



DISTRIBUIDORA DE EQUIPO Y SERVICIO GONZÁLEZ S.A. DE C.V.
Fuente de la Rana #58, Col. Fuentes de Morelia, Morelia, Mich.
(443) 233 03 03 con 10 líneas
ventas@desego.com
www.desego.com

Inserto Prolactina (PRL)

MONOBIND, INC.
HORMONA PROLACTINA (PRL)
 Código de Producto: 725-300

Intención de uso:
 La determinación cuantitativa de la concentración de Hormona Prolactina en suero humano o plasma por inmunoensayo de enzima en microplato.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

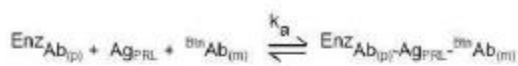
La hormona prolactina (PRL), secretada de los lactotrofos de la pituitaria anterior, es una proteína consistente de una cadena polipéptica y contiene aproximadamente 200 aminoácidos. La acción biológica primaria de la hormona es en la glándula mamaria donde está implicada en la glándula de crecimiento y en la inducción y mantenimiento de la producción de leche. Hay evidencia que sugiere que la prolactina puede estar implicada en la esteroidogénesis en la gónada, actuando sinérgicamente con la hormona Luteinizante (LH). Los altos niveles de prolactina aparecen para inhibir la esteroidogénesis tanto como para inhibir LH y la hormona estimulante del folículo (FSH) síntesis en la glándula pituitaria. (1,2). El uso clínico de la medida de la hormona de prolactina (PRL), comprueba el diagnóstico de hiperprolactinemia y para supervisar subsecuentemente la efectividad del tratamiento que ha sido establecido.

En este método, el calibrador de PRL, se agrega primero el espécimen paciente o el control a un pozo cubierto de streptavidin. Monoclonal biotinilado y los anticuerpos etiquetados enzima (dirigidos contra epitomes distintos y diversos de PRL) se agregan y se mezcla el reactivo. La reacción entre los varios anticuerpos de PRL y el PRL nativo forma un complejo de sándwich que se enlaza con el streptavidin cubierto al pozo. Después de la terminación del periodo requerido de la incubación, la conjugación encastrada del anticuerpo enzima-prolactina es separada de la conjugación desatada de enzima-prolactina por la aspiración o la decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato conveniente para producir color. El empleo de varias referencias de suero en la concentración sabida de la prolactina permite la construcción de un gráfico de la actividad y de la concentración. De la comparación de la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración de prolactina

PRINCIPIO

PRUEBA POR EIA:

Los reactivos esenciales requeridos para un análisis Inmunoenzimométrico incluyen el anticuerpo inmovilizado, con diferentes y con reconocimiento distinto del epitome, en exceso, y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie del micro pozo a través de la interacción de streptavidin recubierto en el pozo y el exógeno agregado monoclonal biotinilado al anticuerpo de anti-PRL. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, conjugación del enzima-antígeno etiquetado y un suero que contienen el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y los anticuerpos sin competencia o sterice hidrance, para formar un sándwich complejo soluble. La interacción es ilustrada por la ecuación seguida:



$\text{Ab}^{\text{m}}_{(\text{m})}$ = Anticuerpo Monoclonal Biotinilado (Cantidad en Exceso)

Ag^{PRL} = Antígeno Nativo (Cantidad Variable)

$\text{Enz}^{\text{Ab}}_{(\text{p})}$ = Anticuerpo Enzima Etiquetada (Cantidad en Exceso)

$\text{Enz}^{\text{Ab}}_{(\text{p})} - \text{Ag}^{\text{PRL}} - \text{Ab}^{\text{m}}_{(\text{m})}$ = Antígeno-Anticuerpo Sandwich Complejo

k_a = Valor Constante de Asociación

k_{-a} = Valor Constante de Disociación

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción esta ilustrada abajo:



$\text{Streptavidin}_{\text{CW}}$ = Streptavidin inmovilizado en micropozo

Complejo Inmovilizado = sandwich complejo unida al pozo

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-unido es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando de varias referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

MATERIAL PROVEEIDO

A. PRL Calibradores - 1ml/vial - Frascos A-F

Seis (6) frascos de referencia del suero para el antígeno PRL en los niveles de 0(A), 5(B), 10(C), 25(D), 50(E) y 100(F) ng/ml*. Almacene a 2-8° C. Se ha agregado un preservativo.

