

Prolactin

CE

1. INTRODUCTION

La prolactine est une hormone polypeptidique de synthèse sécrétée par l'antéhypophyse (hypophyse antérieure) et par le placenta. De plus, elle est produite dans d'autres tissus compris entre le sein et la caduque. La sécrétion hypophysaire de la prolactine est régulée par les neurones neurosécrétoires de la dopamine du noyau arqué qui inhibent la sécrétion de la prolactine.

La prolactine est présente dans de nombreux liquides physiologiques, notamment le plasma sanguin, le liquide amniotique, le lait, les sécrétions des muqueuses et le liquide cébrospinal. La prolactine a de nombreux effets, dont le principal est la stimulation des glandes mammaires pour la production de lait (lactation). Les autres fonctions de la prolactine incluent la synthèse de l'agent tensioactif des poumons du fœtus en fin de grossesse et de l'immuno-tolérance du fœtus par rapport à l'organisme maternel pendant la grossesse.

La prolactine peut également avoir des effets inhibiteurs sur la fonction gonadique lorsqu'elle est présente à hautes concentrations.

La sécrétion de la prolactine présente une régularité cyclique journalière.

Pendant la grossesse, les concentrations élevées d'œstrogènes circulant promeuvent la synthèse de la prolactine. Les niveaux résultant de la sécrétion de prolactine provoquent la maturation des glandes mammaires pour la lactation. Après l'accouchement, les taux de prolactine tombent du fait de la suppression du stimulus interne.

Les taux élevés de prolactine tendent à supprimer le cycle ovulatoire en inhibant la sécrétion de la FSH et de la GnRH. Les taux de prolactine peuvent être contrôlés comme composant d'une évaluation des hormones sexuelles parce que la sécrétion élevée de prolactine peut supprimer la sécrétion de FSH et de GnRH, ce qui entraîne un phénomène d'hypogonadisme provoquant parfois des anomalies de la fonction érectile chez les hommes.

Des concentrations élevées de prolactine dans le plasma se présentent pendant la lactation, la grossesse et l'effort. Des taux normaux de prolactine dans le plasma (hyperprolactinémie) peuvent se présenter en conséquence des adénomes hypophysaires, d'autres anomalies anatomiques et traumatiques, en réponse à certains agents pharmacologiques et dans l'hypothyroïdie. L'hypoprolactinémie (bas taux de prolactine) a été observée en cas d'hypohypophysie.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de Prolactine dans le sérum humain.

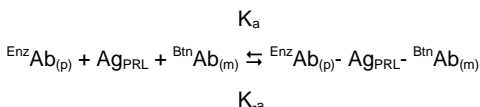
3. PRINCIPE DU DOSAGE

Les réactifs essentiels requis pour le test immunoenzymatique incluent des anticorps à forte affinité et spécificité élevées (conjugués avec des enzymes et immobilisés) pour la reconnaissance des épitopes divers et distincts en excès et de l'antigène natif.

Dans cette procédure, l'immobilisation a lieu pendant le test sur la surface des puits de la microplaque par l'interaction entre la streptavidine fixée sur les puits et l'anticorps anti-PRL biotinylé ajouté.

En mélangeant l'anticorps biotinylé, l'anticorps conjugué à l'enzyme et un sérum contenant l'antigène natif, on observe une réaction entre l'antigène natif et les anticorps, sans compétition ou encombrement stérique, pour former un complexe sandwich soluble.

L'interaction est représentée par l'équation suivante :



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Anticorps monoclonal biotinylé (quantité en excès)

Ag_{PRL} = Antigène PRL natif (quantité variable)

$\text{EnzAb}_{(p)}$ = Anticorps polyclonal marqué à l'enzyme (quantité en excès)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Complexe sandwich Antigène-Anticorps

K_a = Constante d'association

K_{-a} = Constante de dissociation

Le complexe se dépose simultanément sur le puits suite à la réaction par forte affinité entre la streptavidine et l'anticorps biotinylé.

Cette interaction est décrite ci-dessous :

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{Streptavidine}_{\text{cw}} \Rightarrow \text{Complexe immobilisé}$

$\text{Streptavidine}_{\text{cw}}$ = Streptavidine immobilisée sur le puits

Complexe immobilisé = Complexe sandwich antigène-anticorps

Une fois l'équilibre atteint, la fraction liée à l'anticorps de l'antigène se sépare de l'antigène libre par décantation ou aspiration.

L'activité enzymatique dans la fraction liée est directement proportionnelle à la concentration de l'antigène natif.

En utilisant divers sérums de référence avec des valeurs connues d'antigène, il est possible de construire une courbe dose réponse sur la base de laquelle déterminer la concentration de l'antigène dans des échantillons inconnus.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts** : 12 bandes détachables enduites de Streptavidine de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué d'Anti-Prolactine-HRP** : 1 flacon contenant 12 ml d'anticorps anti-prolactine conjugué avec de la peroxydase de raifort (HRP) et anti-prolactine biotinilé
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois (Tampon phosphaté 0,2 M, Proclin < 0,0015%)
- **Contrôle de Prolactine** : 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique d'une solution de contrôle.
- **Etalons Prolactine** : 6 flacons, 1 ml chacun. Les étalons sont obtenus par étalonnage avec WHO 3rd IS 84/500 et ont les concentrations suivantes de prolactine:

Etalon 0:	0 ng/ml
Etalon 1:	5 ng/ml
Etalon 2:	10 ng/ml
Etalon 3:	25 ng/ml
Etalon 4:	50 ng/ml
Etalon 5:	100 ng/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité. Une fois ouverts, ils sont stables pendant 6 mois à 2-8°C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pour au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites Streptavidine et sont prêtes à l'emploi. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C.*

6.2. Conjugué d'anti-Prolactine-HRP

1 flacon contenant 12 ml d'anticorps anti-prolactine conjugué avec de la peroxydase de raifort (HRP) et anti-prolactine biotinilé. Cette solution est prête à l'emploi.

