

Product information

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



User's Manual

Prolactin rat ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of prolactin in rat serum.

RUO

REF

DEV9966



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 11

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....12
2. METHODIK UND TESTPRINZIP12
3. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN.....13
4. MITGELIEFERTE KOMPONENTEN14
5. PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG15
6. TESTDURCHFÜHRUNG15
7. NORMALWERTE.....17
8. TESTCHARAKTERISTIKA.....17
9. LIMITATIONEN.....19
10. LITERATUR20
11. KURZANLEITUNG.....21

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS.....24

1. INTRODUCTION

1.1. INTENDED USE

The Demeditec Prolactin rat ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative measurement of prolactin in rat serum.

1.2. SUMMARY AND EXPLANATION

Rat prolactin (rPRL) is a single-chain polypeptide hormone of the rat anterior pituitary with a molecule mass of approximately 23,000. Prolactin from different species exhibits significant variations in the amino acid sequence. Rat prolactin differs from human prolactin at about 50 percent of all residues. The secretion of rPRL 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 vasoactive intestinal peptide (VIP). There is also evidence that rat posterior pituitary lobe contains a special prolactin releasing hormone.

The most important role of prolactin is stimulation of mammary gland growth and lactation. During pregnancy, blood prolactin levels climb, but the increases can differ enormously between rats. High prolactin levels are observed during lactation. Prolactin has a wide variety of other physiological actions, for example on the ovary. In the rat, prolactin has a luteotrophic effect which is not seen in many other species. Furthermore, prolactin is a stress hormone.

In rats, as in humans, prolactin exhibits a sleep-related diurnal variation. Peak values are seen in the late afternoon and nadir values in the morning.

Because of the variety of its actions, prolactin is one of the preferred hormones to monitor when testing the influence of new therapeutic agents and drugs on the endocrine system in the rat.

2. PRINCIPLE

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

Calibrators and samples are pipetted into the antibody coated microplate. During a 2 hours incubation endogenous rat 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 another 1 hour incubation, a sandwich complex consisting of the two antibodies and the rat 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 rat prolactin present in the sample. The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm. Bichromatic measurement with a 600 - 690 nm reference filter is recommended.

3. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is strictly intended for research 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
Removable wells coated with a monoclonal anti-rat prolactin antibody.
2. **CAL Master Calibrator**, 1 vial, 80 ng, lyophilized,
in serum/buffer matrix containing highly purified rat prolactin,
For reconstitution see "Reagent preparation".
3. **SAM DIL Calibrator/Sample Diluent**, 1 vial, 6 ml, ready to use
rat prolactin free
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 22 ml, red, ready to use
containing horseradish peroxidase-labeled polyclonal anti rat prolactin antibody in a buffered
solution with preservative
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
containing 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 cylinder 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 series with Calibrator/Sample Diluent to get calibrators with 80, 40, 20, 10 and 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 rat 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 rat. 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 rat prolactin concentrations higher than the highest calibrator (80 ng/ml) should be diluted with 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 this test kit, 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 serum 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 **Rat Control Set coded DEV99RC. For more information please contact DEMEDITEC.**

6.2. ASSAY PROCEDURE

1. Preparation of calibrators:

Label four tubes: E (40 ng/ml), D (20 ng/ml), C (10 ng/ml) and B (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 E (40 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 F (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	P3	P..								
b	A	E	P3	P..								
c	B	F	P4									
d	B	F	P4									
e	C	P1	P5									
f	C	P1	P5									
g	D	P2	P6									
h	D	P2	P6									

2. Pipet 25 µl of each calibrator, control and sample into the wells prepared.
3. Add 50 µl of Sample Buffer to every well.
4. Rotate for 2 hours at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (600 - 900 rpm).
5. 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.
6. Add 200 µl of Enzyme Conjugate to all wells.
7. Shake again for 1 hour (600 – 900 rpm).
8. 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.
9. Add 200 µl of liquid Substrate Solution to all wells.
10. Incubate without shaking for 30 minutes in the dark.
11. Add 50 µl of Stop Solution to each well and mix carefully.
12. 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 30 minutes. Read optical densities during this time.

6.3. CALCULATION OF RESULTS

For evaluation of rat 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.

6.3.1. EXAMPLE OF TYPICAL CALIBRATOR CURVE

The figure below shows typical results for Demeditec Prolactin rat ELISA 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 (%)	Rat Prolactin (ng/mL)
Calibrators				
A	0.079	0.073	-	0
	----- 0.067			
B	0.189	0.179	6.9	5
	----- 0.169			
C	0.328	0.342	12.7	10
	----- 0.357			
D	0.766	0.796	29.7	20
	----- 0.827			
E	1.591	1.635	61.0	40
	----- 1.679			
F	2.588	2.677	100	80
	----- 2.765			
Unknown Samples				
X 001	0.318	0.324	12,1	9.8
	----- 0.329			
X 002	0.577	0.590	22,0	16.4
	----- 0.603			
X 003	1,733	1,716	64,1	47.3
	----- 1,698			

7. EXPECTED NORMAL VALUES

In a reference range study rat 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 rat ELISA kit yielded the following results:

Group	Absolute Range (ng/ml)	n
Normal female rats	nd - 17.9	15
Normal male rats	nd- - 23.4	10
nd = nondetectable		

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 rat prolactin. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

8. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1. ANALYTICAL SENSITIVITY

The lower detection limit for rat prolactin is approximately 0.6 ng/ml.

8.2. SPECIFICITY

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

The following substances were tested:

	added quantity (ng/ml)	measured concentration (ng/ml)	cross-reactivity (%)
Rat TSH	5,000	1.5	0.03
Rat FSH	10,000	5.1	0.5
Rat LH	5,000	nd	-
Rat GH	4,000	nd	-

8.3. REPRODUCIBILITY

Statistics for Coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 20 pairs of wells in a single run for Intra-Assay precision and the Inter-Assay precision was calculated from the results of 14 different runs of three samples:

Intra - Assay			
Serum No	Mean \bar{x} (ng/ml)	SD $\pm s$ (ng/ml)	CK (%)
1	6.6	0.20	3.0
2	19.6	0.77	3.9
3	33.0	1.80	5.5

Inter - Assay			
Serum No	Mean \bar{x} (ng/ml)	SD $\pm s$ (ng/ml)	CK (%)
1	6.5	0.28	4.3
2	20.5	0.71	3.5
3	33.4	1.48	4.4

8.4. RECOVERY

Three spiking solutions were prepared using the Sample Diluent, to represent the 600, 800 and 1,000 ng/ml, respectively. A 50 µl aliquot of each solution (A, B, C) was spiked into 950 µl aliquots of two different rat 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 rat ELISA procedure.

Demeditec Prolactin rat ELISA

Sample	Diluted Solution	measured Concentration	expected Concentration	Recovery
		[ng/ml]	[ng/ml]	[%]
1	-	26.1	-	-
	A	54.7	56.1	97
	B	66.6	66.1	100
	C	79.9	76.1	105
2	-	24.2	-	-
	A	52.6	54.2	103
	B	67.5	64.2	95
	C	81.1	74.2	91

8.5. LINEARITY

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

Demeditec Prolactin rat ELISA

Sample	Dilution Factor	measured Concentration	expected Concentration	Recovery
		[ng/ml]	[ng/ml]	[%]
1	8 in 8	20.9	-	-
	4 in 8	10.6	10.5	101
	2 in 8	5.9	5.2	113
	1 in 8	3.0	2.6	115
2	8 in 8	34.7	-	-
	4 in 8	16.7	17.4	96
	2 in 8	9.0	8.7	103
	1 in 8	4.5	4.3	105

9. LIMITATIONS OF PROCEDURE

Effect of Anticoagulants

To determine whether anticoagulants interfere with the assay, blood was collected from 30 rats into plain and EDTA vacutainer tubes. All samples were assayed by the Demeditec Prolactin rat ELISA procedure, with the following results.

$$(\text{EDTA}) = 1.05 (\text{Serum}) - 9.3 \text{ ng/ml} \quad r = 0.978$$

Means: 3.68 ng/ml (Serum)
 3.78 ng/ml (EDTA)

A limited study with citrated and heparinized plasma show comparable results to EDTA plasma.

"High-Dose Hook"-Effect

Rat sera containing up to 300 ng/ml Prolactin were measured with the Demeditec Prolactin rat ELISA assay. A High-Dose Hook effect could not be observed.