*Nota: los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra el WHO 3rd IS (84/500).

B. REACTIVO DE ENZIMA PROLACTINA - 13ml/- frasco del icono

Un (1) frasco etiquetado con enzima anticuerpo, biotinilado monoclonal Mouse IgG en solución, tinte y preservativo. Almacene a 2-8°C.

C. MICROPLATO REVESTIDO STREPTAVIDIN - 96 pozos - icono ?

Un (1) microplato de 96 pozos cubierto con streptavidin y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Almacénesse a 2-8° C.

D. SOLUCION CONCENTRADA LAVADORA--20ml - icono

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénesse a 2-8 °C.

E. SUSTRATO A -- 7ml/frasco icono S

Un (1) frasco que contiene tetrametilbenzidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

F. SUSTRATO B -- 7ml/frasco icono S

Un (1) frasco que contiene el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución. Almacénesse en 2-8°C.

G. SOLUCIÓN DE PARO --8ml/frasco icono

Un (1) frasco que contiene acido fuerte (1N HCl). Almacénesse en 2-8°C.

I. Instrucciones del producto.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit. Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando están almacenados en 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para una sola microplaca de 96-pozos.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO:

1. Mida con una pipeta capaz de entregar los volúmenes 50µl con una precisión de mejor de 1.5%.

2. Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.300ml con una precisión de mejor de 1.5%.

3. Lavador de Microplacas o una botella de apretón (opcional).

4. Lector de Microplaca con filtros de 450nm & 620nm.

5. Tubos de ensayo para mezclar sustratos A&B.

6. Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos de la microplaca.

7. Plástico envolvente o tapa para la microplaca para los pasos de la incubación.

8. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.

9. Contador de tiempo.

10. Materiales del control de calidad

PRECAUCIONES

Para el Uso De Diagnóstico In Vitro No Para el Uso Interno o Externo en Seres Humanos o Animales.

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el Centro para el Control de Enfermedad/el Instituto Nacional de la Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes deben ser sangre, suero en tipo y tener las precauciones generales en la colección de muestras del veni-puntura. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra de ayuno del suero de la mañana debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo liso de venipuntura de tapón rojo sin añadidos o anticogulantes. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de cinco (5) días. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Evite congelar y deshelar. Cuando analice en duplicado, se requiere 0.100ml del espécimen.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. SOLUCION LAVADORA.

Diluir el contenido del concentrado lavador a 1000ml con agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacéñese a temperatura ambiente entre los 20-27°C. por no más de 60 días.

2. SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO.

Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución "A" en el frasco etiquetado con Solución "B". Mezcle y guarde a 2-8°C. O para períodos más largos de uso determinado, la cantidad de reactivo que necesite y prepare mezclando porciones iguales del Sustrato A y Sustrato B en un contenedor adecuado. Por ejemplo, agregue 1ml de A y 1ml de B por dos (2) tiras de ocho pozos (si se excede en la solución, desechela la porción sobrante). Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C.)

- Ajuste a formato los pozos de los micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. Guarde los micropozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.
- Mida con una pipeta 0.050 ml (50µl) de la referencia, del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.
- Agregue 0.100 ml (100µl) de la solución del reactivo de la enzima PRL.
- Remolinar el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar y cubrir.
- Incube 30 minutos en la temperatura ambiente.
- Deseche el contenido del micro placa por decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.
- Agregue 300µl de la solución lavadora (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo (golpee y borre) o aspirelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. Una lavadora automática o manual de la placa puede ser utilizada. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada uno bien presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.
- Agregue 0.100 ml (100µl) de solución activadora del sustrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación del reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.

NO AGITE DESPUES DE ADICIONAL EL SUSTRATO

- Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.
- Agregue 0.050ml (50µl) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
- Lea la absorbencia en cada pozo en los 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del micro placa. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregar la solución de paro.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo en bajo, medio y alto rango de la curva de la reacción para monitorear el buen funcionamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y determinar los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de Calidad deben de mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. Desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Reactivos frescos deben usarse para determinar la razón de las variaciones.

RESULTADOS

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de la hormona de foliculo en especímenes desconocidos.

- Una curva de la reacción se usa para comprobar la concentración de Prolactina (PRL) en especímenes desconocidos
- Registre la absorbencia obtenida del listado del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
- Trace la absorbencia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de PRL en ng/ml en el papel de gráfico lineal.

4. Dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.

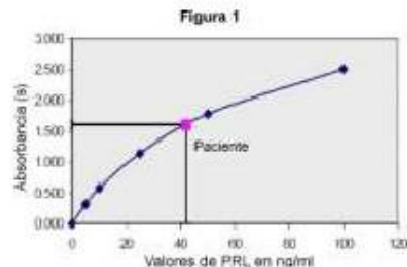
5. Para determinar la concentración del PRL para un desconocido, localice la absorbencia media de los duplicados para cada desconocido en el eje del gráfico, encuentre el punto que se interseca en la curva, y lea la concentración (en ng/ml) del eje del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado).

Nota: El software de la reducción de datos de la computadora diseñado para los análisis de ELISA se puede también utilizar para la reducción de datos.

EJEMPLO 1

Muestra	I.D.	Numero de Pozo	Absorbancia (A)	Absorbancia Sigif. (B)	Valor (ng/ml)
Cal A	A1		0.001	0.003	0
	B1		0.005		
Cal B	C1		0.310	0.318	5
	D1		0.328		
Cal C	E1		0.564	0.579	10
	F1		0.574		
Cal D	G1		1.136	1.144	25
	H1		1.151		
Cal E	A2		1.767	1.784	50
	B2		1.781		
Cal F	C2		2.531	2.509	100
	D2		2.485		
Ctrl 1	E2		0.420	0.423	6.9
	F2		0.426		
Ctrl 2	G2		0.890	0.892	17.1
	H2		0.895		
Patient I	A3		1.592	1.609	42.1
	B3		1.625		

* Las informaciones presentadas en el Ejemplo 1 y figura 1 son ilustrativas solamente no deben usarse para basarse en la curva preparada con cada ensayo.



PARAMETROS DEL CONTROL DE CALIDAD

En orden para que los resultados del análisis sean considerados válidos los criterios siguientes deben ser conocidos: 1. La absorbencia (OD) del calibrador 100 ng/ml debe ser ± 1.3 . 2. Cuatro fuera de seis piscinas de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A. Funcionamiento

- Es importante que el tiempo de la reacción en cada uno pozos este llevada a cabo constante para que los resultados se produzcan. El medir con una pipeta de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
- Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
- La adición de la solución del sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de stop. Por lo tanto, la adición del sustrato y de la solución de paro se agrega en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Los lectores de la placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- La falta de retirar la solución adecuadamente en el paso del lavado y de la aspiración o de la decantación puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.
- Utilice los componentes del mismo lote. No entre mezclase los reactivos de diferentes lotes.

B. Interpretación

- Si la reducción de datos controlados de la computadora se utilizan para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores varíen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
- Los especímenes de pacientes con altos niveles de prolactina anormalmente pueden causar un efecto de gancho, que es, paradójicamente resultados de baja absorbancia. Si esto sucede, diluya el espécimen 1/100 con calibrador 0, realice (multiplique el resultado por 100). De cualquier manera, los valores tan altos como 3000ng/ml han sido encontrados de absorber cantidades más grandes que la absorbancia más alta del calibrador.
- Pacientes recibiendo preparaciones de anticuerpos monoclonales para diagnóstico o terapia pueden contener anti-Mouse anticuerpos humanos (HAMA) y pueden mostrar tanto falsos valores elevados como valores depresivos cuando se analizan.
- Embarazo, Lactancia y la administración oral de contraceptivos pueden causar un incremento en el nivel de prolactina.
- Drogas como la morfina, reserpina y drogas psicótropas incrementan la secreción de prolactina. (5, 6, 7)
- Desde que la concentración de la hormona prolactina es dependiente a diversos factores otros como la pituitaria homeostasis, la determinación solitaria no es suficiente para determinar un status clínico.

RANGOS ESPERADOS Y VALORES

Un estudio de un normal adulto aparentemente normal fue tomado para determinar valores previstos para el sistema de pruebas por microplato de PRL por ELISA. Los valores previstos (95% intervalos confidenciales) se presentan en la tabla 1.

