в перiovуляторный период и во вторую половину лютеиновой фазы (его уровень может достигать 900 мМЕд/л), поэтому определять уровень пролактина рекомендуется в первую фазу цикла. Во время беременности и лактации секреция гормона возрастает. Кроме того, физиологическая гиперпролактинемия наблюдается при стрессовой ситуации и при физической нагрузке. Секреция пролактина осуществляется в определенном суточном ритме: максимум приходится на период сна (в 3–7 раз выше, чем в течение дня). В связи с этим очень важным является время отбора образцов крови для анализа. Увеличение концентрации пролактина отмечено при пролактинпродуцирующих опухолях гипофиза; идиопатических гиперпролактинемиях (симптомы: у женщин – нарушение менструаций, у мужчин – импотенция); гипофункции щитовидной железы; почечной недостаточности; приеме производных фенотиазина, галоперидола, имизина, эстрогенов, пероральных контрацептивов, гистаминных препаратов, опиатов; постинсулиновой гипогликемии. Уменьшение концентрации пролактина наблюдается при: хирургическом удалении гипофиза; лечении бромкриптином; приеме тироксина; рентгенотерапии.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение пролактина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к пролактину человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание пролактина, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к пролактину человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации пролактина в исследуемом образце. Концентрацию пролактина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания пролактина в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к пролактину человека с другими анализитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
гормон роста	<0.1
плацентарный лактоген	<0.1
ТТГ	<0.1
ЛГ	<0.1
ФСГ	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания пролактина в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ПРОЛАКТИН-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации пролактина в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей пролактин, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 100–2000 мМЕ/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации пролактина предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 200 мМЕ/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ПРОЛАКТИН-ИФА» концентрация пролактина в сыворотке (плазме) крови не превышает 10 мМЕ/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P206Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C206Z	Калибровочные пробы на основе сыворотки, содержащие известные количества пролактина – 0; 100; 200; 1000; 2000 мМЕ/л , готовы к использованию (калибровочная проба 0 мМЕ/л – 2 мл, остальные – по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q206Z	Контрольная сывортка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием пролактина, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T206Z	Конъюгат, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K206I	Инструкция по применению Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА»	1	шт.	-
10	K206Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ПРОЛАКТИН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации пролактина в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагается концентрация пролактина в исследуемом образце превышает 2000 мМЕ/л, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация пролактина в калибровочных пробах (мМЕ/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание пролактина в исследуемых образцах. Если исследуемый образец преобразовали (см. п. 2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций пролактина в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (10 мМЕ/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (2000 мМЕ/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация пролактина ниже 10 мМЕ/л или выше 2000 мМЕ/л.

Исследуемая группа	Единицы, мМЕ/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	60	560
Женщины		
Беременные:		
1-й триместр	-	2000
2-й триместр	-	6000
3-й триместр	-	10000
Фазы цикла:		
фолликулярная	60	600
лютеиновая	120	900
менопауза	40	550

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Caufriez A. Menstrual disorders associated with hyperprolactinemia. Hormone Res. 1985; 22:209-14.
2. Niall, M.D. et al, «The Chemistry of Growth Hormone and the Lactogenic Hormones»; Recent Progr. Horm. Res. 29,471 (1974).
3. Frantz A.G. Physiology in medicine: prolactin. New Engl. J Med 1978; 298: 201-7.
4. Kato Y. et al. Regulation of prolactin secretion. In: The Pituitary Gland. Ed. H. Imura. New York, Raven Press. 1985; pp.261-278.
5. Thorner, M.O., Edwards, C.R.W., Hanker, J.P., Abraham, G., and Besser, G.M., «The Testes in Normal and Infertile Men», Troen, P. and Nankin, H.R. (eds.), Raven Press, New York, 351-366, (1977).
6. Daughday, W.H., «The Adenohypophysis, Textbook of Endocrinology»; Williams, 6th Ed., Chapter 3, 87-87, (1981).

По вопросам, касающимся качества Набора **«ПРОЛАКТИН-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF PROLACTIN IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of Prolactin in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of Prolactin in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Prolactin is a 198 aminoacids polypeptide with molecular weight ca. 22.5 kDa which is secreted by eosinophil cells of hypophysis.

