

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Prolactin canine ELISA

VET

REF

DEV9944



96 Wells

CONTENTS

1	INTRODUCTION.....	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN.....	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	8
8	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
9	LIMITATIONS OF PROCEDURE.....	10
10	REFERENCES	10
11	SHORT INSTRUCTION.....	11

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	12
2	METHODIK UND TESTPRINZIP	12
3	HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN.....	13
4	KITBESTANDTEILE.....	14
5	PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	NORMALWERTE	17
8	TESTCHARAKTERISTIKA	18
9	LIMITATIONEN	19
10	LITERATUR	19
11	KURZANLEITUNG.....	20
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS	21

1 INTRODUCTION

1.1 INTENDED USE

The Demeditec Prolactin canine ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative measurement of canine prolactin.

1.2 SUMMARY AND EXPLANATION

Canine prolactin (cPRL) is a single-chain polypeptide hormone of the canine anterior pituitary with a molecular mass of approx. 22,000. Prolactin from different species exhibits significant variations in the amino acid sequence. Canine prolactin differs from human prolactin at about 60 percent of all residues.

The secretion of cPRL from the pituitary is inhibited by hypothalamic prolactin-inhibitory factor (PIF). Although dopamine was long thought to be this PIF molecule, today it seems that there is a special peptide with prolactin-inhibiting activities. The release of prolactin is certainly stimulated by different peptides, particularly thyrotropin releasing hormone (TRH) and vasocative intestinal peptide (VIP). Estrogens and progesterone also seem to play a role in the secretion of prolactin, and neurogenic factors influence its release. Milking and suckling are immediately followed by an increase in serum cPRL.

The most important role of prolactin is stimulation of mammary gland growth and lactation. During pregnancy, prolactin levels in canine blood increase slightly; during lactation, significantly. Prolactin has a wide variety of other physiological actions. It affects water and electrolyte balance, metabolism and gonadal function; is an important stress hormone; and seems to play a role in the maintenance of the long interestrous interval in the bitch.

In dogs with pituitary-depent hyperadrenocorticism, prolactin levels in blood were higher than in healthy animals. Prolactin determinations can be used in the therapeutic control of hyperprolactinemia. During a pseudo pregnancy, prolactin is increased. Therapy with alkaloids like bromocriptine lowers PRL levels, and lactation and maternal behaviour are decreased.

The secretory capacity of the pituitary can be tested with the TRH stimulation test.

2 PRINCIPLE

The test kit is a solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of canine prolactin. The microplate is coated with a first monoclonal antibody specific for canine prolactin.

Calibrators and samples are pipetted into the antibody coated microplate. During a 2 hours incubation endogenous canine prolactin in the sample bind to the antibodies fixed on the inner surface of the wells. Non-reactive sample components are removed by a washing step.

Afterwards, a second polyclonal horseradish peroxidase-labeled antibody, directed against another epitope of the Prolactin molecule, is added. During an 1 hour incubation, a sandwich complex consisting of the two antibodies and the canine prolactin is formed. An excess of enzyme conjugate is washed out.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine), is added to all wells. During a 30 minutes incubation, the substrate is converted to a colored end product (blue) by the fixed enzyme. Enzyme reaction is stopped by dispensing of hydrochloric acid as stop solution (change from blue to yellow). The color intensity is direct proportional to the concentration of canine prolactin present in the sample.

The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm. Bi-chromatic measurement with a 600 - 690 nm reference filter is recommended.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents of this test kit are strictly intended for **veterinary research** use only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays.

Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.

All reagents should be stored refrigerated at 2 - 8 °C in their original container. Do not interchange kit components from different lots and assays. The expiration dates stated on the labels of the shipping container and all vials have to be observed. Do not use kit components beyond their expiration dates. Allow all kit components and specimen to reach room temperature (18 – 28 °C) prior to use and mix well.

During handling of all kit reagents, control and serum samples observe the existing legal regulations handling potentially infectious materials. Especially the following precautions should be taken:

- do not eat, drink or smoke
- do not pipette by mouth, use safety pipettes
- wear disposable gloves and avoid contact with kit reagents, control and sample material.

The test kit contains components of human origin which were found negative for Hepatitis B surface antigen and HIV (Human Immunodeficiency Virus). Nevertheless, for products derived from human or animal source it cannot be completely guaranteed, that they do not contain the above mentioned, others and not yet known or not diagnosticable pathogens. Sample material of patients (for example serum or plasma) normally used in laboratory determinations are always classified as potentially infectious. According to the same safety guides, kit reagents and control material are to be used. Samples of risk patients should be specially labeled and if necessary be handled in safety work benches (laminar flow bench).

