

# PATHOZYME® PROLACTIN Ref OD427

## Immunoenzymatyczny test (EIA) do ilościowego oznaczania prolaktyny w ludzkiej surowicy.

### Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.

### Do diagnostyki "in vitro".

#### WPROWADZENIE

Ludzka prolaktyna (hormon pobudzający wytwarzanie mleka) jest wydzielana zarówno u kobiet jak i u mężczyzn z przedniego płata przysadki mózgowej. Hormon ten jest cząsteczką polipeptydu zbudowaną z pojedynczego łańcucha o masie cząsteczkowej ok. 23 000 daltonów. Wydzielanie i sekrecja prolaktyny podlega neuroendokrynnej kontroli, głównie poprzez czynnik pobudzający wydzielanie i czynnik hamujący wydzielanie prolaktyny.

U kobiet prawidłowy poziom prolaktyny jest nieznacznie wyższy, zależny od poziomu estrogenów i wzrastający w okresie dojrzewania, a odpowiednio spadający w czasie menopauzy. Główne funkcje biologiczne prolaktyny to działanie na rozwój gruczołu sutkowego i utrzymywanie wydzielania mleka, jak również stwierdzono niejednoznaczne oddziaływanie supresyjne na funkcjonowanie gonad. W czasie ciąży, poziom prolaktyny wzrasta 10-20-krotnie i spada do poziomu przed okresem ciąży w ciągu 3-4 tygodni po porodzie. U matek karmiących piersią utrzymuje się wysoki poziom prolaktyny i powrót do normalnego poziomu może zająć kilka miesięcy.

Oznaczanie poziomu prolaktyny ułatwia diagnozowanie zaburzeń układu podwzgórzowo-przysadkowego.

Nierozważalne (małe guzy przysadki) mogą powodować hiperprolaktynemię, która bardzo często towarzyszy impotencji u mężczyzn. Wysoki poziom prolaktyny często występuje w mlekotoku i przy braku miesiączki. Zaobserwowano wzrost stężenia prolaktyny indukowany przez estrogeny, hormon uwalniający tyrotropinę (TRH) i niektóre leki oddziałujące na mechanizmy dopaminergiczne. Poziom prolaktyny podnosi się w chorobach nerek, w niedoczynności tarczycy i w niektórych przypadkach, którym towarzyszą stres, wysiłek fizyczny lub hipokaliemia. Ponadto, uwalnianie prolaktyny jest epizodyczne i wykazuje zmienność w ciągu dnia. Nieznaczny wzrost poziomu prolaktyny powinien być brany pod uwagę przy rozpatrywaniu powyższych przypadków. Wzrost prolaktyny może być indukowany przez takie leki jak chlorpromazyna i rezerpina, a obniżenie przez bromokryptynę i L-dopa.

Nie stwierdzono reakcji krzyżowych (wynik negatywny) dla następujących parametrów: HCG (WHO 1<sup>st</sup> IRP 75/537) dla poziomu 500,000 mIU/ml, FSH (WHO 2<sup>nd</sup> IRP HMG) dla poziomu 500 mIU/ml, LH (WHO 1<sup>st</sup> IRP 68/40) dla poziomu 1000 mIU/ml, TSH (WHO 2<sup>nd</sup> IRP 80/558) dla poziomu 500 mIU/ml i GH (WHO 1<sup>st</sup> IRP 65/217) dla poziomu 1000ng/ml.

#### PRZEZNACZENIE

PATHOZYME PROLACTIN jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania prolaktyny w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

#### ZASADA TESTU

Kubeczki mikroplastyki opłaszczony są specyficznymi przeciwciałami anti-prolaktynowymi. Do testu należy użyć surowicy. Następnie dodawane są kozie przeciwciała anti-prolaktynowe znakowane peroksydazą chrzanową (koniugat enzymatyczny). Prolaktyna obecna w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniugat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniugatu zostaje odplukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na obecność prolaktyny w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu siarkowego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm.

Test został wykalibrowany względem wewnętrznego standardu i 1<sup>st</sup> IRP standardu WHO (WHO 1st IRP 75/504).

#### SKŁAD ZESTAWU

Ref  
OD427



|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <b>Microtitre Plate</b>  | 12 x 8 wells x 1                      |
| Dzielną mikroplastykę z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczoną w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć. |                                       |
| <b>Cal</b>   | <b>A</b> 0 ng / ml                    |
| Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona prolaktyny. Liofilizat.  |                                       |
| <b>Cal</b>   | <b>B</b> 5 ng / ml                    |
| Standard referencyjny: prolaktyna rozpuszczona w ludzkiej surowicy. Liofilizat.  |                                       |
| <b>Cal</b>   | <b>C</b> 15 ng / ml                   |
| Standard referencyjny: prolaktyna rozpuszczona w ludzkiej surowicy. Liofilizat.  |                                       |
| <b>Cal</b>   | <b>D</b> 50 ng / ml                   |
| Standard referencyjny: prolaktyna rozpuszczona w ludzkiej surowicy. Liofilizat.  |                                       |
| <b>Cal</b>   | <b>E</b> 100 ng / ml                  |
| Standard referencyjny: prolaktyna rozpuszczona w ludzkiej surowicy. Liofilizat.  |                                       |
| <b>Cal</b>   | <b>F</b> 200 ng / ml                  |
| Standard referencyjny: prolaktyna rozpuszczona w ludzkiej surowicy. Liofilizat.  |                                       |
| <b>Conj</b>  | 11ml                                  |
| Koniugat HRP anti-prolaktynowy: koniugat anti-prolaktynowy znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Różowy)                           |                                       |
| <b>Subs</b>  | <b>TMB</b> 11ml                       |
| Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna a w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)  |                                       |
| <b>Soln</b>  | <b>Stop</b> <b>HCl</b> <b>1M</b> 11ml |
| Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas siarkowy rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)                                       |                                       |
| <b>Instrukcja i druk protokołu.</b> 1 + 1  |                                       |

#### MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl, 1000µl i 5000µl.  
Końcówki do pipet.  
Papier absorbacyjny.  
Czynnik mikroplastyk z filtrem 450 nm.  
Papier milimetrowy.  
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

#### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME PROLACTIN zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV 1 i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME PROLACTIN nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME PROLACTIN zawiera rozcieńczony kwas siarkowy jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME PROLACTIN zawierają 1% Proclin™ 300\* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą i udać się do pomocy medycznej.

\*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

#### PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

#### PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżą surowicę.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydki sodowej jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

#### PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

Standardy: do każdej fiołki dodać po 1 ml wody destylowanej w celu rozpuszczenia liofilizatów. Odstawić na przynajmniej 20 minut przed użyciem. Rozpuszczone standardy są trwałe przez 30 dni jeśli są przechowywane w temp. 2°C - 8°C. W celu dłuższego przechowywania szczelnie zamknięte standardy zamrozić w temp. - 20°C. Przed użyciem rozmrożone standardy muszą być delikatnie wymieszane.

#### OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

## PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zannotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50 $\mu$ l standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100 $\mu$ l koniugatu.
6. Mieszać delikatnie przez 10 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
7. Inkubować 45 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
9. Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300 $\mu$ l. Wyrzucić zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
10. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300 $\mu$ l płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
11. Do wszystkich kubeczków dodać po 100  $\mu$ l roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
12. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
13. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100  $\mu$ l odczynnika zatrzymującego reakcję.
14. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
15. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyk przy długości fali 450 nm.

## WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania sphywały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odwrotności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

## OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji ( $A_{450}$ ) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości prolaktyny dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

## WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

Każde laboratorium powinno ustalić własne zakresy wartości prawidłowych dla swojej populacji. W oparciu o określoną ilość próbek badanych pozyskanych od zdrowych, dorosłych ludzi, średnie stężenie prolaktyny dla mężczyzn (N=90) i kobiet (N=120) wynosi odpowiednio 6 i 15 ng/ml. Minimalne wykrywane testem PATHOZYME PROLACTIN stężenie prolaktyny wynosi 2 ng/ml. Nie stwierdzono wpływu innych czynników na wynik oznaczenia wykonanego testem PATHOZYME PROLACTIN do poziomu 4 000 ng/ml.

## OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności dla testu PATHOZYME PROLACTIN jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyme Prolactin i Serono MAIAclone Prolactin Kit użyto próbek o wartościach prolaktyny pomiędzy 1,2 a 265,9 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

|   |           |
|---|-----------|
| Liczba próbek badanych                  | 123       |
| Współczynnik korelacji                  | 0.99      |
| Wartość nachylenia krzywej              | 0.9344    |
| Punkt przecięcia z osią OY              | -2.16     |
| Wartość średnia testem Omega            | 23.4ng/ml |
| Wartość średnia testem Serono MAIAclone | 22.6ng/ml |

Testy wykazują dobrą korelację.

## PIŚMIENNICTWO

1. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E. J. Immunol. Methods. 1981;42:11-15.
2. Shome, B. and Parlow, A. F. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1977;45:1112-1115.
3. Cowden, E. A., Ratcliffe, W. A., Beasall, G. H. and Ratcliffe, J. G. Annals Clin. Biochem. 1979;16:113-121
4. Frantz, A. G. N. Engl. J. Med. 1978;298:201-207.
5. Jacobs, L., Snyder, P., Wilber, J., Utiger, R. and Daughaday, W. J. Clin. Endocrin. 1978;33:996.

## SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50 $\mu$ l standardów i próbek badanych, następnie do każdego kubeczka dodać po 100 $\mu$ l koniugatu enzymatycznego. Delikatnie mieszać przez 10 sekund.
2. Inkubować 45 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
3. Wylać zawartość z kubeczków i przemyc 5-krotnie wodą destylowaną.
4. Do każdego kubeczka dodać po 100 $\mu$ l substratu. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
5. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
6. Do każdego kubeczka dodać po 100 $\mu$ l odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
7. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8092 ISSUE 3 Revised July 2010

© Omega Diagnostics Ltd., 2010 POLISH.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD  
Omega House, Hillfoots Business Village  
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom  
odl@omegadiagnostics.co.uk  
www.omegadiagnostics.com  
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY