



IVD

CE

# VIP RIA

*RB311*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b>
<b>230123</b>
New logo

CE

en

Read entire protocol before use.

## VIP RIA

### I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human plasma.

For professional use within a laboratory.

### II. GENERAL INFORMATION

A. Proprietary name : DIAsource VIP RIA

B. Catalog number : RB311 : 100 tests

C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

### III. CLINICAL BACKGROUND

#### A. Biological activities

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a linear polypeptide containing 28 amino acid residues. The molecular weight is 3381. VIP is structurally related to secretin and to other members of the secretin family. The carboxyterminal amino acid of VIP (Asn) is amidated.

Immunocytochemical studies have shown that VIP is present in neurons throughout the gastrointestinal tract, the central and peripheral nervous systems, the salivary glands and the pancreas.

VIP stimulates water and bicarbonate secretion by the pancreas. VIP possesses the capacity to relax smooth muscle. Administration of VIP produces vasodilation and pulmonary broncho-dilation and relaxes the lower oesophageal sphincter and smooth muscle of the fundus of the stomach.

VIP is believed to play crucial roles in the regulation of intestinal motility and intestinal epithelial ion and water transport.

#### B. Clinical application

Increased plasma immunoreactive VIP concentrations have been reported in patients with the WDHA syndrome (water, diarrhoea, hypokalemia and achlorhydria). Increased plasma levels of VIP have also been reported in patients with cirrhosis.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

VIP is analysed by the competitive radioimmunoassay using antibodies to a VIP-albumin conjugate. VIP in standards and samples compete with  $^{125}\text{I}$ -labelled VIP in binding to the antibodies.  $^{125}\text{I}$ -VIP binds in a reverse proportion to the concentration of VIP in standards and samples. In order to increase the sensitivity of the assay a sequential incubation is performed. Antibody-bound  $^{125}\text{I}$ -VIP is separated from the unbound fraction using the double antibody polyethylene glycol precipitation technique. The radioactivity of the precipitates is measured. The antiserum used in this kit is directed to the C-terminal part of the VIP molecule.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
<b>[ANTISERUM]</b>			
Rabbit antiserum raised against highly purified porcine VIP conjugated to bovine serum albumin in phosphate buffer with human serum albumin, sodium azide and aprotinin.	1 vial lyophilised	Blue	<b>Add 22 ml distilled water</b>
<b>Ag</b> $^{125}\text{I}$	1 vial lyophilised 56 kBq	Red	<b>Add 12.5 ml distilled water</b>
Contains 1.5 $\mu\text{Ci}$ or 56 kBq. Produced by iodination of synthetic, human VIP. HPLC-purified, monoiodinated. Specific activity: 1700-2100 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ (62-77 MBq/nmol). Lyophilized phosphate buffer with human serum albumin, sodium azide, normal rabbit serum and aprotinin.			
<b>[Ab PEG]</b>			
Goat anti-rabbit-Ig antiserum in phosphate buffer with human serum albumin, NaN3, and polyethylene glycol 6000.	1 vial 50 mL	Green	<b>Ready for use</b>
<b>[DIL BUF]</b>			
Standard Diluent : lyophilized human plasma for dilution of the VIP standards. Contains aprotinin (Trasylol® or equivalent) and sodium azide.	1 vial lyophilised	Black	<b>Add 10 ml distilled water</b>
<b>[CAL]</b>			
Synthetic human VIP. Lyophilized in human plasma. Contains aprotinin (Trasylol® or equivalent) and sodium azide.	1 vial lyophilised	Yellow	<b>Reconstitute with distilled water by the volume stated on the vial label</b>
<b>[ASS BUF]</b>			
Buffer for use instead of antiserum in non-specific binding controls in phosphate buffer with human serum albumin, sodium azide and aprotinin (Trasylol® or equivalent).	1 vial 5 mL	Black	<b>Ready for use</b>
<b>[CONTROL N]</b>			
Controls - N = 1 or 2 Contains sodium azide.(<0.1%).	2 vials lyophilised	Silver	<b>Add 1.5 mL distilled water</b>

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

- Distilled water.
- 11-13 x 55 mm disposable tubes of polystyrene.
- Pipettes: 1 mL, 5 mL and 10 mL.
- Pipettes with disposable tips: 100, 200 and 500  $\mu\text{l}$ .
- Vortex mixer.
- Centrifuge, refrigerated, giving minimum 1700 x g.
- Gamma counter.

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Anti-VIP** : Reconstitute with 22 mL of distilled water. Store at 2-8°C.
- $^{125}\text{I}$ -VIP** : Reconstitute with 12.5 mL of distilled water immediately before use. Store at -18°C or lower if reused.
- Double antibody PEG** : Ready for use. Mix thoroughly before use. Store at 2-8°C.
- Calibrator diluent** : Reconstitute with 10 mL distilled water. Store at -18°C or lower if reused.
- VIP Calibrator 120 pmol/L** : Reconstitute with distilled water, by the volume stated on the vial label. Store at -18°C or lower if reused.
- Assay buffer** : Ready to use. Store at 2-8°C.
- Controls** : Reconstitute with 1.5 mL distilled water. Store at -18°C or lower if reused.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8°C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of lyophilized reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in a vial by gentle inversion and avoid foaming. The stability of the reagents is found on the label of the vials. For lyophilized reagents the expiry date is valid for the reconstituted reagents. Reconstituted reagents are stable for 10 weeks stored correctly.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION

Blood is collected in tubes containing EDTA and aprotinin (Trasylol® or equivalent) (5000 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) in a 10 mL vacutainer). The sample is cooled in an ice-bath immediately. Plasma is separated by centrifugation at +4°C. The plasma should be frozen within 1 hour and stored at -18°C or lower until assayed. Repeated freezing and thawing should be avoided.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Accuracy in all pipetting steps is essential. Reagents should be brought to room temperature prior to use. The assay is performed with duplicates (standards, controls, samples, control tubes for non-specific binding and total activity).

A complete assay includes:

Standard : 7 concentrations: 0, 3.8, 7.5, 15, 30, 60 and 120 pmol/L.

Controls : Controls with known concentrations of VIP for quality control.

Samples.

Tubes for determination of the non-specific binding for standards and samples (NSB-tubes).

Tubes for determination of the total radioactivity added (TOT-tubes).

##### B. Procedure

- Reconstitute the reagents according to the instructions.
- Prepare the VIP working standards by dilution of the VIP standard 120 pmol/L with the Standard diluent according to the following:  
 a/ 1.00 mL standard 120 pmol/L + 1.00 mL diluent = 60 pmol/L.  
 b/ 1.00 mL standard 60 pmol/L + 1.00 mL diluent = 30 pmol/L.  
 c/ 1.00 mL standard 30 pmol/L + 1.00 mL diluent = 15 pmol/L.  
 d/ 1.00 mL standard 15 pmol/L + 1.00 mL diluent = 7.5 pmol/L.  
 e/ 1.00 mL standard 7.5 pmol/L + 1.00 mL diluent = 3.8 pmol/L.  
 f/ Standard diluent = 0 pmol/L.
- Store the standard solutions at -18°C or lower if reused.
- Pipette 200  $\mu\text{l}$  of standards (0-120 pmol/L), samples and controls in their respective tubes. Pipette 200  $\mu\text{l}$  of the zero-standard in the NSB-tubes.
- Add 200  $\mu\text{l}$  anti-VIP to all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
- Add 200  $\mu\text{l}$  assay diluent to the NSB-tubes.
- Vortex-mix and incubate for 24 hours at 2-8°C.
- Add 100  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -VIP to all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
- Vortex-mix and incubate for 24 hours at 2-8°C.
- Add 500  $\mu\text{l}$  double antibody-PEG to all tubes except the TOT-tubes (mix this reagent before pipetting).
- Vortex-mix and incubate for 30-60 minutes at 2-8°C.
- Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4°C (1700 x g).
- Decant the supernatants immediately after centrifugation.
- Count the radioactivity of the precipitates in a gamma counter (counting time: 2minutes).

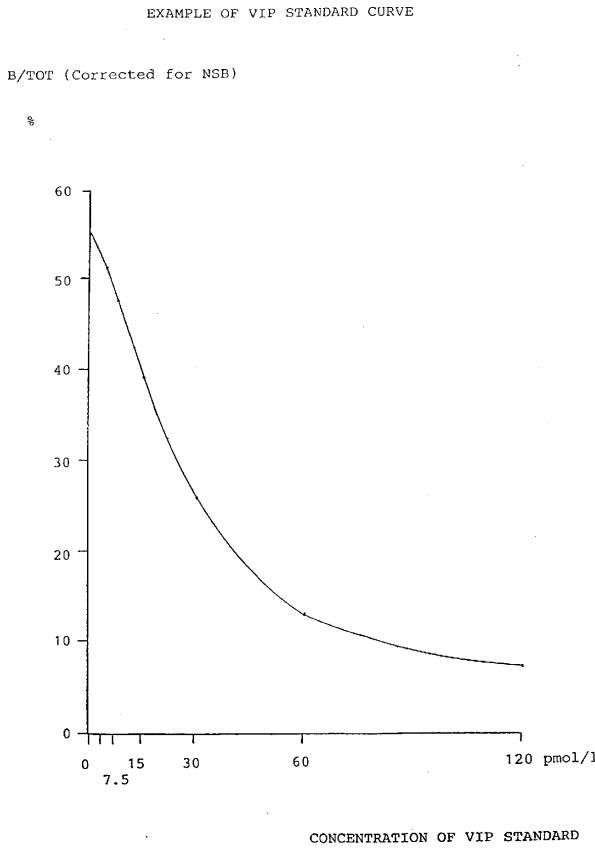
#### XI. CALCULATION OF RESULTS

- Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding from the count rate (CPM) of the replicates of standards, controls and samples.
- A standard curve is generated by plotting the precipitated CPM, bound fraction (in CPM or %B/TOT) against the concentrations of the VIP standards.

3. To obtain the VIP concentrations in the samples and controls read the corresponding concentrations to their precipitated CPM or %B/TOT from the generated standard curve.
4. The standard curve and the calculation of the concentrations in the samples can also be done by a computer method. A spline method may be used.

## XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.



## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Sensitivity

The sensitivity calculated from a decrease in binding of 2 SD in the zero-standard is 3 pmol/L.

### B. Precision

#### Intra assay variation:

Level	Coefficient of variation (% CV)
14.5 pmol/L	5.9
61.0 pmol/L	3.3

#### Inter assay variation:

Level	Coefficient of variation (% CV)
12.6 pmol/L	7.7
26.4 pmol/L	6.7
51.4 pmol/L	6.1

### C. Specificity

The following cross reactions have been found:

Peptide	Cross reaction
VIP 1-28 (whole sequence)	100.0%
VIP 1-6	<2.5%
VIP 1-18	<2.5%
VIP 1-22	<2.5%
VIP 11-28	83.3%
VIP 7-28	90.9%
VIP 18-28	71.4%
Secretin, porcine	<0.01%
Gastric inhibitory peptide, porcine	<0.01%
Pancreatic glucagon, porcine	<0.01%
Enteroglucagon, porcine	<0.01%
Pancreatic polypeptide, human	<0.01%
Substance P	<0.01%
Somatostatin, ovine	<0.01%

### D. Interference

Samples displaying cloudiness, hemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

## XIV. VIP CONCENTRATION IN HUMAN PLASMA

The VIP concentration in plasma after 12 hours fasting were assayed in normal subjects. The range was <3 pmol/L to 30.0 pmol/L.

## XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

In order to enable the laboratory to completely monitor the consistent performance of the assay, the following important factors should be checked.

### 1. The found concentrations of the controls

The found concentrations of the controls should be within the limits given on the labels of the vials.

### 2. Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of  $^{125}\text{I}$ -VIP in this kit will give 29000-32000 CPM at the reference date (counting efficiency: 80%).

### 3. Maximum binding (Bo/TOT)

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-standard:  
 $\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$

### 4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:  
 $\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$

The non-specific binding should be less than 7%.

### 5. Slope of standard curve

For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the standard curve for run to run reproducibility.

## XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

As the regulations may vary from one country to another, it is essential that the person responsible for the laboratory are familiar with current local regulations, concerning all aspects of radioactive materials of the type and quantity used in this test.

This kit contains components of human origin. They have been tested for hepatitis B surface antigen, antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2 and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for the handling of blood derivatives, should be observed.

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations. Steps should be taken to ensure the proper handling of the radioactive material, according to local and/or national regulations. Only authorized personnel should have access to the reagents.

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

- Radioactive material should be stored in specially designated areas, not normally accessible to unauthorized personnel.

- Handling of radioactive material should be conducted in authorized areas only.

- Care should be exercised to prevent ingestion and contact with the skin and clothing. Do not pipette radioactive solutions by mouth.

- Drinking, eating or smoking should be prohibited where radioactive material is being used.

- Hands should be protected by gloves and washed after using radioactive materials.

-Work should be carried out on a surface covered by disposable absorbing material.

-Spills of radioactive material should be removed immediately, and all contaminated materials disposed as radioactive waste. Contaminated surfaces should be cleaned with a detergent.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be rinsed thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Fahrenkrug, J. and Schffalitzky de Muckadell, O.  
Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma.  
*J. Lab Clin Med* 89:1379 (1977).
2. Lundberg, J.M., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., Martling, C.-R., Larsson, O.,  
Tatemoto, K. and Ånggård, A.  
Coexistence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow  
and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man.  
*Peptides* 5:593-606 (1984).
3. Fahrenkrug, J.  
Evidence for common precursors but differential processing of VIP and  
PHM in VIP-producing tumors.  
*Peptides* 6:357-361 (1985).
4. Bloom, S.R., and Polak, J.M. Vipomas.  
In: *Vasoactive intestinal peptide*. Editor: Said, S.I.  
Raven Press, New York, 457-468 (1982).
5. Bloom, S.R., Christofides, N.D., Delawarter, J., Buell, G., Kawashima, E.  
and Polak, J.M.  
Diarrhoea in VIPoma patients associated with cosecretion of a second  
active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by a single loding  
gene. *Lancet* ii: 1163-1165 (1983).

## XVIII.

### SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrator (0-6)	Controls	Samples				
Standard Diluent	-	200 µl	-	-	-				
Calibrator	-	-	200 µl	-	-				
Controls	-	-	-	200 µl	-				
Samples	-	-	-	-	200 µl				
Anti-VIP	-	-	200 µl						
Assay diluent	-	200 µl	-	-	-				
Vortex-mix and incubate for 24 hours at 2-8°C.									
<sup>125</sup> I Tracer	100 µl								
Vortex-mix and incubate for 24 hours at 2-8°C.									
Double antibody PEG	-	500 µl							
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 2-8°C.									
Centrifuge 15 min ( 1700 g; 4°C )									
Decant and count the radioactivity of the precipitates									

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire la totalité du protocole avant utilisation.

## VIP RIA

### I. UTILISATION PRÉVUE

Dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* du peptide intestinal vasoactif (VIP) dans le plasma humain.

Pour une utilisation professionnelle en laboratoire.

### II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. Nom de spécialité : DIAsource VIP RIA
- B. Numéro de référence : RB311 : 100 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou des renseignements sur les commandes, contacter :

Tél. : +32 (0) 10 84.99.11                      Fax : +32 (0) 10 84.99.91

### III. CONTEXTE CLINIQUE

#### A. Activités biologiques

Le peptide intestinal vasoactif (VIP) est un polypeptide linéaire contenant 28 résidus d'acides aminés. Son poids moléculaire est de 3381. Le VIP est structurellement apparenté à la sécrétine et à d'autres membres de la famille de la sécrétine. L'acide aminé de l'extrémité C-terminale du VIP (Asn) est un acide aminé amidé.

Les études immunocytochimiques ont montré que le VIP est présent dans les neurones dans tout le tractus gastro-intestinal, les systèmes nerveux central et périphérique, les glandes salivaires et le pancréas.

Le VIP stimule la sécrétion d'eau et de bicarbonate par le pancréas. Le VIP possède la capacité de relaxer les muscles lisses. L'administration du VIP produit la vasodilatation et la bronchodilatation pulmonaire et relaxe le sphincter œsophagien inférieur et le muscle lisse du fond de l'estomac.

Le VIP est réputé jouer un rôle déterminant dans la régulation de la motilité intestinale et dans le transport hydrique et ionique de l'épithélium intestinal.

#### B. Application clinique

Une augmentation des concentrations plasmatiques de VIP immunoréactif a été rapportée chez des patients atteints du syndrome de Verner-Morrison ou WDHA (diarrhée aqueuse avec hypokaliémie et achlorhydrie). Une hausse des niveaux de VIP plasmatique a également été rapportée chez des patients atteints de cirrhose.

#### IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le VIP est analysé par le dosage radio-immunologique compétitif à l'aide d'anticorps de conjugué VIP-albumine. Le VIP des standards et échantillons entre en concurrence avec le VIP marqué  $^{125}\text{I}$  dans la liaison aux anticorps. Le VIP marqué  $^{125}\text{I}$  se lie en proportion inverse à la concentration de VIP des standards et des échantillons. Une incubation séquentielle sera effectuée afin d'accroître la sensibilité du dosage. Le VIP  $^{125}\text{I}$  lié à l'anticorps est séparé de la fraction non liée par la technique de précipitation au polyéthylène glycol à double anticorps. La radioactivité des précipités est mesurée. L'antisérum utilisé dans ce kit est dirigé contre la partie C-terminale de la molécule de VIP.

#### V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Kit de 100 tests	Code couleur	Reconstitution
<b>[ANTISERUM]</b>			
Antisérum de lapin dirigé contre un VIP porcin hautement purifié conjugué à de l'albumine sérique bovine lyophilisé dans un tampon avec albumine sérique humaine, azoture de sodium et aprotinine.	1 flacon lyophilisé	Bleu	Ajouter 22 ml d'eau distillée
Ag   $^{125}\text{I}$	1 flacon 56 kBq	Rouge	Ajouter 12,5 ml d'eau distillée
Contient 1,5 $\mu\text{Ci}$ ou 56 kBq. Produit par l'iодation du VIP synthétique humain. Purifié par HPLC, mono-iodé. Activité spécifique : 1700-2100 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ (62-77 MBq/nmol). Lyophilisé dans un tampon de phosphate avec albumine sérique humaine, azoture de sodium, sérum de lapin et aprotinine.			
[Ab   PEG]	1 flacon 50 ml	Vert	Prêt à l'emploi
Antisérum de chèvre anti-Ig de lapin dilué dans un tampon phosphate avec albumine sérique humaine, $\text{NaN}_3$ et polyéthylène glycol 6000.			
[DIL   BUF]	1 flacon lyophilisé	Noir	Ajouter 10 ml d'eau distillée
Diluant Standard: plasma humain lyophilisé pour la dilution des standards de VIP. Contient de l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) et de l'azoture de sodium.			
CAL	1 flacon lyophilisé	Jaune	Reconstituer avec de l'eau distillée selon le volume indiqué sur l'étiquette du flacon
VIP synthétique humain. Lyophilisé dans du plasma humain. Contient de l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) et de l'azoture de sodium.			
[ASS   BUF]	1 flacon 5 ml	Noir	Prêt à l'emploi
Tampon à utiliser à la place de l'antisérum dans les contrôles à liaison non spécifique dans un tampon phosphate avec albumine sérique humaine, azoture de sodium et aprotinine (Trasylol® ou équivalent).			
[CONTROL   N]	2 flacons lyophilisés	Argent	Ajouter 1,5 ml d'eau distillée
Contrôle - N = 1 ou 2 Contient de l'azoture de sodium.(<0,1%).			

#### VI. MATÉRIEL NON FOURNI

1. Eau distillée
2. Tubes de polystyrène jetables de 11-13 x 55 mm.
3. Pipettes: 1 mL, 5 mL et 10 mL.
4. Pipettes à embouts jetables : 100, 200 et 500  $\mu\text{l}$
5. Agitateur vortex.
6. Centrifugeuse réfrigérée débit minimum 1700 x g.
7. Compteur de rayons gamma

#### VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. **Anti-VIP :** Reconstituer avec 22 ml d'eau distillée. Entreposer entre 2 et 8°C.
- B. **VIP  $^{125}\text{I}$  :** Reconstituer avec 12,5 ml d'eau distillée immédiatement avant emploi. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- C. **PEG double anticorps :** Prêt à l'emploi. Mélanger soigneusement avant emploi. Entreposer entre 2 et 8°C
- D. **Diluant calibrateur :** Reconstituer avec 10 ml d'eau distillée. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- E. **Calibrateur de VIP, 120 pmol/L :** Reconstituer avec de l'eau distillée selon le volume indiqué sur l'étiquette du flacon. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- F. **Tampon de dosage :** Prêt à l'emploi. Entreposer entre 2 et 8°C.
- G. **Contrôles :** Reconstituer avec 1,5 ml d'eau distillée. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

#### VIII. CONSERVATION ET DATES DE PÉREMPTION DES RÉACTIFS

Entreposer tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8°C avant reconstitution et emploi. L'eau utilisée pour la reconstitution des réactifs lyophilisés devra être distillée dans du matériel tout en verre ou être d'une pureté équivalente. Dissoudre le contenu dans un flacon en agitant doucement par renversement et éviter toute formation de mousse. La stabilité des réactifs figure sur l'étiquette des flacons. Pour ce qui est des réactifs lyophilisés, la date de péremption est valable à l'état non reconstitué. Les réactifs reconstitués sont stables pendant 10 semaines dans bonnes conditions d'entreposage.

#### IX. COLLECTE DE L'ÉCHANTILLON

Le sang est recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA et de l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) (5000 KIU aprotinine (Trasylol® ou équivalent) dans un Vacutainer de 10 ml). L'échantillon est immédiatement refroidi dans un bain de glace. Le plasma est séparé par centrifugation à +4°C. Le plasma doit être congelé dans l'heure qui suit et entreposé à une température de -18°C ou inférieure jusqu'au moment du dosage. Il faut éviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

#### X. PROCEDURE

##### A. Remarques concernant la manipulation

La précision est essentielle sur toutes les étapes du pipetage. Laisser les réactifs se stabiliser à température ambiante avant l'emploi. Le dosage est effectué en double (standards, contrôles, échantillons, tubes de contrôle pour liaison non spécifique et activité totale).

Un dosage complet comprend :

Standard: 7 concentrations: 0; 3,8; 7,5; 15,0; 30; 60 et 120 pmol/L

Contrôles: Contrôles avec des concentrations de VIP pour le contrôle qualité.

Échantillons.

Tubes pour la détermination de la liaison non spécifique pour les standards et échantillons (NSB-tubes).

Tubes pour la détermination de la radioactivité totale ajoutée (TOT-tubes).

##### B. Procédure

1. Reconstituer les réactifs conformément aux instructions.

2. Préparer les standards de travail de VIP en diluant le standard VIP de 120 pmol/L avec le diluant standard conformément aux indications suivantes:  
 a/ 1,00 ml de standard 120 pmol/L + 1,00 ml de diluant = 60 pmol/L.  
 b/ 1,00 ml de standard 60 pmol/L + 1,00 ml de diluant = 30 pmol/L.  
 c/ 1,00 ml de standard 30 pmol/L + 1,00 ml de diluant = 15 pmol/L.  
 d/ 1,00 ml de standard 15 pmol/L + 1,00 ml de diluant = 7,5 pmol/L.  
 e/ 1,00 ml de standard 7,5 pmol/L + 1,00 ml de diluant = 3,8 pmol/L  
 f/ Diluant standard = 0 pmol/L.

Entreposer les solutions standard à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

3. Pipeter 200 $\mu\text{l}$  des standards (0-120 pmol/l), échantillons et contrôles dans leurs tubes respectifs. Pipeter 200 $\mu\text{l}$  du standard d'étalonnage zéro dans les NSB-tubes.

4. Ajouter 200 $\mu\text{l}$  d'anti-VIP dans tous les tubes à l'exception des tubes NSB et TOT.

5. Pipeter 200 $\mu\text{l}$  de tampon d'immunodosage dans les tubes NSB.

6. Agiter au vortex et incuber pendant 24 heures à 2-8°C.

7. Ajouter 100 $\mu\text{l}$  de VIP125I dans tous les tubes. Les TOT-tubes sont hermétiquement fermés et mis de côté.

8. Agiter au vortex et incuber pendant 24 heures à 2-8°C.

9. Ajouter 500 $\mu\text{l}$  de PEG double anticorps à tous les tubes à l'exception des TOT-tubes (mélanger ce réactif avant de pipeter).

10. Agiter au vortex et incuber pendant 30-60 minutes à 2-8°C.

11. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4°C (1700 x g).