The assay reagents contain against microbial growth preservation substances, avoid contact with skin and/or mucous membranes.

Avoid contact with the TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine) substrate solution containing peroxide. If it comes into contact with skin, wash thoroughly with water. Avoid contact with any easily oxidized materials. Extreme temperature changes may cause spontaneous decay of the peroxide. Avoid the contact with the stop solution containing acid. By skin contact, wash thoroughly with water. All instrumentation employed to dispense the stop solution should be thoroughly cleaned after use.

4 REAGENTS

4.1 REAGENTS PROVIDED

1. **Divisible microplate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells, ready to use; coated with a monoclonal anti-canine prolactin antibody.
2. **Canine Prolactin Master Calibrator**, 1 vial, 80 ng, lyophilized; in serum/buffer matrix containing highly purified canine prolactin; **For reconstitution see "Reagent preparation"**.
3. **Canine Prolactin Calibrator/Sample Diluent**, 1 vial, 6 ml, ready to use; canine prolactin free
4. **Enzyme-Labeled anti canine Prolactin Antibody**, 1 vial, 22 ml, red, ready to use; containing horseradish peroxi-dase-labeled polyclonal anti canine prolactin antibody
5. **Canine Prolactin Sample Buffer**, 1 vial, 6 ml, yellow, ready to use;
6. **TMB-Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use; 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine in buffered peroxide solution
7. **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 M hydrochloric acid
8. **Wash Buffer Concentrate**, 1 vial, 50 ml, 10 x concentrated; see "Reagent preparation".

4.2 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm (optional reference filter in the range of 600 - 690 nm)
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 350 - 400 rpm
- Distilled or deionized water
- Graduated cylinders for 500 ml
- Plastic containers for storage of the wash solution
- Adjustable pipette for up to 1000 µl
- Dispenser or repeatable pipet for 25 µl, 50 µl and 200 µl.

4.3 REAGENT PREPARATION

Calibrators:

Reconstitute lyophilized Canine Prolactin Master Calibrator with **1 ml dest. water** 30 min. before use (end concentration of 80 ng/ml). Make a dilution serie with Calibrator/Sample Diluent to get calibrators with 80, 40, 20, 10, 5 and 2.5 ng/ml.

Wash Buffer:

Dilute with 450 ml dist. water to a final volume of 500 ml.

4.4 STORAGE CONDITIONS

When stored at 2 °C to 8 °C all reagents are stable until expiration date or 30 days after opening.

The Stop Solution is stable up to 2 months after opening or until the expiration date.

The Wash Buffer is stable for 3 months after dilution or until the expiration date.

Store Calibrators at -20 °C or below (in aliquots), it will be stable for 7 days after reconstitution or until expiration date.

Protect Divisible Microplate from moisture. Store together with desiccant and carefully sealed in the plastic bag.

Protect TMB-Substrate Solution from light.

5 SPECIMEN

For determination of canine prolactin serum is the preferred sample matrix. The procedure calls for 25 µl matrix per well.

Prolactin is one of the most sensitive stress hormones of the dog. Blood collection should therefore be as stress-free as possible.

The samples may be stored refrigerated at 2 - 8 °C for one week, or up to 2 months frozen at -20 °C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Samples expected to contain canine prolactin concentrations higher than the highest calibrator (80 ng/ml) should be diluted with the Canine Prolactin Calibrator/Sample Diluent before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 GENERAL REMARKS

Do not interchange components of different lots.

All components should be at room temperature (18 – 28 °C) before use.

All components of these test kits, supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent of foam formation.

Use a disposable-tip micropipette to dispense plasma samples. Pipet directly to the bottom of the wells. Change the tip between samples, to avoid carryover contamination.