10. REFERENCES

1. Leung, F. C., Russel, S. M.; Nicoll, C. S.
Relationship between bioassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat serum.
Endocrinology 1978; 103: 1619 - 28.
2. Martinat, N., Hall, E., Ravault, J. P., Dubois, M. P.
Purification of rat prolactin: development of an homologous radioimmunological assay and comparison with the NIAMDD system.
Ann Biol Anim Bioch Biophys 1979; 19: 1771 - 48.
3. Beach, J. E., Miles, D. J., Lukes, Y. G., Vigersky, R. A.
Microplate solid-phase radioimmunoassay for rat prolactin.
J Lab Clin Med 1985; 105: 294 - 298.
4. Butcher, R. L., Collins, W. E., Fugo, N. W.
Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat.
Endocrinology 1974; 94: 1704 - 8.
5. Barbieri, R. L., Todd, R. B., Morishita, H., Ryan, K. J., Fishman, J, Naftolin, F.
Response of serum prolactin to catechol estrogen in the immature rat.
Fertil Steril 1980; 34: 391 - 3.
6. Wong, C. C.
Endogene und exogene Einflüsse auf die Variabilität der Hormonausschüttung bei der Ratte (Endogenous and exogenous influences on the variability of hormone release in the rat).
Thesis, Hannover (Germany): Univ. of Hannover, 1981.
7. Campbell, G. A., Kurcz, M., Marshall, S., Meites, J.
Effects of starvation in rats on serum levels of FSH, LH, TSH, growth hormone and prolactin: response to LH-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone.
Endocrinology 1977; 100: 580 - 7.
8. Haggi, E., Aoki, A.
Prolactin content in rat pituitary gland. RIA of prolactin after different extraction procedures.
Acta Endocrinol 1981; 97: 338 - 42.
9. Reichel, J.
Wirkungen gonadaler Steroide auf die adeno-hypophysären Thyreotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren, den Prolactinserumspiegel und die hormonelle Hypophysen-Schilddrüsen-Achse der Ratte (Effects of gonadal steroids on the pituitary TRH-receptors, the serum prolactin concentrations and the pituitary-thyroid axis in the rat)
Thesis.
Lübeck (Germany): University of Lübeck, 1990.
10. Moishige, W. K., Pepe, G. J., Rothschild, I.
Serum LH, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. Endocrinology 1973; 92: 1527 - 30.

11. SHORT INSTRUCTION

(all sample sizes given in µl)

MP Well Steps	ng/ml Solution	0 (A)	1 (B)	2 (C)	3 (D)	4 (E)	5 (F)	Sample
		0	5	10	20	40	80	
Pipet	Calibrator	25	25	25	25	25	25	-
Pipet	Sample	-	-	-	-	-	-	25
Pipet	Sample Buffer	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
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
Incubate for 30 min at RT in the dark								
Pipet	Stop Solution	50	50	50	50	50	50	50
Read at $\lambda = 450$ nm								

1. EINLEITUNG

1.1. VERWENDUNG

Der Demeditec Prolactin rat ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaktin in Rattenserum.

1.2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Ratten-Prolaktin (rPRL) ist ein einkettiges Polypeptidhormon und wird in den acidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 23.000. Prolaktine unterschiedlicher Spezies zeigen signifikante Variationen in der Aminosäuren-Sequenz. So stimmen Ratten- und humanes Prolaktin nur in 50 Prozent der Aminosäurenreste überein.

Die Synthese und die Ausschüttung des Prolaktins unterliegen der Steuerung des Hypothalamus. Wenn der funktionelle Kontakt zwischen Hypophyse und Hypothalamus unterbrochen ist, kommt es zu einer ungehemmten Sekretion von rPRL aus den laktotropen Zellen. Daraus kann gefolgert werden, dass vermutlich kein "Releasing"-Hormon für Prolaktin, sondern nur ein "Inhibiting"-Hormon vorhanden ist.

Dopamin wirkt auf die Prolaktinausschüttung hemmend. Ob es aber mit dem "PIF" (Prolaktin Inhibiting Factor) identisch ist, ist zweifelhaft. Als Stimulatoren sind Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) und das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Östrogene und eine Vielzahl von Medikamenten, hauptsächlich Neuroleptica und Antidepressiva, bekannt.