TABLE 1
Valores Esperados para la prueba de PRL por ELISA
(En ng/ml)

	Mujeres
Adultos (Número = 70)	1.2 - - 19.5
Postmenopausia (Número = 10)	1.5 - - 18.5
	Hombres
Adultos (Número = 50)	1.8 - - 17.0

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se pueden esperar se encuentran por un método dado para una población de "personas normales" es dependiente sobre una multiplicidad de factores: la especificidad del método, de la población probada y de la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender de la gama de valores establecidos esperados por el fabricante solamente hasta que una lata interna de la gama determinada por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

CARACTERÍSTICAS DE ACTUACION

La precisión y entre la precisión del análisis del procedimiento de PRL ELISA Microplac fue determinada por análisis en tres diversos niveles de los sueros del control. El número, el valor medio, la desviación de estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros del control se presentan en la tabla 2 y la tabla 3.

TABLE 2
Precisión Dentro Ensayo (Valores en ng/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	24	10.6	0.35	3.3%
Nivel 2	24	28.6	0.84	3.0%
Nivel 3	24	77.5	1.93	2.5%

TABLE 3
Precisión Entre Ensayo (Valores en ng/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	10	11.5	0.19	1.7%
Nivel 2	10	27.8	0.50	1.8%
Nivel 3	10	78.5	2.32	3.0%

*Como medido en 10 experimentos por duplicado.

* Según lo medido en diez experimentos en duplicado

B. Exactitud

El procedimiento de Prolactina por microplato de ELISA fue comparado con un método de referencia de quimioluminómetro (ICMA). Especímenes biológicos de poblaciones normales y embarazos fueron analizados. El número total de estos especímenes fue de 86. La ecuación de regresión del último cuadro y la correlación del coeficiente fueron computadas por la ELISA PRL en comparación con el método de referencia. La información obtenida se muestra en la tabla 4.

TABLE 4
Último Cuadro

Método	Signif (X)Análisis	Regresión	Correlación Coeficiente
Este método	19.0	$y=1.63 + 1.01(x)$	0.973
Referencia	17.3		

Solo una pequeña cantidad de la referencia de diagonal entre este método y el método de referencia es indicada por la proximidad de los valores medios. La ecuación de la regresión de la última tabla y el coeficiente de correlación indica el acuerdo excelente del método.

C. Sensibilidad

El procedimiento de la hormona prolactina tiene una sensibilidad de 0.04 ng. Esta es equivalente a una muestra que contiene una concentración de PRL de 0.8 ng/ml.

D. Especificidad:

El método de reactividad cruzada de la hormona de prolactina para seleccionar sustancias fue evaluada agregando la sustancia que interfería a una matriz del suero en las varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfería a la dosis de prolactina necesitada para desplazar el mismo trazo de la absorbancia.

Sustancia	Reactividad Cruzada	Concentración
Hormona Prolactina PRL	1.0000	---
Hormona Luteinizante	< 0.0002	1000ng/ml
Follitropina (FSH)	< 0.0001	1000ng/ml
Gonadotropina Corionica (CG)	< 0.0001	1000ng/ml
Tirotropina (TSH)	< 0.0001	1000ng/ml
Hormona de Crecimiento	< 0.0001	1000ng/ml

REFERENCIA

- Maddox, P.R., Jones, D.L., Mansel, R.E. *Acta Endocrinol* **126**, 621 (1981)
- Gonzales, E.R. *JAMA* **242**, 401 (1979)
- Tolis, G. *Hosp Pract* **15**, 85 (1980)
- Balagura, S., Frantz, A.G., Housheian, E.M. *J Neurosurg* **51**, 42 (1979)
- Finesen, H., Hwang, P. *Ann Rev Med* **24**, 251 (1973)
- Frantz, A.G. *N Eng J Med* **298**, 201 (1978)
- Parkes, D.N. *J Med* **301**, 873 (1979)
- Tietz, N. *Clinical Guide to Laboratory Tests* WB Saunders, Philadelphia, London **2nd Ed.** (1992)
- Jackson RD, Wortsman J, Malarky WB. "Persistence of large molecular weight prolactin secretions during pregnancy in women with macroprolactinemia and its presence in fetal cord blood." *J Clin Endo & Metabol* **68**, 1046-50 (1989)
- Fraser IS, Lun ZG, Zhou JP, Hemington AC, McCarron G, Coterson I et al. "Detailed assessment of big prolactin in women with hyperprolactinemia and normal ovary function." *J Clin Endo & Metabol* **69**, 585-592 (1989)
- Pasini F, Bergamini CM, Malfaccini M, Cocciolo G, Linciano M, Jacobs M, Bagni B. "Multiple molecular forms of prolactin during pregnancy in women." *J Endocrinol* **106**, 81-86 (1985)