12. Décanter les surnageants immédiatement après la centrifugation.

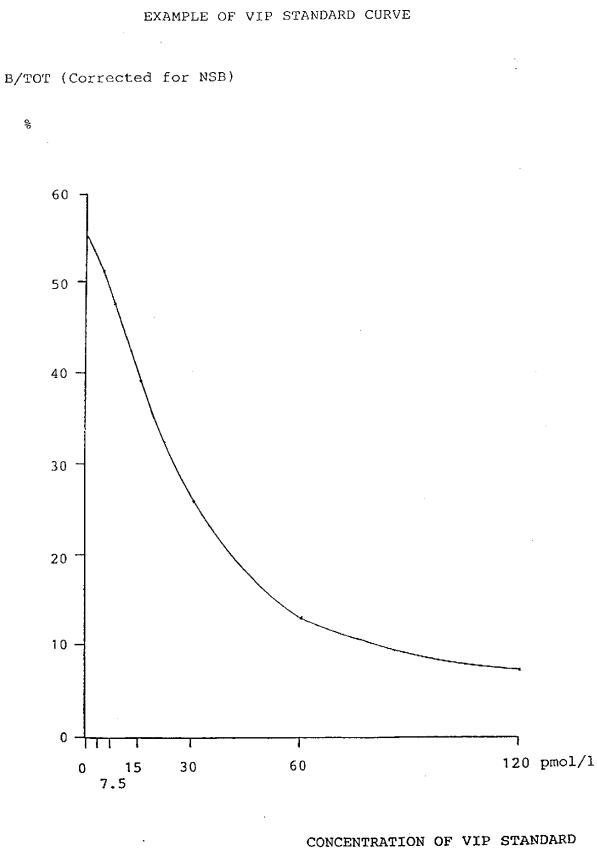
13. Compter la radioactivité des précipités dans un compteur de rayons gamma (temps de comptage : 2 minutes).

#### XI. CALCUL DES RÉSULTATS

1. Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes de liaison non spécifique du taux de comptage (CPM) des réplicats des tubes de standard, tubes contrôles et tubes d'échantillons.
2. Une courbe standard est produite en reportant le tracé du CPM précipité, fraction liée (en coups par minute ou % B/TOT) par rapport à la concentration des standards de VIP.
3. Pour obtenir les concentrations de VIP des échantillons et contrôles, lire les concentrations correspondantes par rapport à leurs CPM ou % B/TOT précipité à partir de la courbe standard générée.
4. La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons peuvent également être effectués par méthode informatique. Un algorithme de spline cubique peut être utilisé.

## XII. DONNÉES TYPES

Les données suivantes sont fournies uniquement à titre d'illustration et ne devront jamais être utilisées à la place de la courbe d'étalonnage en temps réel.



## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

### A. Sensibilité

La sensibilité calculée à partir d'une baisse de liaison de 2 écarts types du calibrateur zéro est de 3 pmol/l.

### B. Précision

**Variation intra-dosage :**

Niveau	Coefficient de variation
14,5 pmol/L	5,9
61,0 pmol/L	3,3

**Inter inter-dosages :**

Niveau	Coefficient de variation
12,6 pmol/L	7,7
26,4 pmol/L	6,7
51,4 pmol/L	6,1

### C. Spécificité

On a trouvé les réactions croisées suivantes :

Peptide	Réaction croisée
VIP 1-28 (séquence totale)	100%
VIP 1-6	2,5%
VIP 1-18	2,5%
VIP 1-22	2,5%
VIP 11-28	83,3%
VIP 7-28	90,9%
VIP 18-28	71,4%
Sécrétine porcine	0,01%
Peptide inhibiteur gastrique porcin	0,01%
Glucagon pancréatique porcin	0,01%
Entéroglucagon porcin	0,01%
Polypeptide pancréatique humain	0,01%
Substance P	0,01%
Somatostatine, ovine	0,01%

### D. Interférence

Les échantillons présentant une turbidité, une hémolyse, une hyperlipidémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.

## XIV. CONCENTRATION DE VIP DANS LE PLASMA HUMAIN

La concentration de VIP plasmatique après un jeûne de 12 heures a été dosée chez des sujets normaux. La plage était comprise entre <3 pmol/l et 30 pmol/l.

## XV. CONTROLE QUALITÉ INTERNE

Pour que le laboratoire puisse procéder à une surveillance complète de la performance constante du dosage immunoradiologique, certains facteurs importants doivent être vérifiés.

### 1. Les concentrations trouvées dans les tubes contrôles

Elles doivent être situées dans les limites indiquées sur les étiquettes des flacons.

### 2. Coups totaux

Les coups obtenus doivent correspondre environ aux CPM prévus une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu de VIP <sup>125</sup>I de ce kit donnera 29000-32000 CPM à la date de référence (efficacité du compteur = 80 %).

### 3. Liaison maximale (Bo/TOT)

Calculer pour chaque dosage le % de radioactivité liée dans le standard d'étalonnage zéro :

$$\frac{Bo}{TOT} \times 100$$

### 4. Liaison non spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque dosage le % de liaison non spécifique

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

### 5. Pente de la courbe standard

Par exemple, surveiller les points 80, 50 et 20% de la courbe standard pour la reproductibilité inter-séries.

## XVI. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI ET MISES EN GARDE

### Sécurité

La réglementation étant susceptible de varier d'un pays à l'autre, il est essentiel que la personne responsable du laboratoire soit complètement informée sur la réglementation locale relative aux genres et aux quantités de matières radioactives utilisées dans ce test.

Ce kit contient des composants d'origine humaine. Ils ont été testés et se sont révélés négatifs à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, aux anticorps du virus de l'hépatite C et aux anticorps anti-VIH1 et anti-VIH 2. Il n'en reste pas moins que toutes les précautions recommandées pour la manipulation des dérivés sanguins devront être observées.

Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie : 60 jours) émettant des radiations ionisantes X (28 keV) et γ (35,5 keV). Il sera indispensable de prendre des mesures assurant la bonne manipulation de la matière radioactive conformément à la réglementation locale et/ou nationale. L'accès aux réactifs sera exclusivement réservé au personnel autorisé.

Les précautions suivantes devront être prises lors de la manipulation des matières radioactives:

- Il sera nécessaire d'entreposer la matière radioactive dans des zones spécialement conçues à cet effet, et de manière générale, non accessibles au personnel non autorisé.

- La manipulation de la matière radioactive sera exclusivement effectuée dans les zones autorisées.

- Prendre soin d'éviter son ingestion et son contact avec la peau et les vêtements. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
- Il sera interdit de boire, manger ou fumer dans les endroits où la matière radioactive est utilisée.
- Les mains devront être protégées à l'aide de gants et lavées après l'utilisation de matières radioactives.
- Le travail devra être effectué sur une surface recouverte d'un tissu absorbant jetable.

- Les déversements de matière radioactive devront être immédiatement essuyés et tous les matériaux contaminés éliminés comme étant des déchets radioactifs. Les surfaces contaminées seront nettoyées à l'aide d'un détergent.

Les réactifs contenus dans ce kit contiennent de l'azoture de sodium. Leur contact avec les canalisations en cuivre ou en plomb est susceptible de provoquer l'accumulation de dépôts d'azoture hautement explosifs. Au moment de jeter les réactifs au tout-à-l'égout, toujours les faire évacuer avec de grandes quantités d'eau afin de prévenir la formation d'azotures métalliques. Les canalisations susceptibles d'avoir été contaminées avec ces dépôts explosifs devront être soigneusement rincées à l'aide d'une solution de 10% d'hydroxyde de sodium.

## XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Fahrenkrug, J. and Schffalitzky de Muckadell, O. Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma. *J. Lab Clin Med* 89:1379 (1977).
2. Lundberg, J.M., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., Martling, C.-R., Larsson, O., Tatsumoto, K. and Änggård, A. Coexistence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man. *Peptides* 5:593-606 (1984).
3. Fahrenkrug, J. Evidence for common precursors but differential processing of VIP and PHM in VIP-producing tumors. *Peptides* 6:357-361 (1985).
4. Bloom, S.R., and Polak, J.M. Vipomas. In: *Vasoactive intestinal peptide*. Editor: Said, S.I. Raven Press, New York, 457-468 (1982).
5. Bloom, S.R., Christofides, N.D., Delawarter, J., Buell, G., Kawashima, E. and Polak, J.M. Diarrhoea in VIPoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by a single coding gene. *Lancet* ii: 1163-1165 (1983).

## XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	Activité totale	NSB	Standards (0-6)	Contrôles	Échantillons				
Diluant standard	-	200 µl	-	-	-				
Calibrateur	-	-	200 µl	-	-				
Contrôles	-	-	-	200 µl	-				
Échantillons	-	-	-	-	200 µl				
Anti-VIP	-	-	200 µl						
Tampon de dosage	-	200 µl	-	-	-				
Agiter au vortex/mixer et incuber pendant 24 heures entre 2 et 8°C.									
Traceur <sup>125</sup> I	100 µl								
Agiter au vortex /mixer et incuber pendant 24 heures entre 2 et 8°C .									
PEG double anticorps	-	500 µl							
Agiter au vortex /mixer et incuber pendant 30 à 60 min entre 2 et 8°C.									
Centrifuger pendant 15 min ( 1700 g; 4°C )									
Décanter les surnageants et compter la radioactivité des précipités									



it

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

## VIP RIA

### I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* di polipeptidi intestinali vasoattivi (VIP) nel plasma umano.

Per uso professionale in laboratorio.

### II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome brevettato : DIAsource VIP RIA
- B. Numero di catalogo : RB311 : 100 test
- C. Fabbricato da : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:  
Tel: +32 (0) 10 84.99.11                          Fax: +32 (0) 10 84.99.91

### III. RETROSCENA CLINICO

#### A. Attività biologiche

Il peptide vasoattivo intestinale (VIP) è un polipeptide lineare contenente 28 residui di amminoacidi. Il peso molecolare è 3381. VIP è collegato strutturalmente alla secretina e ad altri membri della famiglia della secretina. L'amminoacido C-terminale di VIP (Asn) è amidato.

Gli studi immunoistochimici hanno dimostrato che VIP è presente nei neuroni lungo il tratto gastrointestinale, il sistema nervoso centrale e periferico, le ghiandole salivali e il pancreas.

VIP stimola la secrezione di acqua e bicarbonato da parte del pancreas. VIP ha la capacità di rilassare i muscoli lisci. La somministrazione di VIP produce vasodilatazione e bronco-dilatazione polmonare e rilassa lo sfintere esofageo inferiore e il muscolo liscio del fundus dello stomaco.

VIP è ritenuto responsabile di ruoli fondamentali nella regolarizzazione della motilità intestinale e per il trasporto intestinale epiteliale ionico e idrico.

#### B. Applicazione clinica

Nei pazienti con sindrome di Verner-Morrison (diarrea acquosa, ipokaliemia e acloridria) si sono registrate concentrazioni aumentate plasma VIP immunoreattivo. Anche nei pazienti con cirrosi sono stati registrati livelli aumentati di plasma di VIP.

#### IV. PRINCIPI DEL METODO

VIP è analizzato dal dosaggio radioimmunologico competitivo con anticorpi ad un coniugato VIP-albumina. VIP negli standard e campioni compete con VIP  $^{125}\text{I}$  nel legarsi agli anticorpi.  $^{125}\text{I}$ -VIP si lega in proporzione inversa alla concentrazione di VIP in standard e campioni. Per aumentare la sensibilità del test è stata eseguita un'incubazione sequenziale.  $^{125}\text{I}$ -VIP legato agli anticorpi viene separato dalla frazione non legata con la tecnica di precipitazione doppio anticorpo in glicole polietileno. Viene misurata la radioattività della precipitazione. L'antisiero usato in questo kit è diretto alla parte C-terminale della molecola VIP.

#### V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	Kit per 100 test	Codice colore	Ricostruzione
[ANTISERUM]			
Antisiero del coniglio contro VIP suino altamente purificato coniugato all'albumina del siero bovino in tampone fosfato con albumina di siero umano, azoturo di sodio e aprotinina.	1 fiala liofilizzato	Blu	<b>Aggiungere 22 ml di acqua distillata</b>
Ag $^{125}\text{I}$	1 fiala liofilizzato 56 kBq	Rosso	<b>Aggiungere 12,5 ml di acqua distillata</b>
Contiene 1.5 $\mu\text{Ci}$ o 56 kBq. Prodotto dalla iodinazione di VIP sintetico umano. Purificato con HPLC, monoiodinato. Attività specifica: 1700-2100 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ (62-77 Mbq/nmol). Tampone fosfato liofilizzato con albumina di siero umano, azoturo di sodio, siero di coniglio normale e aprotinina.			
[Ab   PEG]	1 fiala 50 mL	Verde	<b>Pronto all'uso</b>
Antisiero di capra anti-coniglio Ig in tampone fosfato con albumina di siero umano, Na3N. E glicole polietilene 6000.			
[DIL   BUF]	1 fiala liofilizzato	Nero	<b>Aggiungere 10 ml di acqua distillata</b>
Diluente standard : plasma umano liofilizzato per la diluizione degli standard VIP. Contiene aprotinina (Trasylol® o equivalente) e azoturo di sodio.			
[CAL]	1 fiala liofilizzato	Giallo	<b>Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala</b>
VIP umano sintetico. Liofilizzato in plasma umano. Contiene aprotinina (Trasylol® o equivalente) e azoturo di sodio.			
[ASS   BUF]	1 fiala 5 mL	Nero	<b>Pronto all'uso</b>
Tampone per l'uso invece dell'antisiero in controlli leganti non specifici nel tampone fosfato con albumina di siero umano, azotato di sodio e aprotinina (Trasylol® o equivalente).			
[CONTROL   N]	2 fiale liofilizzato	Argento	<b>Aggiungere 1.5 mL di acqua distillata</b>
Controlli - N = 1 o 2 Contiene azoturo di sodio.(<0.1%).			

#### VI. NON IN DOTAZIONE

1. Acqua distillata.
2. Tubetti usa e getta di polistirene 11-13 x 55 mm.
3. Pipette: 1 mL, 5 mL e 10 mL.
4. Pipette con punte usa e getta: 100, 200 e 500  $\mu\text{l}$ .
5. Agitatore a vortice.
6. Centrifuga, refrigerata, per almeno 1700 x g.
7. Contatore Gamma.

#### VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

- A. **Anti-VIP** : Ricostituire con 22 mL di acqua distillata. Conservare a 2-8°C.
- B.  **$^{125}\text{I}$ -VIP** : Ricostituire con 12.5 mL di acqua distillata appena prima dell'uso. Conservare a -18°C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- C. **Doppio anticorpo PEG** : Pronto all'uso. Miscelare accuratamente prima dell'uso. Conservare a 2-8°C.
- D. **Diluente calibratore** : Ricostituire con 10.0 mL di acqua distillata. Conservare a -18°C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- E. **VIP calibrator 120 pmol/L** : Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala. Conservare a -18°C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- F. **Tampone test** : Pronto all'uso. Conservare a 2-8°C.
- G. **Controlli** : Ricostituire con 1.5 mL di acqua distillata. Conservare a -18°C o a temperature inferiori se riutilizzato.

#### VIII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C prima della ricostituzione e dell'uso. L'acqua usata per la ricostituzione di agenti liofilizzati deve essere distillata in un apparato completamente in vetro o comunque deve garantire una purezza corrispondente. Sciogliere i contenuti in una fiala girandola delicatamente evitando la formazione di schiuma. La stabilità dei reagenti è riportata sull'etichetta delle fiale. Per i reagenti liofilizzati, la data di scadenza indicata si riferisce ai reagenti ricostituiti. I reagenti ricostituiti sono stabili per 10 settimane se conservati correttamente.

#### IX. RACCOLTA DI CAMPIONI

Il sangue raccolto nei tubi contenenti EDTA e aprotinina (Trasylol® o equivalente) (5000 KIU aprotinina (Trasylol® o equivalente) in un vacutainer da 10 mL). Il campione viene raffreddato immediatamente in un bagno di ghiaccio. Il plasma viene separato con una centrifugazione a +4°C. Il plasma deve essere surgelato entro 1 ora e conservato -18°C o a temperatura inferiore fino al test. Evitare di congelare e scongelare più volte.

#### X. PROCEDURA

##### A. Note sulla manipolazione

È essenziale eseguire il pipettaggio con precisione. I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. Il test è eseguito con duplicati (standard, controlli, campioni, tubi di controllo per legami non specifici e attività totale). Un test completo comprende:

Standard : 7 concentrazioni: 0, 3.8, 7.5, 15, 30, 60 e 120 pmol/L.

Controlli : Controlli con concentrazione nota di VIP per il controllo qualità.

Campioni.

Tubi per la determinazione del legame non specifico per standard e campioni (tubi NSB).

Tubi per la determinazione della radioattività totale aggiunta (tubi TOT).

##### B. Procedura

1. Ricostituire i reagenti secondo le istruzioni.
2. Preparare gli standard di lavoro VIP diluendo lo standard VIP 120 pmol/L con il diluente standard secondo il seguente schema:
  - a/ 1.00 mL standard 120 pmol/L + 1.00 mL diluente = 60 pmol/L.
  - b/ 1.00 mL standard 60 pmol/L + 1.00 mL diluente = 30 pmol/L.
  - c/ 1.00 mL standard 30 pmol/L + 1.00 mL diluente = 15 pmol/L.
  - d/ 1.00 mL standard 15 pmol/L + 1.00 mL diluente = 7.5 pmol/L.
  - e/ 1.00 mL standard 7.5 pmol/L + 1.00 mL diluente = 3.8 pmol/L.
  - f/ Diluente standard = 0 pmol/L.
3. Conservare le soluzioni standard a -18°C o a temperature più basse se riutilizzate.
4. Pipetta 200  $\mu\text{l}$  di standard (0-120 pmol/L), campioni e controlli nei rispettivi tubi. Pipetta 200  $\mu\text{l}$  dello standard zero nei tubi NSB.
5. Aggiungere 200  $\mu\text{l}$  di anti-VIP a tutti i tubi eccetto i tubi NSB e TOT.
6. Aggiungere 200  $\mu\text{l}$  di diluente del test ai tubi NSB.
7. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 24 ore a 2-8°C.
8. Aggiungere 100  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -VIP a tutti i tubi. I tubi TOT sono sigillati e tenuti da parte.
9. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 24 ore a 2-8°C.
10. Aggiungere 500  $\mu\text{l}$  di doppio anticorpo-PEG a tutti i tubi eccetto i tubi TOT (miscelare questo reagente prima del pipettaggio).
11. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 30-60 minuti a 2-8°C.
12. Centrifugare i tubi per 15 minuti a +4°C (1700 x g).
13. Decantare i surnatanti subito dopo la centrifugazione.
14. Misurare la radioattività dei precipitati in un contatore gamma (tempo di misurazione: 2 minuti).

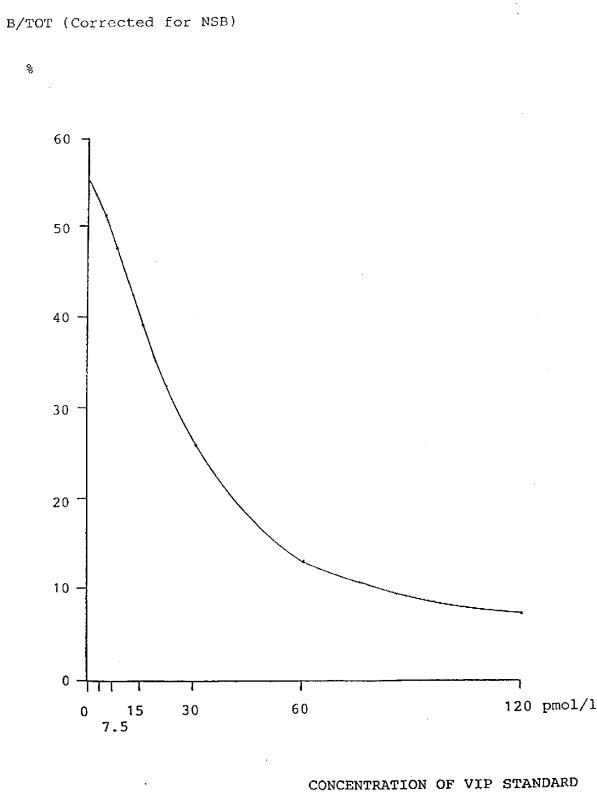
## XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Sottrarre il conteggio (CPM) medio del legante non specifico dal conteggio (CPM) dei replicati di standard, controlli e campioni.
- Una curva standard viene generata tracciando il CPM precipitato, la frazione legata (in CPM o %B/TOT) rispetto alla concentrazione di standard VIP.
- Per ottenere la concentrazione di VIP nei campioni e controlli, leggere la concentrazione corrispondente ai loro CPM o %B/TOT precipitati dalla curva standard generata.
- La curva standard generata e il calcolo della concentrazione nei campioni possono anche essere effettuati con un metodo computerizzato. Può essere usato il metodo spline.

## XII. DATI TIPICI

I seguenti dati hanno esclusivamente scopo dimostrativo e non devono mai essere utilizzati in luogo dell'effettiva curva di calibrazione temporale.

EXAMPLE OF VIP STANDARD CURVE



## XIII. ESECUZIONE E LIMITI

### A. Sensibilità

La sensibilità calcolata da una riduzione della legatura di 2 SD allo standard zero è 3 pmol/L.

### B. Precisione

#### Variazione all'interno del test:

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)
14.5 pmol/L	5.9
61.0 pmol/L	3.3

#### Variazione inter-test:

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)
12.6 pmol/L	7.7
26.4 pmol/L	6.7
51.4 pmol/L	6.1

## C. Specificità

Sono state trovate le seguenti reazioni incrociate:

Peptide	Reazione incrociata
VIP 1-28 (sequenza intera)	100.0%
VIP 1-6	<2.5%
VIP 1-18	<2.5%
VIP 1-22	<2.5%
VIP 11-28	83.3%
VIP 7-28	90.9%
VIP 18-28	71.4%
Secretina, suina	<0.01%
Peptide gastrico inibitorio, suina	<0.01%
Glucagone del pancreas, suina	<0.01%
Enteroglucagone, suino	<0.01%
Polipeptide pancreatico, umano	<0.01%
Sostanza P	<0.01%
Somatostatina, ovina	<0.01%

## D. Interferenza

Campioni con torbidità, emolisi, iperlipidemia o contenenti fibrina possono dare risultati imprecisi.

## XIV. CONCENTRAZIONE DI VIP NEL PLASMA UMANO

La concentrazione di VIP nel plasma dopo 12 ore di digiuno è stata testata in soggetti normali. L'intervallo è stato da <3 pmol/L a 30.0 pmol/L.

## XV. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Per consentire al laboratorio di monitorare completamente le prestazioni del test, occorre verificare i seguenti importanti fattori.

### 1. Concentrazioni di controlli riscontrate

La concentrazione di controlli rilevata deve essere compresa nell'intervallo dato sulle etichette delle fiale.

### 2. Conteggi totali

I conteggi ottenuti dovrebbero avvicinarsi al CPM atteso CPM quando vengono regolati per l'efficienza del contatore e il decadimento radioattivo. Il contenuto di  $^{125}\text{I}$ -VIP in questo kit darà 29000-32000 CPM nella data di riferimento (efficienza del conteggio: 80%).

### 3. Legame massimo (Bo/TOT)

Per ogni test, calcolare la % di radioattività legata nello standard zero:  
 $\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$

### 4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:  
 $\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$

Il legame non specifico deve essere inferiore a 7%.

### 5. Discesa della curva standard

Per esempio, monitorare i punti 80, 50 e 20% della curva standard per una riproducibilità interfase.

## XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

### Sicurezza

Dato che le norme potrebbero variare da Paese a Paese, è fondamentale che le persone responsabili del laboratorio acquisiscano dimestichezza con le norme locali in vigore relative a ogni aspetto dei materiali radioattivi del tipo e della quantità usati in questo test.

Questo kit contiene componenti di origine umana. Sono stati testati per antigeni superficiali epatite B, anticorpi a HCV e per gli anticorpi a HIV-1 e HIV-2 e riscontrati negativi. Ciononostante, vanno osservate tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

Questo kit contiene  $^{125}\text{I}$  (periodo di dimezzamento: 60 giorni), radiazioni emittenti ionizzanti X (28 keV) e  $\gamma$  (35.5 keV). Adottare misure volte a garantire la corretta manipolazione del materiale radioattivo secondo le norme locali e/o regionali. Soltanto il personale autorizzato deve avere accesso ai reagenti.

Rispettare le seguenti precauzioni quando si maneggiano materiali radioattivi:

- Il materiale radioattivo va conservato in aree appositamente predisposte, non solitamente accessibili a personale non autorizzato.

- Il materiale radioattivo va manipolato esclusivamente nelle aree autorizzate.

- Adottare le misure precauzionali necessarie per prevenire l'ingestione e il contatto con la pelle e l'abbigliamento. Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.