6.2 ASSAY PROCEDURE

- Preparation of calibrators:
Label five tubes: F (40 ng/ml), E (20 ng/ml), D (10 ng/ml), C (5 ng/ml), and B (2.5 ng/ml). Pipet **0.1 ml** of the Calibrator/Sample Diluent into all tubes. Pipet 0.1 ml of the reconstituted Canine Prolactin Master Calibrator into tube F (40 ng/ml) and mix thoroughly. Transfer 0.1 ml from tube F (40 ng/ml) to tube E (20 ng/ml) and mix thoroughly. Repeat this process successively to complete the 2-fold dilution series. The reconstituted Canine Prolactin Calibrator will serve as the highest calibrator G (80 ng/ml). Use the Canine Prolactin Calibrator/Sample Diluent as the zero calibrator A (0 ng/ml).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P2	P..								
b	A	E	P2	P..								
c	B	F	P3									
d	B	F	P3									
e	C	G	P4									
f	C	G	P4									
g	D	P1	P5									
h	D	P1	P5									

- Pipet **25 µl** of each calibrator and patient sample into the wells prepared.
- Add **50 µl** of **Canine Prolactin Sample Buffer** to every well.
- Rotate for **2 hours** at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (350-400 rpm).
- Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl** buffered **wash solution**. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
- Add **200 µl** of **Enzyme-Labeled anti-canine Prolactin Antibody** to all wells.
- Shake again for **1 hour**.
- Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl** buffered **wash solution**. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
- Add **200 µl** of liquid **TMB/Substrate Solution** to all wells.
- Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
- Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
- Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600-690 nm is recommended.

The developed color is stable for at least 15 minutes. Read optical densities during this time.

6.3 CALCULATION OF RESULTS

For evaluation of canine prolactin a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density (linear scale) and concentration (logarithmic scale) is recommended.

Spline approximation with lin-log coordinates and log-log coordinates are also suitable.

6.4 EXAMPLE OF TYPICAL CALIBRATOR CURVE

The figure below shows typical results for canine prolactin test kits. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

	Replicate (OD)	Mean (OD)	Binding (%)	canine prolactin (ng/ml)
Calibrators				
A	0.059 ----- 0.055	0.057	-	0
B	0.148 ----- 0.148	0.148	4.4	2.5
C	0.244 ----- 0.299	0.272	8.1	5
D	0.495 ----- 0.559	0.527	15.7	10
E	0.917 ----- 0.953	0.935	27.8	20
F	1.996 ----- 2.074	2.035	60.6	40
G (Bmax)	3.207 ----- 3.507	3.357	100	80
Unknown Samples				
X 001	0.795 ----- 0.772	0.784	23.3	15.8
X 002	1.703 ----- 1.730	1.717	51.1	33.9
X 003	2.384 ----- 2.446	2.415	71.9	50.0

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In a reference range study canine serum samples were collected in the morning between 8 and 9 a.m. and in the evening between 5 and 6 p.m. Diurnal variations have not been observed. Analysis by the Demeditec Prolactin canine ELISA kit yielded the following results:

Group	Absolute Range (ng/ml)	n
Normal dogs	nd - 21	26
nd = non detectable		

Because of differences which may exist between laboratories with respect of population, laboratory technique and selection of reference groups, it is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of canine prolactin. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1 ANALYTICAL SENSITIVITY

The lower detection limit for canine prolactin was 0.4 ng/ml.

8.2 SPECIFICITY

The antibodies in the Demeditec Prolactin canine ELISA procedure are highly specific for canine prolactin. Detectable crossreactivities to other hormones that may be present in serum samples are not known.

8.3 REPRODUCIBILITY

Statistics for Coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 12 pairs of wells in a single run for Intra-Assay precision and the Inter-Assay precision was calculated from the results of 10 different runs of three samples:

Canine prolactin		
Intra-Assay		
Sample No	Mean \bar{x} (pg/ml)	CV (%)
1	6.8	7.1
2	29	6.0
3	50	7.4

Inter-Assay		
Sample No	Mean \bar{x} (pg/ml)	CV (%)
1	8.8	9.2
2	15	6.9
3	32	5.5

8.4 RECOVERY

Three spiking solutions were prepared using the Sample Diluent, to represent the 600, 800 and 1000 ng/ml, respectively. A 50 µl aliquot of each solution (A, B, C) was spiked into 950 µl aliquots of two different patient serum samples, for a spiking ratio of 1 to 20, leaving the serum matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then assayed by the Demeditec Prolactin canine ELISA procedure.

Sample	Diluted Solution	measured Concentration [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
1	-	8.8	-	-
	A	35.3	38.4	92
	B	48.3	48.4	100
	C	56.2	58.4	96
2	-	6.1	-	-
	A	33.7	35.8	94
	B	49.7	45.8	109
	C	53.1	55.8	95

8.5 LINEARITY

In dilution experiments sera with high antibody concentrations were diluted with sample diluent and assayed in the Demeditec Prolactin canine ELISA kit. The assay showed linearity over the full measuring range.

