

PRL

Prueba ELISA para la determinación cuantitativa de prolactina (PRL) en suero humano

Presentación del estuche

REF 53030 96 determinaciones Estuche completo
IVD

Uso previsto

La Prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica consistente en una cadena peptídica simple de aproximadamente 200 aminoácidos. La hormona es secretada por la hipófisis anterior. Ejerce su mayor acción biológica sobre la glándula mamaria, donde la Prolactina estimula el crecimiento, induce y mantiene la producción de leche. Niveles patológicamente elevados se han reportado en casos de adenomas hipofisarios productores de Prolactina, con síntomas tales como amenorrea, hipogonadismo, y galactorrea. Se ha establecido claramente la utilidad clínica y diagnóstica de la medición de Prolactina para el diagnóstico de hiperprolactinemia y para el subsecuente monitoreo de la eficiencia del tratamiento.

Principio - Sandwich EIA -

El análisis PRL ELISA está basado en la clásica técnica ELISA sandwich. Como un análisis de segunda generación, hace uso del sistema de alta afinidad Biotina-Estreptavidina. Los micropocillos ELISA se recubren con Estreptavidina. En la primera parte de incubación, las muestras, calibradores o controles, conjugado enzimático (anti-PRL marcado con Peroxidasa) y un segundo anticuerpo monoclonal biotinado anti-PRL se agrega para formar el complejo sandwich el cual se une a la superficie de los pocillos por la interacción de la biotina con la estreptavidina inmovilizada. Al final de la incubación, el exceso de conjugado enzimático y de anticuerpos monoclonales son eliminados por lavado. Se agrega TMB/Sustrato (etapa 2) y el color resultante, el cual se transforma a amarillo después de detener la reacción con la solución de parada se mide fotométricamente. El incremento de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de PRL en la muestra. La concentración se evalúa por medio de una curva de calibración la cual se establece con los calibradores provistos en el estuche.

Reactivos y contenidos

MIC	12	Tiras de Micropocillos (en portatiras) Tiras divisibles de 8 pocillos, recubiertos con estreptavidina	
CAL	A - F 6x2,0ml	Calibradores (tapa blanca) listos para usar, en suero humano Concentraciones de PRL: 0 (A), 5,0 (B), 10,0 (C), 25,0 (D), 50,0 (E) y 100 (F) ng/ml.	
CON	13 ml	Conjugado enzimático (tapa blanca) listo para usar, coloreado amarillo anti-PRL (cabra), marcado con HRP, anti-PRL (monoclonal, ratón), biotinado	pH 7,45 ± 0,1 1,0 µg/ml
WS	20 ml	Solución de Lavado (tapa negra) Concentrado para 1000 ml Buffer MOPS salino	pH 8,8 ± 0,4 5 mmol/l
SA	7,0 ml	Reactivo Substrato A (tapa amarilla) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Buffer Acetato de Sodio	pH 3,5 ± 0,1 4 mmol/l 0,05 mol/l
SB	7,0 ml	Reactivo Substrato B (tapa azul) Peróxido de Urea Hidrógeno Buffer Acetato de Sodio	pH 4,5 ± 0,1 10 mmol/l 0,05 mol/l
STOP	7,5 ml	Solución de Parada (tapa roja) Acido sulfúrico	0,5 mol/l
	1	Tira adhesiva	

Agentes preservantes: Concentración total < 0,04%

Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y CAL deberían ser manipulados como posibles agentes potencialmente infecciosos. CAL han sido encontrados negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o CAL deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

STOP irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C. Después de abiertos, los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver "Nota").

MIC

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas hasta la fecha de expiración (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deberían siempre estar almacenados a 2...8°C.

Solución de trabajo de Lavado WASH

- **Una ligera turbidez que puede aparecer en el concentrado WS se disuelve completamente durante la dilución.**
- Diluir WS a 1000 ml con agua desionizada fresca en un envase apropiado. Enjuagar el envase varias veces.
- Estabilidad: **60 días a 15...25°C.**

Solución de trabajo Substrato SUB

- **Para un uso prologado:** preparar cantidad necesaria mezclando porciones iguales SA y SB. Usar solamente un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua desionizada.
- **Utilizar dentro de 30 días:** Verter el contenido de un frasco de SA en un frasco de SB y mezclar. Almacenar de 2...8°C.
- ¡Manipular SUB cuidadosamente y evitar la contaminación! ¡No utilizar si es de color azul!
- Almacenar la solución protegida de la luz intensa.
- Estabilidad: **30 día a 2...8°C.**

Muestra

Suero
No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.
Las muestras pueden almacenarse por 5 días a 2...8°C, o por hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez.** Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Seguir el procedimiento exactamente como se describe.

Notas de uso

- U1:** No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.
- U2:** No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.
- U3:** Notar el reparto CAL, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.
- U4:** MIC – sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.
- U5:** **Analizar cada CAL, control o muestra por duplicado. Pipetearlos en el fondo de los micropocillos.**
- U6:** **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos.** Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva CAL en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración para cada placa.
- U7:** Evitar/remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.
- U8:** SUB inicia y STOP termina una reacción cinética. **Evitar la luz intensa** durante el desarrollo del color.
- U9:** MIC - **Después de cada pipeteo agitar suavemente durante 20-30 sec.** sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si está disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER).

Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remover las tiras adhesivas, aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos 3 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, **remover el líquido remanente** invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Etapa 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2 Calibradores	E2... Muestras
[CAL] A-F; en duplicado	50	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	50
[CON]	100	100
Mezclar y cubrir [MIC] con cinta adhesiva		
Incubar por 60 min. a 20...25°C		
Lavar 3 veces como se describe (ver L1 – L3)		
[WASH]	300	300
Etapa 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min. a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	50	50
Mezclar cuidadosamente		
Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 10 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).		

Validación de la prueba

Los resultados son válidos si se cumplen los siguientes criterios :

Absorbancia máxima ([CAL] F) D.O. $\geq 1,5$

Concentración PRL al 80% absorbancia máx. = 60 ± 12 ng/ml

Concentración PRL al 50% absorbancia máx. = 30 ± 6 ng/ml

Concentración PRL al 20% absorbancia máx. = 8 ± 3 ng/ml

Cálculo

Una curva de calibración se usa para interpolar la concentración de PRL en las muestras desconocidas.

- [CAL] - Graficar la absorbancia de los duplicados contra la correspondiente concentración de PRL en ng/ml sobre papel milimetrado lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de graficar).
- Trazar la mejor curva a través de los puntos graficados.
- Para determinar la concentración de PRL en una muestra desconocida (S), localizar el promedio de absorbancia de los duplicados sobre el eje vertical del gráfico, hallar el punto de intersección sobre la curva, y leer la concentración (en ng/ml) en el eje horizontal del gráfico (ver ilustración).

Interpretación de resultados

La Prolactina muestra un notable ritmo circadiano, comenzando a elevarse durante el sueño. Por ello se recomienda que las muestras sean tomadas 2 horas después de dormir o muy temprano en la mañana luego de 12 horas de ayuno. La ingesta de morfina y reserpina, tanto como el tratamiento con sicotrópicos y drogas antihipertensivas tienen que ser cuidadosamente evaluados ya que estas drogas pueden aumentar la secreción de Prolactina.

El stress y el ejercicio moderado pueden causar un aumento moderado de las concentraciones de Prolactina. Considerando que los niveles de Prolactina dependen de diversos factores además de la homeostasis hipofisiaria, la situación clínica no debería basarse sólo en la determinación de Prolactina.

Anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) pueden mostrar valores falsamente elevados o disminuidos en pacientes tratados con anticuerpos monoclonales de ratón.

El embarazo, la lactancia y los anticonceptivos orales, pueden aumentar los niveles de Prolactina.

Valores esperados

Valores de base	PRL [ng/ml]
Mujeres, no-embarazadas	1,2 – 19,5
Mujeres, postmenopáusicas	1,5 – 18,5
Hombres	1,8 – 17,0

Valores por encima de 200 ng/ml de PRL son indicadores de adenomas de hipofisis, y sobre 250 ng/ml de PRL confirman un proceso tumoral.

Cada laboratorio debería determinar sus propios rangos de referencia utilizando los instrumentos/equipos, métodos de colección de sangre y técnicas de análisis usuales empleados normalmente en dicho laboratorio.

Datos de rendimiento

La prueba PRL ELISA tiene una sensibilidad analítica de aproximadamente 0,8 ng/ml PRL.

Muestras de pacientes con niveles de Prolactina anormalmente elevados, pueden causar absorbancia muy bajas. Si se sospecha este efecto, se debe diluir la muestra 1/100 con [CAL] A (0,0 ng/ml PRL), reanalizar y multiplicar el resultado por 100. Valores con concentraciones de hasta 3000 ng/ml dan absorbancias mayores que el [CAL] F.

El análisis se estandarizó según el estándar internacional OMS 3^o (1988, 84/500) para PRL.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

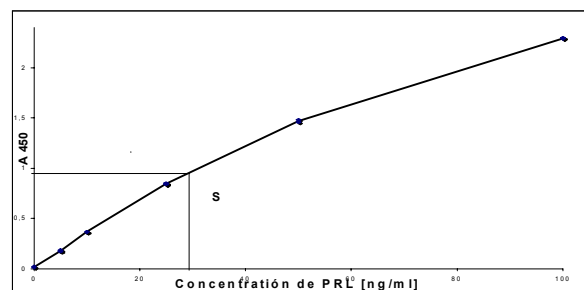
www.human.de/data/gb/vr/el-prl.pdf o www.human-de.com/data/gb/vr/el-prl.pdf

Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la contaminación por el operador está directamente relacionada con el número de veces que se introduce un tip en el vial. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación cuidadosa según las buenas prácticas de laboratorio (GLP*) hace posible el uso de los reactivos pasados de 60 días. ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



Referencias

- Maddox P. R. *et al.*, Acta Endocrinol. **125**, 621 (1991)
- Gonzales E. R., JAMA **242**, 401 (1979)
- Tolis G., Hosp. Pract. **15**, 85 (1980)
- Balagura S. *et al.*, J. Neurosurg. **51**, 42 (1979)
- Friesen H. *et al.*, Ann. Rev. Med. **24**, 251 (1973)
- Frantz A. G., New Engl. J. Med. **298**, 201 (1978)
- Parkes D. N., J. Med. **301**, 873 (1979)
- Tietz N., Clinical Guide to Laboratory Tests. WB Saunders, Philadelphia, London 2.Ed. (1992)

EL-PRL
INF 5303001 E
06-2004-13



Human Gesellschaft für Biochemia und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 - D-65205 Wiesbaden - Germany
Telefon: +49 6122 9988 0 - Telefax: +49 6122 9988 100 - eMail: human@human.de