6.3. Etalons de 17-OH Progesterone

Chaque flacon contient 1 ml solution 'étalon. La concentration est indiquée par 4.1. Les étalons sont prêts à l'emploi. *Après la première utilisation les étalons restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.*

6.4. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8 °C.

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10^{ème}. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.7. Contrôle

Le flacon contient 1 ml d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de la prolactine peut être effectuée sur sérum humain. Ne pas utiliser le plasma pour cette analyse (le plasma peut conduire à des valeurs anormales de l'essai).

Ne pas utiliser échantillons hémolysés, ictériques ou lipémiqiques.

Pour obtenir le sérum le sang doit être recueilli dans un tube de prélèvement par voie veineuse, sans additifs ou anticoagulants. Attendre que le sang coagule. Mettre l'échantillon à centrifuger pour séparer le sérum des cellules.

Les échantillons devraient être réfrigérés à 2-8°C pendant un maximum de 2 jours. S'ils ne peuvent être dosés dans cette période, ils doivent être conservés à -20°C. Eviter les cycles de congélation et décongélation.

Pour des échantillons avec des concentrations supérieures à 100 ng/ml, diluer l'échantillon 1:2 avec le Calibrateur 0.

7.1. Précaution d'usage

- Éviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations de Prolactine de 5 à 100 ng/ml.

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 50 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure à température ambiante (22 – 28°C) à l'obscurité.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive,

secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

5. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22 – 28°C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesures l'absorbance des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons en fonction de la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur le courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en IU/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Chaque laboratoire devrait établir sa propre fourchette de valeurs en fonction de sa population de patients.

Les valeurs sériques de prolactine sont comprises dans les intervalles suivants:

Échantillons		Plage ng/ml
Hommes		1,8 - 17,0
Femmes :	Cycle menstruel	1,2 - 19,5
	Ménopause	1,5 - 18,5

Certains échantillons féminins testés dans ce groupe utilisent probablement des contraceptifs oraux qui peuvent avoir influencé les résultats.

Il est important de noter que la détermination d'une gamme de valeurs attendues dans une méthode donnée pour une population de «normal» est tributaire de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode en usage, et la population étudiée. Par conséquent, chaque laboratoire devrait examiner la gamme spécifiée par le fabricant comme un guide général et de produire leur propre gamme de valeurs attendues sur la base des laboratoires où la population autochtone habite.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de Prolactine pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminés dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un réplicat (x 20) sur trois sérums différents dans un dosage.

Echantillon	N	X	σ	C.V.
Niveau 1	20	5,33	0,15	2,78%
Niveau 2	20	18,21	0,73	4,03%
Niveau 3	20	37,20	1,38	3,71%

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée par un réplicat (x 10) sur trois sérums de contrôle différents en lots différents.

Echantillon	N	X	σ	C.V.
Niveau 1	10	5,46	0,30	5,49%
Niveau 2	10	17,72	0,91	5,16%
Niveau 3	10	36,29	1,67	4,60%

11.2. Spécificité analytique

L'anticorps employé présente les réactions croisées suivantes, calculées à 50% selon Abraham :

hProlactine	100%
LH	N.D.
FSH	N.D.
hCG	N.D.
TSH	N.D.
hGH	N.D.

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de Prolactine par l'étalon 0 est 0.12 ng/ml avec une limite de confiance de 95%.

11.4. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur des échantillons enrichis avec 3.13 – 6.25 -12.50 – 25.00 – 50.00 ng/ml de Prolactine a donné une valeur moyenne (\pm SD) di 102.52% \pm 9.75%.

Trois différents échantillons ont été dilués 2 - 4 - 8 – 16 fois ; la valeur moyenne (\pm SD) est 102.19% \pm 9.80%.

11.5. Comparaison de méthode

Le Prolactine NovaTec ELISA (Y) a été comparé à un Prolactine kit disponible en commerce (X). 37 échantillons de sérum ont été testés. Les courbes de régression sont les suivantes:

$$Y = 1.01 \cdot X + 1.94$$

$$r^2 = 0,957$$

Le nouveau Prolactine NovaTec kit a été comparé avec le kit Prolactine NovaTec précédent. 37 échantillons de sérum ont été testés. Les courbes de régression sont les suivantes:

$$Y = 0.85 \cdot X - 2.58$$

$$r^2 = 0,937$$

11.6. Effet « Hook »

Dans cette méthode, aucun effet crochet n'a été observé jusqu'à 200 ng/ml.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.

- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300[®] comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être fait durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Il est important de maintenir constants les temps de réaction dans chaque puits afin d'obtenir les résultats susceptibles d'être répétés. Le pipetage des échantillons ne doit pas durer plus de 10 minutes afin d'éviter tout résultat incorrect. S'il se prolonge au-delà des 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. Si vous devez utiliser plus d'une microplaque, il est conseillé de répéter la courbe dose-réponse.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV032

Prolactine (96 Dosages)