Sample	Dilution Factor	measured Concentration [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
1	8 in 8	54.9	-	-
	4 in 8	24.4	27.5	89
	2 in 8	12.8	13.7	93
	1 in 8	6.6	6.9	96
2	8 in 8	54.2	-	-
	4 in 8	27.8	27.1	103
	2 in 8	15.4	13.6	113
	1 in 8	7	6.8	103

9 LIMITATIONS OF PROCEDURE

The Demeditec Prolactin canine ELISA has no "high-dose hook" effect, even with samples containing more than 300 ng/ml of canine prolactin. However, this effect is characteristic of immunometric assays. Samples expected to contain canine prolactin concentrations greater than the highest calibrator (80 ng/ml) should be diluted with the Canine Prolactin Calibrator/Sample Diluent.

10 REFERENCES

- Grünau, B., Nolte, I., Hoppen, H.-O.
Untersuchung zur Behandlung der Scheinrächtigkeit der Hündin mit den Prolaktinhemmern Metergolin und Bromocriptin.
Tierärztl Prax 1996; 24: 149-155.
- Harvey, M.J.A., Cauvin, A., Dale, M., Lindley, S., Ballabio, R.
Effect and mechanisms of the anti-prolactin drug cabergoline on pseudopregnancy in the bitch.
Small Animal Practice 38 (1997): 336-339.
- Cortese, L., Oliva, G., Versteegen, J., Ciaramella, P., Persechino, A.
Hyperprolactinaemia and galactorrhoea associated with primary hypothyroidism in a bitch.
Small Animal Practice 38 (1997): 572-575.
- Hoppen, H.O., Grünau, B., Hayer, M., Günzel-Apel, A.R.
Prolactin in canine reproduction: normal values under various conditions.
Proceedings "Advances in Veterinary Endocrinology" Berlin, 1993 October 6; 18 - 19.

11 SHORT INSTRUCTION

(all sample sizes given in μ l)

Steps	MP Well	ng/ml								Sample
		0	1	2	3	4	5	6		
		0	2.5	5	10	20	40	80		
		Solution								
Pipet	Calibrator	25	25	25	25	25	25	25	-	
Pipet	Sample	-	-	-	-	-	-	-	25	
Pipet	Canine Prolactin Sample Buffer	50	50	50	50	50	50	50	50	
Incubate for 2 hours at RT on a shaker										
Decant Wash 4x with 300 μ l of buffered wash solution										
Pipet	Enzyme-labeled Canine Prolactin Ab	200	200	200	200	200	200	200	200	
Incubate for 1 hour at RT on a shaker										
Decant Wash 4x with 300 μ l of buffered wash solution										
Pipet	Substrate Solution	200	200	200	200	200	200	200	200	
Incubate for 30 min at RT in the dark										
Pipet	Stop Solution	50	50	50	50	50	50	50	50	
Read at $\lambda = 450$ nm										

1 EINLEITUNG

1.1 VERWENDUNG

Der Demeditec Prolactin canine ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaktin im Hundeserum

1.2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Hunde-Prolaktin (canine PRL, cPRL) ist ein einkettiges Polypeptidhormon und wird vom Hypophysenvorderlappen gebildet. Sein Molekulargewicht beträgt etwa 22.000. Prolaktin unterschiedlicher Spezies zeigt signifikante Variationen in der Aminosäuren-Sequenz. So unterscheiden sich Hunde- und humanes Prolaktin in ca. 60 Prozent der Aminosäurenreste.

Die Sekretion des Prolaktin aus dem Hypophysenvorderlappen wird vom hypothalamischen Prolaktin-inhibierenden Faktor (PIF) gehemmt. Obwohl man lange dachte, dass Dopamin dieses PIF Molekül sei, scheint es heute wohl eher ein spezielles Peptid mit Prolaktin-inhibierender Wirkung zu sein. Die Freisetzung von Prolaktin wird von verschiedenen Peptiden, wie Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) und das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) stimuliert. Des Weiteren scheinen Östrogene, Progesterone und auch neurologische Medikamente eine Rolle zu spielen. Die Milchproduktion sowie der Saugreiz haben einen sofort messbaren Anstieg der Prolaktin-Serumkonzentration zur Folge.

Prolaktin ist physiologisch vor allem für die Einleitung und Erhaltung der Laktation nach der Trächtigkeit verantwortlich. Im Laufe der Trächtigkeit steigen die Prolaktinkonzentrationen beim Hund nur langsam an; während der Säugezeit dagegen sind signifikant höhere Konzentrationen nachweisbar. Andere physiologische Wirkungen von Prolaktin betreffen den Wasser- und Elektrolyt-Haushalt, den Stoffwechsel und die Keimdrüsenfunktion. Prolaktin ist ein wichtiges Stress-Hormon und scheint eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der langen Zyklusintervalle der Hündin zu spielen.

Bei Hunden mit Hypophysen-abhängigem Hyperadrenocorticoismus werden im Blut höhere Prolaktinkonzentrationen gemessen als bei gesunden Tieren. Die Prolaktin-Bestimmung kann zur Therapiekontrolle bei Hyperprolaktinämie eingesetzt werden. Auch bei Scheinträchtigkeiten werden erhöhte Prolaktinwerte gefunden. Im Zuge der Therapie mit Alkaloiden wie Bromocriptin fallen die Prolaktinwerte ab, der Milchfluss wird eingeschränkt und das mütterliche Verhalten abgeschwächt. Das Sekretionsvermögen der Hypophyse kann im Zuge eines TRH-Stimulationstests überprüft werden.

2 METHODIK UND TESTPRINZIP

Der vorliegende Test ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplatten-Format mit einer Flüssigphasen-Inkubation zur quantitativen Bestimmung von Hunde-Prolaktin im Serum. Die Festphase ist mit monoklonalen Antikörpern gegen Hunde-Prolaktin beschichtet (erster Antikörper).

Standards und Patientenproben werden in die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und reagieren während einer zweistündigen Inkubation mit dem ersten Antikörper. Nach Abschluss der Reaktion werden überschüssige Bestandteile der Proben und Standards durch Waschen entfernt.

Nach Zugabe von enzymmarkierten polyklonalen Antikörpern gegen Hunde-Prolaktin kann sich in einer anschließenden einstündigen Inkubation ein Sandwich-Komplex aus dem ersten Antikörper, Hunde-Prolaktin und dem Enzym-markierten Antikörper bilden. Danach wird überschüssiger Enzym-markierter Antikörper durch Waschen entfernt.

Zugegebenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB), wird anschließend vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe von Salzsäure beendet (Farbumschlag blau → gelb).

Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration des Hunde-Prolaktin in den Standards oder den Proben direkt proportional. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilter-Wellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieser Testpackung dürfen ausschließlich zur Veterinär-Forschung verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls zur Durchführung des Tests ist unbedingt erforderlich.

Die Lagerung der Kitreagenzien sollte gekühlt bei 2 - 8°C in den Originalflaschen erfolgen. Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen.

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18 - 28 °C) bringen und gut durchmischen.

Für den Umgang mit Kitreagenzien, Kontroll- und Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung für den Gesundheitsdienst beim Umgang mit potentiell infektiösem Material einzuhalten. Insbesondere sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- nicht essen, trinken oder rauchen
- nicht mit dem Mund pipettieren, Sicherheitspipetten verwenden
- Handschuhe tragen und Kontakt mit Reagenzien, Kontrollproben und Untersuchungsmaterial vermeiden

In diesem Testbesteck enthaltene Reagenzien humanen Ursprungs erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen und HIV (Human Immuno-deficiency Virus) als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen oder tierischen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierbare Krankheitserreger enthalten sind.

Untersuchungsmaterial von Patienten (z.B. Plasma- oder Serumproben), wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potentiell infektiös einzustufen. Unter den gleichen Sicherheitsvorkehrungen sind ebenso Kitreagenzien und Kontrollproben zu handhaben. Proben von Risikopatienten sollten stets besonders gekennzeichnet werden und ggf. in Sicherheitswerkbänken (z. B. Laminar Flow-Arbeitsplatz) bearbeitet werden.

Die Reagenzien dieses Testbestecks enthalten zum Schutz gegen mikrobakterielles Wachstum Konservierungsmittel; daher ist die Berührung mit der Haut und /oder Schleimhäuten zu vermeiden. Ein Kontakt mit der Peroxid enthaltenden TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) Substratlösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Vermeiden Sie den Kontakt mit leicht oxidierbaren Materialien. Extreme Temperaturschwankungen können zum spontanen Zerfall des Peroxids führen.