Hyperplasia and adenomas of hypophysis are the main causes of infertility. Functional changes in regulation of reproductory function are also caused by alterations in secretion of hormones of hypophysis. One of markers of such alterations is changes in Prolactin secretion. That is why WHO recommended to use determination of Prolactin level as a screening test in primary laboratory investigation of couples claiming for infertility.

In women Prolactin level remains low before menarche and elevates during puberty. During this period, Prolactin stimulates development of mammary glands. Prolactin level changes during menstrual cycle with elevations up to 900 mIU/l seen during periovulatory period and the second stage of luteinic phase. That is why it is recommended to evaluate Prolactin level during the first stage of the cycle. Besides, physiological hyperprolactinemia is seen in stress conditions and after physical exercises.

Prolactin secretion is subject to circadian rhythms with maximal levels found during the night (3-7 fold higher than during the day). That is why time of sampling is extremely important.

Elevated Prolactin levels are seen in Prolactin-producing tumours of hypophysis, idiopathic hyperprolactinemias (symptoms: in women – alteration of menstrual cycle, in men – impotence), hypofunction of the thyroid gland, renal insufficiency, after intake of phenothiazine derivatives, haloperidol, estrogens, oral contraceptives, histamine preparations, opiates, in hypoglycemia caused by insuline intake.

Low Prolactin levels are found after surgical resection of hypophysis, after X-ray therapy, after bromocriptin therapy, after intake of T4.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human Prolactin-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to human Prolactin, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP Prolactin EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2	CAL 1-5 Calibrator set, 0.8 ml each, zero calibrator C1 – 2 ml. The set contains 5 calibrators: 0; 100; 200; 1000; 2000 mIU/l	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp. date
5	SUBS TMB Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp. date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8 °C or 5 days at RT
7	STOP Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
8	N003 Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	K206I Instruction Prolactin EIA	1	pcs		N/A
10	K206Q QC data sheet Prolactin EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using (zero calibrator). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator
12	Apply point-by-point method for data reduction.

7.5. Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

8. 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.

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

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

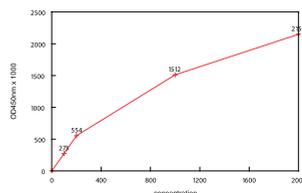
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus Prolactin concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of Prolactin in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 mIU/l	0.06
CAL 2	100 mIU/l	0.33
CAL 3	200 mIU/l	0.61
CAL 4	1000 mIU/l	1.57
CAL 5	2000 mIU/l	2.21



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Prolactin. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, mIU/l	
	Lower limit	Upper limit
Males	60	560
Females		
Pregnancy week:		
1st trimester	-	2000
2nd trimester	-	6000
3rd trimester	-	10000
Menstrual cycle:		
follicular phase	60	600
luteinic phase	120	900
post menopausal	40	550

11. PERFORMANCE CHARACTERISTIC

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
hGH	<0.1
lactogen	<0.1
TSH	<0.1
LH	<0.1
FSH	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 10 mIU/l.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different Prolactin concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known Prolactin concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. Caufriez A. Menstrual disorders associated with hyperprolactinemia. *Hormone Res.* 1985; 22:209-14.
2. Niall, M.D. et al, «The Chemistry of Growth Hormone and the Lactogenic Hormones»; *Recent Progr. Horm. Res.* 29,471 (1974).
3. Frantz A.G. Physiology in medicine: prolactin. *New Engl. J Med* 1978; 298: 201-7.
4. Kato Y. et al. Regulation of prolactin secretion. In: *The Pituitary Gland*. Ed. H. Imura. New York, Raven Press. 1985; pp.261-278.
5. Thorner, M.O., Edwards, C.R.W., Hanker, J.P., Abraham, G., and Besser, G.M., «The Testes in Normal and Infertile Men», Troen, P. and Nankin, H.R. (eds.), Raven Press, New York, 351-366, (1977).
6. Daughday, W.H., «The Adenohypophysis, Textbook of Endocrinology»; Williams, 6th Ed., Chapter 3, 87-87, (1981).