



DiaMetra



# PROLACTIN

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la prolactina en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO011

## USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de prolactina en suero o plasma humano.

El kit Prolactin está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

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.

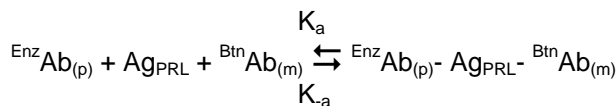
## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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:



$\text{B}^{\text{tn}} \text{Ab}_{(m)}$  = anticuerpo biotinilado monoclonal (cantidad en exceso)

$\text{Ag}_{\text{PRL}}$  = antígeno PRL nativo (cantidad variable)

$\text{Enz Ab}_{(p)}$  = anticuerpo policlonal marcado con enzima (cantidad en exceso)

$\text{Enz Ab}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}} \text{Ab}_{(m)}$  = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

$\text{K}_a$  = constante de asociación

$\text{K}_{-a}$  = 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:

$\text{EnzAb}_{(p)}\text{-Ag}_{\text{PRL}}\text{-}^{\text{Btn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{estreptavidina}_{\text{cw}} \Rightarrow \text{complejo inmovilizado}$

$\text{Estreptavidina}_{\text{cw}} = \text{estreptavidina inmovilizada en el pocillo}$

$\text{Complejo inmovilizado} = \text{complejo sándwich antígeno-anticuerpos}$

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.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de prolactina (6 frascos, 1 mL cada uno)

STD0	<b>REF</b> DCE002/1106-0
STD1	<b>REF</b> DCE002/1107-0
STD2	<b>REF</b> DCE002/1108-0
STD3	<b>REF</b> DCE002/1109-0
STD4	<b>REF</b> DCE002/1110-0
STD5	<b>REF</b> DCE002/1111-0

2. Prolactin Control (1 frascos, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Quality Control Report)

**REF** DCE045/1103-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti-prolactina conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti-prolactina biotinilado

**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)

$\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB (0,26 g/L)

(evitar el contacto con la piel) **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. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF** DCE006-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm).

### Nota

Conservar todos los reactivos a  $2\pm 8$  °C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar

### 4. PRECAUCIONES

- Los reactivos contienen Proclin 300<sup>R</sup> como conservante.
- Evitar la exposición del reactivo TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  a la luz directa del sol, metales u oxidantes.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y en la dispensación de los reactivos.
- No usar reactivos de distintos lotes.
- No usar muestras muy hemolizadas.
- Este método permite determinar concentraciones de prolactina de 5,0 ng/mL a 100,0 ng/mL.

### 5. PROCEDIMIENTO

#### 5.1. Preparación de los estándares ( $S_0$ ... $S_5$ )

Los estándares, calibrados frente al WHO 3<sup>rd</sup> IS 84/500, tienen las siguientes concentraciones:

	$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$	$S_5$
ng/mL	0	5	10	25	50	100

Una vez abiertos, los estándares permanecen estables al menos 6 meses a  $2-8$ °C.

#### 5.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a  $2\pm 8$  °C durante al menos 30 días.

#### 5.3. Preparación de la muestra

La determinación de la prolactina se realiza en suero o plasma humano. Si la dosificación no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a  $-20$ °C. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para muestras con una concentración superior a 100 ng/mL, diluir 1 en 2 la muestra con estándar 0.

#### 5.4. Procedimiento

Puesto que es necesario operar por duplicado, preparar dos pocillos para cada punto de la curva estándar ( $S_0$ - $S_5$ ), dos para cada muestra, dos para el Control y uno para el blanco.

Reactivos	Estándar	Muestras /Control	Blanco
Muestras /Control		50 µL	
Estándares S <sub>0</sub> -S <sub>5</sub>	50 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28 °C). Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco.			

## 6. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de prolactina para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 7. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

### 7.1. Rendimiento del análisis

No usar muestras contaminadas microbiológicamente, ni muestras muy lipémicas o hemolizadas. Es importante que el tiempo de reacción de cada pocillo sea el mismo para obtener resultados reproducibles. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe ser superior a 10 minutos. Si dura más de 10 minutos, se recomienda seguir el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, repetir la curva estándar en cada plato. La adición del substrato TMB inicia una reacción cinética que se termina con la adición de la solución de interrupción.

La adición del substrato y de la solución de interrupción debe realizarse en la misma secuencia para evitar distintos tiempos de reacción. Los lectores de microplacas miden las DO verticalmente. No tocar el fondo de los pocillos. Si no se aspira completamente la solución de lavado de los pocillos se pueden producir repeticiones pobres y resultados falsos.

### 7.2. Interpretación de los resultados

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10 % de las concentraciones asignadas.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva estándar (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva estándar

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los estándares (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>) (p. ej.: logística de cuatro parámetros o sigmoideo).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

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

Muestras	Rango ng/mL	
Hombres	1,8 - 17,0	
Mujeres:	ciclo menstrual	1,2 - 19,5
	Menopausia	1,5 - 18,5

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

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

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

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

#### 10.1.2. 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.

Muestra	N	X	$\sigma$	C.V.
Nivel 1	10	5.46	0.30	5.49%
Nivel 2	10	17.72	0.91	5.16%
Nivel 3	10	36.29	1.67	4.60%

### 10.2. Sensibilidad

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

### 10.3. 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 ( $\pm$ DE) de 102.52%  $\pm$  9.75%.

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

### 10.4. Especificidad

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

h. prolactina	100,0%
LH	N.D.
FSH	N.D.
hCG	N.D.
TSH	N.D.
hGH	N.D.

### 10.5. Correlación

El kit Prolactin (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 37 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 1.01 * (\text{ensayo comercial}) + 1.94$$

$$r^2 = 0,957$$

El kit Prolactin Diametra (Y) se ha comparado con el kit Prolactin Diametra del método anterior (X). Se probaron 37 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0,85 * X + 2.58$$

$$r^2 = 0,937$$

### 10.6. Efecto "Hook"

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

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

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

Ed 06/2011









DCM011-9

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039-02-2133354.

**Manufact:** Via Giustozzi, 35/35a– Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy  
Tel. 0039-0742-24851 Fax 0039-0742-316197  
E-mail: info@diametra.com

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

**IT***Spiegazione dei simboli***GB***Explanation of symbols***FR***Explication des symboles***ES***Significado de los símbolos***DE***Verwendete Symbole***PT***Explicação dos símbolos*

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Fabricante FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
<b>REF</b>	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricación FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesgo biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE Chargenbezeichnung ES Código del lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "h" Tests ES Contenido suficiente para "h" ensayos FR Contenu suffisant pour "h" tests GB Contains sufficient for "h" tests IT Contenuto sufficiente per "h" saggi PT Contém o suficiente para "h" testes	<b>Cont.</b>	DE Inhalt ES Contenido del kit FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límites de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

## **SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING**

### **ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**

#### **No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

#### **Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

#### **Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

#### **Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

#### **CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

#### **CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

### **ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**

#### **No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

#### **Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

#### **Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

#### **Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation