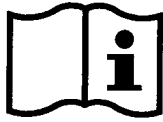


# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://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 ..... 8  
9 LIMITATIONS OF PROCEDURE ..... 9  
10 REFERENCES ..... 10  
11 SHORT INSTRUCTION ..... 10

**INHALTSVERZEICHNIS**

1 EINLEITUNG ..... 11  
2 METHODIK UND TESTPRINZIP ..... 11  
3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN ..... 12  
4 KITBESTANDTEILE ..... 13  
5 PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG ..... 14  
6 TESTDURCHFÜHRUNG ..... 14  
7 NORMALWERTE ..... 16  
8 TESTCHARAKTERISTIKA ..... 16  
9 LIMITATIONEN ..... 17  
10 LITERATUR ..... 18  
11 KURZANLEITUNG ..... 18  
  
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS ..... 20

## 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

1. This kit is strictly intended for veterinary use only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

## 4 REAGENTS

### 4.1 REAGENTS PROVIDED

1. **SORB MT** **Microtiter Plate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells, ready to use; coated with a monoclonal anti-canine prolactin antibody.
2. **CAL** **Master Calibrator**, 1 vial, 80 ng, lyophilized; in serum/buffer matrix containing highly purified canine prolactin; **For reconstitution see "Reagent preparation"**.
3. **SAM DIL** **Calibrator/Sample Diluent**, 1 vial, 6 ml, ready to use; canine prolactin free
4. **ENZ CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 22 ml, red, ready to use; containing horseradish peroxi-dase-labeled polyclonal anti canine prolactin antibody
5. **SAM BUF** **Sample Buffer**, 1 vial, 6 ml, yellow, ready to use;
6. **SUB TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use; 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine in buffered peroxide solution
7. **STOP SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 M hydrochloric acid
8. **WASH SOLN 10x** **Wash Solution**, 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 more than 600 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 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 Solution:

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

*The diluted Wash Solution is stable for 12 weeks at room temperature.*

### 4.4 STORAGE CONDITIONS

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly. Store Calibrators refrigerated, they will be stable at 2°C to 8°C for 7 days after reconstitution. For longer storage aliquot and freeze at -20°C.

Protect 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 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 (21 – 26 °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.
- For internal quality control we suggest to use **Canine Control coded DEV99CC**. For more information please contact DEMEDITEC.

### 6.2 ASSAY PROCEDURE

#### 1. 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 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 Calibrator will serve as the highest calibrator G (80 ng/ml). Use the 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 Sample Buffer to every well.
- Rotate for 2 hours at room temperature (21 - 26 °C) on a plate mixer (600 – 900 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 Conjugate to all wells.
- Shake again for 1 hour at room temperature (21 - 26 °C) on a plate mixer (600 – 900 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 liquid 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:

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 Calibrator/Sample Diluent.

**10 REFERENCES**

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 SHORT INSTRUCTION**

(all sample sizes given in µl)

MP Well	ng/ml	0	1	2	3	4	5	6	Sample
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	
Steps	Solution	0	2.5	5	10	20	40	80	
Pipet	Calibrator	25	25	25	25	25	25	25	-
Pipet	Sample	-	-	-	-	-	-	-	25
Pipet	Sample Buffer	50	50	50	50	50	50	50	50
Incubate for 2 hours at RT on a shaker									
Decant Wash 4x with 300 µl of buffered wash solution									
Pipet	Enzyme Conjugate	200	200	200	200	200	200	200	200
Incubate for 1 hour at RT on a shaker									
Decant Wash 4x with 300 µl 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 λ = 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

1. Dieser Kit darf ausschließlich zur Veterinär-Forschung verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2 – 8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (21-26°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stopp-Lösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 KITBESTANDTEILE

### 4.1 MITGELIEFERTE KOMPONENTEN

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (teilbar) Streifen mit 96 Vertiefungen, gebrauchsfertig; beschichtet mit monoklonalem anti-Hunde-Prolaktin-Antikörper
2. **CAL Master Standard**, 1 Fl., 80 ng, lyophilisiert; Enthält hoch-aufgereinigtes Hunde-Prolaktin in Serum/Puffer-Matrix **siehe „Vorbereitung der Reagenzien“**
3. **SAM DIL Standard/Probenverdünnungspuffer**, 1 Fl., 6 ml, gebrauchsfertig; Hunde-Prolaktin frei
4. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fl., 22 ml, rot, gebrauchsfertig; Enthält polyklonale murine Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase
5. **SAM BUF Probenpuffer**, 1 Fl., 6 ml, gelb, gebrauchsfertig;
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fl., 22 ml, gebrauchsfertig; 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin in gepufferter Peroxid-Lösung
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fl., 7 ml, gebrauchsfertig; Enthält 2 M Salzsäure
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung**, 1 Fl., 50 ml, 10x konzentriert **siehe „Vorbereitung der Reagenzien“**

### 4.2 ERFORDERLICHE HILFSMITTEL

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 600 - 690 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit mehr als 600 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.

### 4.3 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

#### Standards:

Den lyophilisierten Master 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.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 12 Wochen stabil.*

### 4.4 LAGERUNG DER KOMPONENTEN

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung bei 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Lagern Sie die Standards gekühlt, nach dem Auflösen sind diese bei 2°C bis 8°C bis zu 7 Tage haltbar; für längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.

Schützen Sie die TMB-Substrat-Lösung vor Licht.

## 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 vorverdünnt 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.
- Zur internen Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung der **Canine Kontrolle mit der Kat.-Nr. DEV99CC**. Für weitere Informationen kontaktieren Sie DEMEDITEC.

### 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 Master 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 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									

2. Zur Bestimmung von Hunde-Prolaktin jeweils 25 µl Standards und Proben entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
3. 50 µl Probenpuffer in jede Vertiefung pipettieren.
4. Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur (21 - 26 °C) auf einem Plattenschüttler (600-900 Upm) inkubieren.
5. Platte dekantieren und 4-mal jeweils mit 300 µl Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
6. 200 µl Enzymkonjugat in jede Vertiefung pipettieren.
7. Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur (21 - 26 °C) auf dem Schüttler (600-900 Upm) inkubieren.
8. Platte dekantieren und 4-mal jeweils mit 300 µl Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
9. 200 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.
10. 30 Minuten bei Raumtemperatur (21 - 26 °C) im Dunkeln inkubieren.
11. 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren.
12. 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.

	Replikat OD	Mittelwert OD	Bindung (%)	Prolactin (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/Probenverdünnungspuffer 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	erwartete Konzentration	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
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 Mergolin 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
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	
Schritte	Lösung	0	2,5	5	10	20	40	80	
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	Enzymkonjugat	200	200	200	200	200	200	200	200
1 Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubieren									
Dekantieren 4x mit 300 µl Waschlösung waschen									
Pipettieren	Substratlösung	200	200	200	200	200	200	200	200
30 min bei RT im Dunkeln inkubieren									
Pipettieren	Stopplösung	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	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	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