Ein Kontakt mit der säurehaltigen Stopp-Lösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Alle Geräte, die zur Verteilung der Stopp-Lösung verwendet wurden, sofort nach Gebrauch gründlich reinigen.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 MITGELIEFERTE KOMPONENTEN

1. **Teilbare Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (teilbar) Streifen mit 96 Vertiefungen, gebrauchsfertig; beschichtet mit monoklonalem anti-Hunde-Prolaktin-Antikörper
2. **Hunde-Prolaktin Standard**, 1 Fl., 80 ng, lyophilisiert; Enthält hoch-aufgereinigtes Hunde-Prolaktin in Serum/Puffer-Matrix **siehe „Vorbereitung der Reagenzien“**
3. **Standard/Probenverdünnungspuffer**, 1 Fl., 6 ml, gebrauchsfertig; Hunde-Prolaktin frei
4. **Enzym-markierter Hunde-Prolaktin Antikörper**, 1 Fl., 22 ml, rot, gebrauchsfertig; Enthält polyklonale murine Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase
5. **Hunde-Prolaktin Probenpuffer**, 1 Fl., 6 ml, gelb, gebrauchsfertig;
6. **TMB-Substrat-Lösung**, 1 Fl., 22 ml, gebrauchsfertig; 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin in gepufferter Peroxid-Lösung
7. **Stopp-Lösung**, 1 Fl., 7 ml, gebrauchsfertig; Enthält 2 M Salzsäure
8. **Waschlösung**, 1 Fl., 50 ml, 10x konzentriert **siehe „Vorbereitung der Reagenzien“**

4.2 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Standards:

Den lyophilisierten Hunde-Prolaktin Standard mit **1 ml dest. Wasser** 30 min. vor Gebrauch auflösen (Endkonzentration: 80 ng/ml); Verdünnungsreihe ansetzen, um Standards mit 80, 40, 20, 10, 5 und 2,5 ng/ml zu erhalten.

Waschlösung:

Mit 450 ml dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

4.3 LAGERUNG DER KOMPONENTEN

Bei einer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum oder 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

Die Stopp-Lösung ist bis zu 2 Monate nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Waschlösung ist bis zu 3 Monate nach der Verdünnung oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Lagern Sie die Standards aliquotiert bei -20 °C, nach dem Auflösen sind diese 7 Tage oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Schützen Sie die Mikrotiterplatte vor Feuchtigkeit. Zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel aufbewahren.

Schützen Sie die TMB-Substrat-Lösung vor Licht.

4.4 ERFORDERLICHE HILFSMITTEL

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 600 - 690 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (350 – 400 Upm)
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 500 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- variable Mikropipette für bis zu 1.000 µl
- Dispenser bzw. Mehrkanalpipette für 25 µl, 50 µl und 200 µl.

5 PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG

Die Bestimmung des Hunde-Prolaktin wird im Serum durchgeführt. Es wird 25 µl pro Einzel-Bestimmung benötigt. Da die Prolaktinausschüttung beim Hund stark stressabhängig ist, sollte die Blutentnahme so stressfrei wie möglich durchgeführt werden.

Die Proben können für eine Woche gekühlt bei 2-8°C oder bis zu 2 Monaten gefroren bei -20 °C gelagert werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und tiefgefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben, deren Konzentration an Hunde-Prolaktin höher als der höchste Standardwert (80 ng/ml) liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung im Hunde-Prolaktin Standard/Probenverdünnungspuffer verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 ALLGEMEINE ANMERKUNGEN

Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.

Alle Komponenten auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen.

Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.

Zum Vorlegen der Plasmaproben sollten Pipetten mit Einmalspitzen verwendet werden. Direkt auf den Boden der Vertiefungen pipettieren. Für jede Probe die Spitzen wechseln, um Verschleppungen zu vermeiden.

6.2 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Vorbereitung der Standards:

Fünf Röhrchen beschriften: F (40 ng/ml), E (20 ng/ml), D (10 ng/ml), C (5 ng/ml) und B (2,5 ng/ml). 0,1 ml des Standard-/Probenverdünnungspuffers in alle Röhrchen pipettieren. 0,1 ml des rekonstituierten Hunde-Prolaktin Standards in Röhrchen F (40 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. 0,1 ml aus dem Röhrchen F (40 ng/ml) in Röhrchen E (20 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen. Der rekonstituierte Hunde-Prolaktin Standard dient als höchster Standard G (80 ng/ml). Der Standard-/Probenpuffer dient als Null-Standard A (0 ng/ml).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P2	P..								
b	A	E	P2	P..								
c	B	F	P3									
d	B	F	P3									
e	C	G	P4									
f	C	G	P4									
g	D	P1	P5									
h	D	P1	P5									

- Zur Bestimmung von Hunde-Prolaktin jeweils **25 µl** Standards und Proben entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
- 50 µl Hunde-Prolaktin Probenpuffer** in jede Vertiefung pipettieren.
- Platte **2 Stunden** bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) auf einem Plattenschüttler (350 - 400 Upm) inkubieren.
- Platte dekantieren und **4-mal** jeweils mit **300 µl Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
- 200 µl Enzym-markierten Hunde-Prolaktin Antikörper** in jede Vertiefung pipettieren.
- Platte **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) auf dem Schüttler inkubieren.
- Platte dekantieren und **4-mal** jeweils mit **300 µl Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
- 200 µl TMB-Substrat-Lösung** in jede Vertiefung pipettieren.
- 30 Minuten** bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) im Dunkeln inkubieren.
- 50 µl Stopp-Lösung** in jede Vertiefung pipettieren.
- Optische Dichte bei **450 nm** messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

Die Färbung der Lösung ist mindestens 15 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

6.3 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Hunde-Prolaktins ist eine 4-Parameter Logistik mit lin-log-Koordinaten für die optischen Dichte (lineare Achse) und für die Konzentration (logarithmische Achse) die Kurvenanpassung der Wahl.

Eine geglättete Spline-Funktion mit lin-log- oder log-log-Koordinaten ist ebenso möglich.

6.4 AUSWERTUNGSBEISPIEL

Die folgende Tabelle zeigt typische Messwerte am Beispiel des Demeditec Prolactin canine ELISA Tests. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen.

	Replik OD	Mittelwert OD	Bindung (%)	Prolaktin (ng/ml)
Standards				
A (NSB)	0,059	0,057	-	0
	----- 0,055			
B	0,148	0,148	4,4	2,5
	----- 0,148			
C	0,244	0,272	8,1	5
	----- 0,299			
D	0,495	0,527	15,7	10
	----- 0,559			
E	0,917	0,935	27,8	20
	----- 0,953			
F	1,996	2,035	60,6	40
	----- 2,074			
G (MB)	3,207	3,357	100	80
	----- 3,507			
Unbekannte Proben				
X 001	0,795	0,784	23,3	15,8
	----- 0,772			
X 002	1,703	1,717	51,1	33,9
	----- 1,730			
X 003	2,384	2,415	71,9	50,0
	----- 2,446			

7 NORMALWERTE

Im Rahmen einer Studie wurden mit dem Demeditec Prolactin canine ELISA die folgenden Werte in Serumproben, die zwischen 8 und 9 Uhr morgens bzw. 5 und 6 Uhr abends entnommen wurden, bestimmt:

Gruppe	Wertebereich (ng/ml)	n
Normale Hunde	nn - 21	26
nn = nicht nachweisbar		

Da Faktoren wie Population, Labortechnik und Auswahl der Referenzgruppen diese Werte beeinflussen können, wird empfohlen, dass jeder Anwender seinen eigenen Normalbereich bezüglich seines Patientenkollektivs festlegt. Die angegebenen Normalwerte dienen zur Orientierung.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 SENSITIVITÄT

Die untere Nachweisgrenze des Demeditec Prolactin canine ELISA wurde bei 0,4 ng/ml ermittelt.

8.2 SPEZIFITÄT

Die in diesem Testkit verwendeten Antikörper sind hochspezifisch für Hunde-Prolaktin mit extrem niedriger Kreuzreaktivität zu anderen eventuell im Serum vorliegenden Hormonen.

8.3 REPRODUZIERBARKEIT

Nachfolgende Variationskoeffizienten (VK) wurden für die Intra-Assay-Varianz auf der Basis einer 12 fachen Bestimmung von drei Proben ermittelt; für die Inter-Assay-Varianz wurden die Ergebnisse aus 10 Assays für drei Proben ermittelt.