- Vietare di bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.

- Proteggere le mani con guanti e lavarle dopo aver usato materiali radioattivi.

- Il lavoro va eseguito su una superficie coperta con materiale assorbente usa e getta.

-Eventuali perdite di materiale radioattivo vanno rimosse immediatamente e tutti i materiali vanno smaltiti come rifiuti radioattivi. Le superfici contaminate vanno pulite con detergente.

I reagenti in questo kit contengono azoturo di sodio. Il contatto con tubi di scarico in rame o piombo potrebbe provocare l'accumulo di depositi di azoturo altamente esplosivi. Quando si gettano i reagenti nella rete fognaria, sciacquare sempre con abbondante acqua per prevenire la formazione di sali metallici. I tubi sospetti di contaminazione con questi depositi esplosivi vanno sciacquati abbondantemente con una soluzione al 10% di idrossido di sodio.

## XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Fahrenkrug, J. and Schffalitzky de Muckadell, O.  
Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma.  
*J. Lab Clin Med* 89:1379 (1977).
2. Lundberg, J.M., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., Martling, C.-R., Larsson, O.,  
Tatemoto, K. and Änggård, A.  
Coexistence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow  
and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man.  
*Peptides* 5:593-606 (1984).
3. Fahrenkrug, J.  
Evidence for common precursors but differential processing of VIP and  
PHM in VIP-producing tumors.  
*Peptides* 6:357-361 (1985).
4. Bloom, S.R., and Polak, J.M. Vipomas.  
In: *Vasoactive intestinal peptide*. Editor: Said, S.I.  
Raven Press, New York, 457-468 (1982).
5. Bloom, S.R., Christofides, N.D., Delawarter, J., Buell, G., Kawashima, E.  
and Polak, J.M.  
Diarrhoea in VIPoma patients associated with cosecretion of a second active  
peptide (peptide histidine isoleucine) explained by a single coding  
gene. *Lancet* ii: 1163-1165 (1983).

## XVIII. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	Conteggio totale	NSB	Calibratore (0-6)	Controlli	Campioni				
Diluente standard	-	200 µl	-	-	-				
Calibratore	-	-	200 µl	-	-				
Controlli	-	-	-	200 µl	-				
Campioni	-	-	-	-	200 µl				
Anti-VIP	-	-	200 µl						
Diluente del test	-	200 µl	-	-	-				
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 24 ore a 2-8°C.									
Tracciatore <sup>125</sup> I	100 µl								
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 24 ore a 2-8°C.									
Doppio anticorpo PEG	-	500 µl							
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 30-60 min a 2-8°C.									
Centrifugare 15 min ( 1700 g; 4°C )									
Decantare e misurare la radioattività del precipitato									



es

Lea todo el protocolo antes de usar.

## VIP RIA

### I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa *in vitro* de polipéptido intestinal vasoactivo (VIP, en inglés) en plasma humano.

Para uso profesional en un laboratorio.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial: DIAsource VIP RIA
- B. Número de catálogo: RB311: 100 pruebas
- C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

### III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

#### A. Actividades biológicas

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un polipéptido lineal que contiene 28 residuos de aminoácidos. El peso molecular es de 3381. El VIP está estructuralmente relacionado con la secretina y con otros miembros de la familia de la secretina. El aminoácido carboxiterminal del VIP (Asn) está amidado.

Los estudios inmunocitoquímicos han demostrado que el VIP está presente en las neuronas de todo el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y periférico, las glándulas salivales y el páncreas.

El VIP estimula la secreción de agua y bicarbonato por parte del páncreas. El VIP posee la capacidad de relajar el músculo liso. La administración del VIP produce vasodilatación y broncodilatación pulmonar y relaja el esfínter esofágico inferior y el músculo liso del fondo del estómago.

Se cree que el VIP desempeña un papel crucial en la regulación de la motilidad intestinal y el transporte epitelial de iones y agua.

#### B. Aplicación clínica

Se ha informado de un aumento de las concentraciones plasmáticas de VIP inmunorreactivo en pacientes con el síndrome WDHA (agua, diarrea, hipopotasemia y aclorhidria). Además, se ha observado un aumento de los niveles plasmáticos del VIP en pacientes con cirrosis.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El VIP se analiza mediante un radioinmunoanálisis competitivo que utiliza anticuerpos contra un conjugado VIP-albúmina. El VIP en los estándares y las muestras compite con el VIP 125I en la unión a los anticuerpos. El VIP 125I se une en proporción inversa a la concentración de VIP en los estándares y las muestras. Para aumentar la sensibilidad del ensayo se realiza una incubación secuencial. El VIP 125I unido a anticuerpos se separa de la fracción no unida mediante la técnica de precipitación con polietilenglicol de doble anticuerpo. Se mide la radiactividad de los precipitados. El antisero utilizado en este kit está dirigido a la parte C-terminal de la molécula VIP.

#### V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 100 pruebas	Código de color	Reconstitución
<b>[ANTISERUM]</b>			
Antisuero de conejo criado contra VIP porcino altamente purificado y conjugado con albúmina de suero bovino en tampón fosfato con albúmina de suero humano, azida sódica y aprotinina.	1 vial liofilizados	Azul	Añadir 22 ml de agua destilada
<b>Ag   125I</b>  Contiene 1,5 µCi o 56 kBq. Producido por yodación de VIP sintético, humano. Purificado por HPLC, monoiodado. Actividad específica: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 Mbq/nmol). Tampón fosfato liofilizado con albúmina de suero humano, azida sódica, suero de conejo normal y aprotinina.	1 vial liofilizado 56 kBq	Rojo	Añadir 12,5 ml de agua destilada
<b>[Ab   PEG]</b>  Antisuero anti-conejo-Ig de cabra en tampón fosfato con albúmina de suero humano, NaN3, y polietilenglicol 6000.	1 vial 50 ml	Verde	Listo para usar
<b>[DIL   BUF]</b>  Diluyente estándar: plasma humano liofilizado para la dilución de los estándares VIP. Contiene aprotinina (Trasylol® o equivalente) y azida sódica.	1 vial liofilizados	Negro	Añadir 10 ml de agua destilada
<b>[CAL]</b>  VIP humano sintético. Liofilizado en plasma humano. Contiene aprotinina (Trasylol® o equivalente) y azida sódica.	1 vial liofilizados	Amarillo	Reconstituir con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial
<b>[ASS   BUF]</b>  Tampón para utilizar en lugar del antisero en los controles de unión inespecífica en tampón fosfato con albúmina de suero humano, azida sódica y aprotinina (Trasylol® o equivalente).	1 vial 5 ml	Negro	Listo para usar
<b>[CONTROL   N]</b>  Controles - N = 1 o 2 Contiene azida sódica (<0.1%).	2 viales liofilizados	Plata	Añadir 1,5 ml de agua destilada

#### VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

- Agua destilada
- Tubos desechables de poliestireno de 11-13 x 55 mm.
- Pipetas: 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Pipetas con puntas desechables: 100, 200 y 500 µl.
- Agitador tipo vórtex.
- Centrifuga, refrigerada, dando un mínimo de 1700 x g.
- Contador gamma

#### VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- anti-VIP:** Reconstituya con 22 ml de agua destilada. Almacene entre 2-8 °C
- VIP 125I:** Reconstituya con 12,5 ml de agua destilada inmediatamente antes de su uso. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.
- PEG de doble anticuerpo:** Lista para usar. Mezcle bien antes de usar. Almacene entre 2-8 °C
- Diluyente del calibrador:** Reconstituya con 10 ml de agua destilada. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.
- Calibrador VIP 120 pmol/l:** Reconstituya con agua destilada, según el volumen indicado en la etiqueta del vial. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.
- Tampón de ensayo:** Listo para usar. Almacene entre 2-8 °C
- Controles:** Reconstituya con 1,5 ml de agua destilada. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.

#### VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene todos los reactivos a 2-8 °C antes de su reconstitución y uso. El agua utilizada para la reconstitución de los reactivos liofilizados debe ser destilada en un aparato de vidrio o tener la pureza correspondiente. Disuelva el contenido en un vial por inversión suave y evite la formación de espuma. La estabilidad de los reactivos se encuentra en la etiqueta de los viales. Para los reactivos liofilizados la fecha de caducidad es válida para los reactivos reconstituidos. Los reactivos reconstituidos son estables durante 10 semanas almacenados correctamente.