Prolaktin ist physiologisch vor allem für die Einleitung und Erhaltung der Laktation nach einer Trächtigkeit verantwortlich. Während der Trächtigkeit steigt die Prolaktin-Serumkonzentration der Ratte an, wobei jedoch eine große individuelle Schwankungsbreite zu beobachten ist. Während der Laktationsphase bleiben die Prolaktinkonzentrationen auf hohem Niveau bestehen. Andere physiologische Wirkungen von Prolaktin sind unter anderem seine Wirkung auf die Keimdrüsenfunktion; in der Ratte hat Prolaktin einen luteotropen Effekt, der in vielen anderen Spezies nicht ausgeprägt ist. Daneben ist Prolaktin ein Stress-Hormon.

Die Prolaktinwerte der Ratte unterliegen, wie die des Menschen, tageszeitlichen Schwankungen. Zum späten Nachmittag hin steigt der Prolaktinspiegel an, während in den frühen Morgenstunden die niedrigsten Konzentrationen gemessen werden.

Aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums ist Prolaktin eines der in der Ratte am häufigsten getesteten Hormone, um den Einfluss neuer Arzneimittel und Drogen auf das endokrine System des Organismus zu untersuchen.

2. TESTPRINZIP

Der vorliegende Test ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplatten-Format mit einer Flüssigphasen-Inkubation zur quantitativen Bestimmung von Ratten-Prolaktin im Serum. Die Festphase ist mit monoklonalen Antikörpern gegen Ratten-Prolaktin beschichtet (1. Antikörper).

Standards und Patientenproben werden in die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und reagieren dann 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 Ratten-Prolaktin kann sich in einer anschließenden Inkubation ein Sandwich-Komplex aus dem 1. Antikörper, Ratten-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 Ratten-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-Ratten-Prolaktin-Antikörper
2. **CAL** Master Standard, 1 Fl., 80 ng, lyophilisiert
Enthält hoch-aufgereinigtes Ratten-Prolaktin in Serum/Puffer-Matrix
siehe „Vorbereitung der Reagenzien“
3. **SAM | DIL** Standard/Probenverdünnungspuffer, 1 Fl., 6 ml, gebrauchsfertig
Ratten-Prolaktin frei
4. **ENZ | CONJ** Enzymkonjugat, 1 Fl., 22 ml, rot, gebrauchsfertig
Enthält polyklonale Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase, in gepufferter Lösung mit Konservierungsmittel
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 und 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 Substratlösung vor Licht.

5. PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG

Die Bestimmung des Ratten-Prolaktin wird im Serum durchgeführt. Es wird 25 µl pro Einzelbestimmung benötigt. Da die Prolaktinausschüttung bei Ratten 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 Ratten-Prolaktin höher als der höchste Standardwert (80 ng/ml) liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung im 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 Serumproben 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 des **Ratten-Kontroll-Sets mit der Kat.-Nr. DEV99RC**. Für weitere Informationen kontaktieren Sie **DEMEDIATEC**.

6.2. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Vorbereitung der Standards

Vier Röhrchen beschriften: E (40 ng/ml), D (20 ng/ml), C (10 ng/ml) und B (5 ng/ml). **0,1 ml** des Standard-/Probenverdünnungspuffers in alle Röhrchen pipettieren. 0,1 ml des rekonstituierten Standards in Röhrchen E (40 ng/ml) pipettieren und sorgfältig mischen.

0,1 ml aus dem Röhrchen E (40 ng/ml) in Röhrchen D (20 ng/ml) überführen und sorgfältig mischen. Die Serienverdünnung entsprechend fortsetzen. Der rekonstituierte Standard dient als höchster Standard (80 ng/ml), der Standard-/Probenpuffer dient als Null-Standard A (0 ng/ml). Die Mikrotiterplatte entsprechend den Proben vorbereiten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P3	P..								
b	A	E	P3	P..								
c	B	F	P4									
d	B	F	P4									
e	C	P1	P5									
f	C	P1	P5									
g	D	P2	P6									
h	D	P2	P6									

2. Zur Bestimmung von Ratten-Prolaktin jeweils 25 µl Standards, Kontrollen 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 (18 – 28 °C) auf einem Plattenschüttler (600 – 900 Upm) inkubieren.
5. Platte dekantieren und 4-mal jeweils mit 300 µl Waschlösung waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
6. 200 µl Enzymkonjugat in jede Vertiefung pipettieren.
7. Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) auf dem Schüttler inkubieren.
8. Platte dekantieren und 4-mal jeweils mit 300 µl Waschlösung waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.

9. 200 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.
10. 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 28 °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 Demeditec Prolactin rat ELISA 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.

6.3.1. AUSWERTUNGSBEISPIEL

Die folgende Tabelle zeigt typische Messwerte am Beispiel des Demeditec Prolactin rat 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	0,079	0,073	-	0
	----- 0,067			
B	0,189	0,179	6,9	5
	----- 0,169			
C	0,328	0,342	12,7	10
	----- 0,357			
D	0,766	0,796	29,7	20
	----- 0,827			
E	1,591	1,635	61,0	40
	----- 1,679			
F	2,588	2,677	100	80
	----- 2,765			
Unbekannte Proben				
X 001	0,318	0,324	12,1	9,8
	----- 0,329			
X 002	0,577	0,590	22,0	16,4
	----- 0,603			
X 003	1,733	1,716	64,1	47,3
	----- 1,698			

7. NORMALWERTE

Im Rahmen einer Studie wurden mit dem Demeditec Prolactin rat 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 weibliche Ratten	nn - 17,9	15
Normale männliche Ratten	nn - 23,4	10
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 rat ELISA wurde bei 0,6 ng/ml ermittelt.

8.2. SPEZIFITÄT

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

Folgende Substanzen wurden in einem weit oberhalb der normalerweise vorliegenden physiologischen Konzentrationsbereiche getestet:

	zugesezte Menge (ng/ml)	gemessene Kon- zentration (ng/ml)	Kreuz- reaktivität (%)
Ratten-TSH	5.000	1,5	0,03
Ratten-FSH	10.000	5,1	0,05
Ratten-LH	5.000	nn	-
Ratten-GH	4.000	nn	-

Um die Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper gegenüber Plazenta Laktogen (rPL) zu überprüfen, wurde Serum einer Ratte am 18. Tag der Trächtigkeit gewonnen und als Probe eingesetzt. Es wurde eine Konzentration von 1,5 ng/ml ermittelt. Da die Serumkonzentration von plazentalem Laktogen ab dem 15. Tag der Tragezeit über 50 ng/ml ansteigt, kann gefolgert werden, dass die im Testkit verwendeten Antikörper nicht oder nur minimal mit plazentalem Laktogen kreuzreagieren.

8.3. REPRODUZIERBARKEIT

Nachfolgende Variationskoeffizienten (VK) wurden für die Intra-Assay-Varianz auf der Basis einer 20 fachen Bestimmung von drei Proben ermittelt; für die Inter-Assay-Varianz wurden die Ergebnisse aus 14 Assays für drei Proben ermittelt.

Intra - Assay			
Proben Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Standard-Abweichung $\pm s$ (ng/ml)	CK (%)
1	6,6	0,20	3,0
2	19,6	0,77	3,9
3	33,0	1,80	5,5

Inter - Assay			
Proben Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Standard-Abweichung $\pm s$ (ng/ml)	CK (%)
1	6,5	0,28	4,3
2	20,5	0,71	3,5
3	33,4	1,48	4,4

8.4. WIEDERFINDUNG

Dem Standard-/Proben-Verdünnungspuffer wurden drei unterschiedliche Mengen an Ratten Prolactin zugegeben (600, 800 und 1000 ng/ml). 50 µl jeder Lösung wurden zu je 950 µl zweier verschiedener Serumproben von Ratten hinzugefügt (Verdünnungsverhältnis von 1:20), um die Serum-Matrix der Proben möglichst intakt zu lassen. Alle Proben wurden dann mit dem Demeditec Prolactin rat ELISA Test gemessen.

Demeditec Prolactin rat ELISA

Proben	Lösung	Gemessene Konzentration	Erwartete Konzentration	Wiederfindung
		[ng/ml]	[ng/ml]	[%]
1	-	26,1	-	-
	A	54,7	56,1	97
	B	66,6	66,1	100
	C	79,9	76,1	105
2	-	24,2	-	-
	A	52,6	54,2	103
	B	67,5	64,2	95
	C	81,1	74,2	91

8.5. LINEARITÄT

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

Demeditec Prolactin rat ELISA

Sample	Verdünnung	Gemessene Konzentration	erwartete Konzentration	Wiederfindung
		[ng/ml]	[ng/ml]	[%]
1	8 in 8	20,9	-	-
	4 in 8	10,6	10,5	101
	2 in 8	5,9	5,2	113
	1 in 8	3,0	2,6	115
2	8 in 8	34,7	-	-
	4 in 8	16,7	17,4	96
	2 in 8	9,0	8,7	103
	1 in 8	4,5	4,3	105

9. LIMITATIONEN

"High-Dose Hook"-Effekt

Rattenserum mit Konzentrationen bis zu 300 ng/ml Prolaktin wurden im Demeditec Prolactin rat ELISA ohne Hinweis auf einen bestehenden 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.