Intra-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert \bar{x} (pg/ml)	CV (%)
1	6,8	7,1
2	29	6,0
3	50	7,4

Inter-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert \bar{x} (pg/ml)	CV (%)
1	8,8	9,2
2	15	6,9
3	32	5,5

8.4 WIEDERFINDUNG

Dem Standard/Proben-Verdünnungspuffer wurden drei unterschiedliche Mengen an Hunde-Prolaktin zugegeben (600, 800 und 1.000 ng/ml). 50 µl jeder Lösung wurden zu je 950 µl zweier verschiedener Serumproben von Patienten hinzugefügt (Verdünnungsverhältnis von 1:20), um die Serum-Matrix der Proben möglichst intakt zu lassen. Alle Proben wurden dann mit dem Demeditec Prolactin canine ELISA Test gemessen.

Proben Nr.	Lösung	Gemessene Konzentration	Erwartete Konzentration	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	-	8,8	-	-
	A	35,3	38,4	92
	B	48,3	48,4	100
	C	56,2	58,4	96
2	-	6,1	-	-
	A	33,7	35,8	94
	B	49,7	45,8	109
	C	53,1	55,8	95

8.5 LINEARITÄT

Serumproben von zwei Probanden wurden unverdünnt und verdünnt mit Standard/Proben-Verdünnungspuffer getestet. Der Assay ist über den gesamten Messbereich linear.

Sample Nr.	Verdünnung	gemessene Konzentration [ng/ml]	erwartete Konzentration [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1	8 in 8	54,9	-	-
	4 in 8	24,4	27,5	89
	2 in 8	12,8	13,7	93
	1 in 8	6,6	6,9	96
2	8 in 8	54,2	-	-
	4 in 8	27,8	27,1	103
	2 in 8	15,4	13,6	113
	1 in 8	7,0	6,8	103

9 LIMITATIONEN

Hundeseren mit Konzentrationen bis zu 300 ng/ml Prolaktin wurden im Demeditec Prolactin canine ELISA ohne Hinweis auf einen bestehenden "High-Dose Hook"-Effekt getestet.

Trotzdem ist zu berücksichtigen, dass bei allen immunometrischen Assays Proben mit extrem hohem Antigengehalt zu Ergebnissen innerhalb des Messbereichs der Methode führen können.

10 LITERATUR











1. Grünau, B., Nolte, I., Hoppen, H.-O.
Untersuchung zur Behandlung der Scheinträchtigkeit der Hündin mit den Prolaktinhemmern Metergolin und Bromocriptin.
Tierärztl. Prax. 1996; 24: 149-155.
2. Harvey, M.J.A., Cauvin, A., Dale, M., Lindley, S., Ballabio, R.
Effect and mechanisms of the anti-prolactin drug cabergoline on pseudopregnancy in the bitch.
Small Animal Practice 38 (1997): 336-339.
3. Cortese, L., Oliva, G., Verstegen, J., Ciaramella, P., Persechino, A.
Hyperprolactinaemia and galactorrhoea associated with primary hypothyroidism in a bitch.
Small Animal Practice 38 (1997): 572-575.
4. Hoppen, H.O., Grünau, B., Hayer, M., Günzel-Apel, A.R.
Prolactin in canine reproduction: normal values under various conditions.
Proceedings "Advances in Veterinary Endocrinology" Berlin, 1993 October 6; 18 - 19.

11 KURZANLEITUNG











(alle Volumenangaben in µl)

MT-Platten-Well	ng/ml	0	1	2	3	4	5	6	Probe
		0	2,5	5	10	20	40	80	
Schritte	Lösung								
Pipettieren	Standard	25	25	25	25	25	25	25	-
Pipettieren	Probe	-	-	-	-	-	-	-	25
Pipettieren	Probenpuffer	50	50	50	50	50	50	50	50
2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubieren									
Dekantieren 4x mit 300 µl Waschlösung waschen									
Pipettieren	Enzym-markierter Hunde-Prolaktin Antikörper	200	200	200	200	200	200	200	200
1 Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubieren									
Dekantieren 4x mit 300 µl Waschlösung waschen									
Pipettieren	Substrat-Lösung	200	200	200	200	200	200	200	200
30 min bei RT im Dunkeln inkubieren									
Pipettieren	Stopp-Lösung	50	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei λ = 450 nm									

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	No de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	For veterinary research use only	Nur für Veterinärforschungszwecke			
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Pocillos de la Microplaca	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de paro	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Standard 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Calibrador	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon		Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué		Diluyente del tracciante

Demeditec Prolactin canine ELISA DEV9944

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
				
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiter-platta	Πηγαδάκια Μικροτιτλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				