

INSTRUÇÕES DE USO - PROLACTINA

Teste de ELISA colorimétrico para detecção de Prolactina no soro – CTI391

Teste imunoenzimático para determinação quantitativa da concentração de Prolactina em soro humano

Teste para 96 determinações

SUMÁRIO

O hormônio Prolactina, secretado pela hipófise de homens e mulheres, consiste em uma cadeia polipeptídica com cerca de 23 kDa. Sua principal atividade biológica envolve o crescimento das glândulas mamárias e a indução e manutenção da produção de leite. Há evidências de que a prolactina também esteja envolvida na esteroidogênese nas gônadas, agindo sinergicamente com o LH.

O nível basal de prolactina é geralmente maior em mulheres do que homens. Uma elevada concentração do hormônio pode inibir a esteroidogênese, bem como a síntese de LH e FSH pela hipófise. A hipersecreção pode ser causada por tumores da hipófise, doenças do hipotálamo, hipotireoidismo, falência renal, exercícios físicos exagerados ou medicação severa. A determinação da concentração de prolactina é utilizada no diagnóstico de hiperprolactinemia e no acompanhamento do tratamento.

A metodologia de imunensaio enzimático (ELISA) fornece ótima sensibilidade e requer poucas manipulações, em uma determinação direta da concentração de prolactina.

PRINCÍPIO

Neste método, os soros-padrão e as amostras de soro em análise são adicionados aos respectivos pocinhos da microplaca, que foram previamente recobertos com streptoavidina. Anticorpos policlonais anti-prolactina conjugados à peroxidase e anticorpos monoclonais anti-prolactina conjugados à biotina são adicionados e os reagentes são misturados. Os anticorpos reconhecem o hormônio existente, formando complexos que se ligam às moléculas de streptoavidina imobilizadas na placa. Após a etapa de incubação, o excesso de reagentes não imobilizados é eliminado na lavagem, e o substrato enzimático é adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul, que é transformada em amarela com a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é diretamente proporcional à quantidade de Prolactina existente. Através da construção da curva-padrão, é possível determinar quantitativamente a concentração do hormônio nas amostras.

Tempo total de incubação: 1 hora.

COMPONENTES DO KIT

- ◆ Material suficiente para 96 determinações
- 1. **MICROPLACA:** 12 tiras de 8 pocinhos cada, marcados com streptoavidina, dispostas em suporte
Pronta para uso
- 2. **PADRÕES DA CURVA:** soro humano diluído em tampão com conservante, contendo prolactina nas concentrações:
PADRÃO A: 0 ng/mL, 0,5 mL
PADRÃO B: 5 ng/mL, 0,5 mL
PADRÃO C: 10 ng/mL, 0,5 mL
PADRÃO D: 25 ng/mL, 0,5 mL
PADRÃO E: 50 ng/mL, 0,5 mL
PADRÃO F: 100 ng/mL, 0,5 mL
Prontos para uso
- 3. **CONJUGADO:** 13 mL, anticorpos policlonais anti-prolactina conjugados à peroxidase, anticorpos monoclonais anti-prolactina conjugados à biotina, em solução tampão com estabilizantes, conservantes e corante
Pronto para o uso
- 4. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM:** 20 mL, solução tampão com conservantes
Concentrada 50x
- 5. **SUBSTRATO:** 12 mL, 3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina (TMB) em solução tampão contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
Pronto para uso
- 6. **SOLUÇÃO DE PARADA:** 8 mL, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 M
Pronta para uso
- 7. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades
- 8. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

ARMAZENAMENTO

- Armazenar o kit entre +2 e +8° C.
- As tiras da microplaca não utilizadas devem ser protegidas da umidade, mantidas na embalagem original selada, com o dessecante.
- Os reagentes são estáveis até o prazo de validade do kit, se conservados adequadamente.
- Após abertos, todos os componentes do kit são estáveis por 60 dias, se conservados entre +2 e +8° C.
- Não expor os reagentes à luz solar ou luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o substrato sempre ao abrigo da luz.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO INCLUÍDOS NO KIT

- Água deionizada
- Micropipetas e ponteiras descartáveis
- Agitador tipo vórtex
- Papel absorvente
- Cronômetro
- Sistema de lavagem manual ou automático com capacidade para 300 µL
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, 620-630 nm

PRECAUÇÕES DE USO

Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*

MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg, bem como para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estão sendo manuseados.
- Evitar o contato do substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas, usando recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- É aconselhável usar amostras colhidas em jejum matutino, para termos de comparação com os valores normais estabelecidos.
- Coletar as amostras de sangue sem aditivos ou barreira de gel. Após a coagulação, processá-las imediatamente para obtenção de soros sem hemólise.
- Evitar o uso de soros hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8°C por no máximo 5 dias, ou congeladas a -20°C por até 30 dias. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez.

PROCEDIMENTO

Operações prévias

1. Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit, controles e amostras à temperatura ambiente (+20 a +27° C), e homogeneizar suavemente.
2. **Solução de lavagem diluída:** diluir 1 parte da solução concentrada (50x) para 49 partes (1:50) de água deionizada (exemplo: 10 mL + 490 mL), e estocar em frasco adequado. A solução concentrada permite a preparação de um volume total de 1000 mL (1 litro) de *solução de lavagem diluída*. Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C.

Armazenar a solução diluída entre +2 e +8° C.

- Deixar que a microplaca atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, retornando as restantes para a embalagem com dessecante e selando. Reservar dois pocinhos (duplicatas) para cada padrão, controles internos do laboratório e amostras.
Exemplo: pocinhos A1 e A2 para o *padrão A*, B1 e B2 para o *padrão B*, C1 e C2 para o *padrão C*, D1 e D2 para o *padrão D*, E1 e E2 para o *padrão E*, F1 e F2 para o *padrão F*, G1 e G2 para o *controle "X"*, etc.

Realização do teste

- Dispensar 50 µL dos padrões, controles internos do laboratório e amostras nos respectivos pocinhos (em duplicata).
- Adicionar 100 µL dos anticorpos conjugados a cada pocinho.
- Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos, para homogeneizar. Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora à temperatura ambiente (+20 a +27° C).
- Descartar o conteúdo de todos os pocinhos por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL da solução de lavagem diluída, aspirar ou decantar, e repetir o processo mais 2 vezes (total de 3 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante, batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
- Dispensar 100 µL do substrato em cada pocinho, na mesma ordem usada anteriormente, para minimizar efeitos de tempo.
- Cobrir novamente com a folha adesiva e incubar por exatamente 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
- Adicionar 50 µL da solução de parada a cada pocinho, na mesma ordem usada anteriormente. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos, para homogeneizar.
- Ler a absorbância a 450 nm, dentro de máximo 30 minutos. Usar a absorbância de 620-630 nm para minimizar as imperfeições da placa.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Através da construção de uma curva dose-resposta usando os padrões fornecidos no kit (**curva-padrão**), é possível calcular a concentração de prolactina nas amostras testadas. Isso pode ser feito com auxílio de qualquer programa de computador que faça gráficos, ou à mão, em papel milimetrado.

- Registrar em uma tabela os valores de absorbância a 450 nm para cada pocinho correspondente aos padrões, controles ou amostras. Calcular a **absorbância média** das duplicatas: $(Abs_1 + Abs_2) / 2$.
- Para construir a **curva-padrão**, utilizar os valores de absorbância de cada duplicata dos padrões, não o valor médio das duplicatas. Plotar em um gráfico a **absorbância** das duplicatas dos padrões (eixo Y vertical) em função da **concentração** de Prolactina em ng/mL correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a **curva-padrão**.
- Determinar a concentração de prolactina (em ng/mL) para cada controle ou amostra, projetando a **absorbância média** das duplicatas sobre a curva-padrão.

CONTROLE DE QUALIDADE

- O teste executado é considerado **válido** observando-se os seguintes critérios:
 - ◆ a absorbância do **padrão F** (100 ng/mL) deve ser **maior ou igual a 1,3**

- ◆ quatro de cada 6 controles internos devem apresentar valores dentro dos limites esperados
- A cada ensaio, é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo. Para monitorar a performance do teste, é aconselhável incluir controles internos correspondentes aos valores limites. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter registros de Controle de Qualidade, para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou degradação dos reagentes do kit. Reagentes frescos devem ser usados para determinar a razão das variações.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Performance do ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas. As soluções do kit devem estar límpidas, livres de contaminação microbiológica, e dentro do prazo de validade. Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções dadas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações. A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas no tempo de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder 10 min, e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma sequência. Falhas no procedimento de lavagem podem levar a resultados inválidos.
- A leitora de microplacas mede a absorbância na vertical. Evitar tocar o fundo dos pocinhos.
- Em caso de dúvidas, contatar o Serviço de Atendimento ao Cliente, tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

Interpretação

- O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.
- Amostras com concentrações anormalmente elevadas de prolactina podem causar “hook effect”, ou seja, apresentar resultados surpreendentemente baixos. Se houver esta suspeita, diluir a amostra a 1:100 usando o padrão A (0 ng/mL), re-testar e multiplicar o resultado por 100. Entretanto, amostras com valores até 3.000 ng/mL não apresentam este efeito, tendo resultados maiores que o maior padrão.
- Pacientes que tenham recebido preparações de anticorpos monoclonais de camundongo para diagnóstico ou tratamento podem apresentar anticorpos anti-camundongo, levando a resultados falsamente elevados ou diminuídos neste teste.
- A produção do prolactina é aumentada na gravidez, lactação ou pelo uso de contraceptivos orais.
- Drogas como morfina, reserpina e psicotrópicos também podem aumentar a produção do hormônio.

- A regulação da concentração do prolactina depende de inúmeros fatores além da homeostase da hipófise. Portanto, a concentração deste hormônio não é suficiente para determinar o estado clínico.

VALORES ESPERADOS

- Para determinar os valores esperados neste teste por ELISA para Prolactina, foi realizado um estudo em uma população adulta aparentemente normal, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores esperados para ELISA para Prolactina (em ng/mL)

Mulheres	
Adultas (N = 70)	1,2 – 19,5
Pós-menopausa (N = 10)	1,5 – 18,5
Homens	
Adultos (N = 50)	1,8 – 17,0

- É importante ressaltar que o estabelecimento de uma faixa de valores esperados para uma população, usando um determinado método, depende de vários fatores, tais como a especificidade do método, a população testada e a precisão na execução do método. Por estas razões, cada laboratório deve tentar estabelecer sua própria faixa de valores esperados usando a população em estudo.

PERFORMANCE

Precisão

Para determinar a precisão intra-análise e inter-análise, foram testados *pools* de soros-controle com diferentes níveis de prolactina. O número de amostras (N), valores médios (X), desvio-padrão (dp) e coeficiente de variação (cv) para cada controle estão representados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 - Precisão Intra-análise (em ng/mL)

Amostra	N	X	dp	cv
nível 1	24	10,6	0,35	3,3%
nível 2	24	28,6	0,84	3,0%
nível 3	24	77,5	1,93	2,5%

TABELA 3 - Precisão Inter-análise (em ng/mL)

Amostra	N	X	dp	cv
nível 1	10	11,5	0,19	1,7%
nível 2	10	27,8	0,50	1,8%
nível 3	10	78,5	2,32	3,0%

N = experimentos em duplicata

Análise comparativa

Este teste de ELISA para prolactina foi comparado com método análogo por quimioluminescência. Foram utilizadas amostras biológicas (N = 86) de indivíduos normais e de grávidas. As médias, a equação de regressão e o coeficiente de correlação obtidos, apresentados na Tabela 4, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

TABELA 4 - Análise comparativa

Método	Média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação
ELISA (x)	19,0	$y = 1,63 + 1,01 (x)$	0,973
referência (y)	17,3		

Sensibilidade

A sensibilidade deste teste de ELISA para prolactina foi calculada em 0,04 ng, ou equivalente a uma amostra contendo 0,8 ng/mL.

Especificidade

A possível reatividade cruzada deste método de ELISA para prolactina foi calculada como a razão entre a dose de substância interferente e a dose de hormônio necessária para obter o mesmo resultado.

TABELA 5 - Reatividade Cruzada

Substância	Reatividade cruzada	Concentração
Prolactina	1,0000	--
LH	< 0,0001	1000 ng/mL
FSH	< 0,0001	1000 ng/mL
hCG	< 0,0001	1000 ng/mL
Tirotropina (TSH)	< 0,0001	1000 ng/mL
Hormônio do crescimento (GH)	< 0,0001	1000 ng/mL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friesen H & Hwang P. Ann Ver Med 24: 251, 1973.
2. Frantz AG. N Engl J Med 298: 201, 1978.
3. Balagura S et al. J Neurosurg 51: 42, 1979.
4. Gonzales ER. JAMA 242: 401, 1979.
5. Parkes DN. J Med 301: 873, 1979.
6. Tolis G. Hosp Pract 15: 85, 1980.
7. Pasini F et al. J Endocrinol 106: 81, 1985.
8. Fraser IS et al. J Clin Endo & Metabol 69: 585, 1989.
9. Jackson RD et al. J Clin Endo & Metabol 68: 1046, 1989.
10. Maddox PR et al. Acta Endocrinol 125: 621, 1991.
11. Teiz N. Clinical Guide to Laboratory Tests. WB Saunders, Philadelphia, London, 2nd ed, 1992.

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda –**

CNPJ: 03654699000100

Av. José Cândido da Silveira 2100 - sl 10 – Horto – 30130-780 - Belo Horizonte, MG, Brasil –

Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452. ANVISA: **8004957.0053**