Effekte von Antikoagulantien

Um zu bestimmen, ob Antikoagulantien den Assay stören, wurden Blutproben von 30 Ratten in klare bzw. EDTA Vacutainer Röhrchen gefüllt. Alle Proben wurden mit dem Demeditec Prolactin rat ELISA gemessen und folgende Ergebnisse ermittelt:

(EDTA) = 1,05 (Serum) – 9,3 U/ml r = 0,978

Mittelwert: 3,68 ng/ml (Serum)
 3,78 ng/ml (EDTA)

Eine kleinere Studie mit Citrat- und Heparin-Plasma zeigte vergleichbare Werte wie EDTA-Plasma.

10. LITERATUR











1. Leung, F. C., Russel, S. M.; Nicoll, C. S.
Relationship between bioassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat serum.
Endocrinology 1978; 103: 1619 - 28.
2. Martinat, N., Hall, E., Ravault, J. P., Dubois, M. P.
Purification of rat prolactin: development of an homologous radioimmunological assay and comparison with the NIAMDD system.
Ann Biol Anim Bioch Biophys 1979; 19: 1771 - 48.
3. Beach, J. E., Miles, D. J., Lukes, Y. G., Vigersky, R. A.
Microplate solid-phase radioimmunoassay for rat prolactin.
J Lab Clin Med 1985; 105: 294 - 298.
4. Butcher, R. L., Collins, W. E., Fugo, N. W.
Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat.
Endocrinology 1974; 94: 1704 - 8.
5. Barbieri, R. L., Todd, R. B., Morishita, H., Ryan, K. J., Fishman, J, Naftolin, F.
Response of serum prolactin to catechol estrogen in the immature rat.
Fertil Steril 1980; 34: 391 - 3.
6. Wong, C. C.
Endogene und exogene Einflüsse auf die Variabilität der Hormonausschüttung bei der Ratte (Endogenous and exogenous influences on the variability of hormone release in the rat).
Thesis, Hannover (Germany): Univ. of Hannover, 1981.
7. Campbell, G. A., Kurcz, M., Marshall, S., Meites, J.
Effects of starvation in rats on serumlevels of FSH, LH, TSH, growth hormone and prolactin: response to LH-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone.
Endocrinology 1977; 100: 580 - 7.
8. Haggi, E., Aoki, A.
Prolactin content in rat pituitary gland. RIA of prolactin after different extraction procedures.
Acta Endocrinol 1981; 97: 338 - 42.
9. Reichel, J.
Wirkungen gonadaler Steroide auf die adeno-hypophysären Thyreotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren, den Prolactinserumspiegel und die hormonelle Hypophysen-Schilddrüsen-Achse der Ratte (Effects of gonadal steroids on the pituitary TRH-receptors, the serum prolactin concentrations and the pituitary-thyroid axis in the rat)
Thesis.
Lübeck (Germany): University of Lübeck, 1990.
10. Moishige, W. K., Pepe, G. J., Rothschild, I.
Serum LH, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat.
Endocrinology 1973; 92: 1527 - 30.

11. KURZANLEITUNG

(alle Volumenangaben in µl)

MT-Platten-Well	ng/ml	0	1	2	3	4	5	Probe
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	
Schritte	Lösung	0	5	10	20	40	80	
Pipettieren	Standard	25	25	25	25	25	25	-
Pipettieren	Probe	-	-	-	-	-	-	25
Pipettieren	Probenpuffer	50	50	50	50	50	50	50
2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubieren								
Dekantieren 4x mit 300 µl Waschlösung wa- schen								
Pipettieren	Enzymkonjugat	200	200	200	200	200	200	200
1 Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubieren								
Dekantieren 4x mit 300 µl Waschlösung wa- schen								
Pipettieren	Substratlösung	200	200	200	200	200	200	200
30 min bei RT im Dunkeln inkubieren								
Pipettieren	Stopplösung	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$								

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	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