#### IX. RECOGIDA DE MUESTRAS

La sangre se recoge en tubos con EDTA y aprotinina (Trasylol® o equivalente) (5000 KIU de aprotinina (Trasylol® o equivalente) en un vacutainer de 10 ml). La muestra se enfriará inmediatamente en un baño de hielo. El plasma se separa por centrifugación a +4 °C. El plasma debe congelarse antes de 1 hora y almacenarse a -18 °C o menos hasta su análisis. Se debe evitar congelar y descongelar.

#### X. PROCEDIMIENTO

##### A. Notas sobre la manipulación

La precisión en todos los pasos del pipeteado es esencial. Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar. El ensayo se realiza con duplicados (estándares, controles, muestras, tubos de control para la unión no específica y la actividad total).

Un ensayo completo incluye:

Estándar: 7 concentraciones: 0, 3,8, 7,5, 15, 30, 60 y 120 pmol/l  
Controles: Controles con concentraciones conocidas de VIP para el control de calidad.

Muestras.

Tubos para la determinación de la unión no específica para estándares y muestras (tubos NSB).

Tubos para la determinación de la radiactividad total añadida (tubos TOT).

##### B. Procedimiento

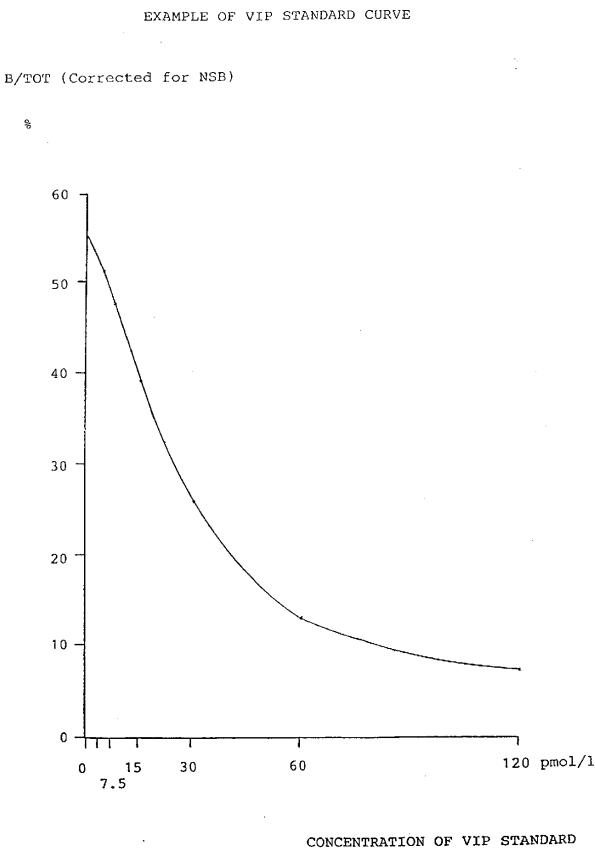
- Reconstituya los reactivos según las instrucciones.
- Prepare los estándares de trabajo VIP mediante la dilución del estándar VIP 120 pmol/l con el diluyente estándar de acuerdo con lo siguiente:  
 a/ 1,00 ml de estándar 120 pmol/l + 1,00 ml de diluyente = 60 pmol/l.  
 b/ 1,00 ml de estándar 60 pmol/l + 1,00 ml de diluyente = 30 pmol/l.  
 c/ 1,00 ml de estándar 30 pmol/l + 1,00 ml de diluyente = 15 pmol/l.  
 d/ 1,00 ml de estándar 15 pmol/l + 1,00 ml de diluyente = 7,5 pmol/l.  
 e/ 1,00 ml de estándar 7,5 pmol/l + 1,00 ml de diluyente = 3,8 pmol/l.  
 f/ Diluyente estándar = 0 pmol/l.  
 Almacene las soluciones patrón a -18 °C o menos si se reutilizan.
- Pipete 200 µl de estándares (0-120 pmol/l), muestras y controles en sus respectivos tubos. Pipete 200 µl del estándar cero en los tubos NSB.
- Añade 200 µl de anti-VIP a todos los tubos, excepto a los de NSB y TOT.
- Añade 200 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB.
- Mezcle en el vórtex e incube durante 24 horas a 2-8 °C.
- Añade 100 µl de VIP 125I en todos los tubos. Los tubos TOT se sellan y se almacenan.
- Mezcle en el vórtex e incube durante 24 horas a 2-8 °C.
- Añada 500 µl de doble anticuerpo-PEG a todos los tubos excepto a los tubos TOT (mezclar este reactivo antes de pipetear).
- Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.
- Centrifugar los tubos durante 15 minutos a +4 °C (1700 x g).
- Decante los sobrenadantes inmediatamente después de la centrifugación.
- Mida la radiactividad de los precipitados en un contador gamma (tiempo de conteo: 2 minutos).

## XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Reste la tasa de recuento media (CPM) de la unión no específica de la tasa de recuento (CPM) de las réplicas de estándares, controles y muestras.
- Se genera una curva estándar trazando el CPM precipitado, la fracción ligada (en CPM o %B/TOT) contra las concentraciones de los estándares VIP.
- Para obtener las concentraciones de VIP en las muestras y los controles, lea las concentraciones correspondientes a su CPM precipitado o %B/TOT a partir de la curva estándar generada.
- La curva estándar y el cálculo de las concentraciones en las muestras también pueden realizarse mediante un método informático. Se puede utilizar un método spline.

## XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.



## XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

### A. Sensibilidad

La sensibilidad calculada a partir de una disminución de la unión de 2 SD en el zerostándar es de 3 pmol/l.

### B. Precisión

#### Variación intraensayo:

Nivel	Coeficiente de variación (% CV)
14,5 pmol/l	5,9
61,0 pmol/l	3,3

#### Variación interensayo:

Nivel	Coeficiente de variación (% CV)
12,6 pmol/l	7,7
26,4 pmol/l	6,7
51,4 pmol/l	6,1

### B. Especificidad

Se han encontrado las siguientes reacciones cruzadas:

Péptido	Reactividad cruzada
VIP 1-28 (secuencia completa)	100,0 %
VIP 1-6	< 2,5 %
VIP 1-18	< 2,5 %
VIP 1-22	< 2,5 %
VIP 11-28	83,3 %
VIP 7-28	90,9 %
VIP 18-28	71,4 %
Secretina, porcina	< 0,01 %
Péptido inhibidor gástrico, porcino	< 0,01 %
Glucagón pancreático, porcino	< 0,01 %
Enteroglucagón porcino	< 0,01 %
Polipéptido pancreático, humano	< 0,01 %
Sustancia P	< 0,01 %
Somatostatina, ovino	< 0,01 %

### D. Interferencia

Las muestras que presenten turbidez, hemólisis, hiperlipemia o que contengan fibrina pueden dar resultados inexactos.

## XIV. CONCENTRACIÓN DE VIP EN EL PLASMA HUMANO

Se analizó la concentración de VIP en plasma tras 12 horas de ayuno en sujetos normales. El rango fue de <3 pmol/l a 30,0 pmol/l

## XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para que el laboratorio pueda controlar completamente el rendimiento constante del ensayo, deben comprobarse los siguientes factores importantes.

### 1. Las concentraciones encontradas en los controles

Las concentraciones encontradas en los controles deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas de los viales.

### 2. Recuento total

Los recuentos obtenidos deben aproximarse a los CPM previstos cuando se ajustan a la eficacia del contador y a la desintegración radiactiva. El contenido de VIP 125I en este kit dará 29000-32000 CPM en la fecha de referencia (eficiencia de conteo: 80 %).

### 3. Máxima vinculación (Bo/TOT)

Calcular para cada ensayo el % de radiactividad ligada en el estándar cero:  
 $\frac{Bo}{TOT} \times 100$

### 4. Unión no específica (NSB/TOT)

Calcular para cada ensayo el % de unión no específica:  
 $\frac{NSB}{TOT} \times 100$

La unión no específica debe ser inferior al 7%.

### 5. Pendiente de la curva estándar

Por ejemplo, controle los puntos 80, 50 y 20% de la curva estándar para comprobar la reproducibilidad entre series.

## XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Dado que la normativa puede variar de un país a otro, es esencial que la persona responsable del laboratorio esté familiarizada con la normativa local vigente, relativa a todos los aspectos de los materiales radiactivos del tipo y la cantidad utilizados en esta prueba.

Este kit contiene material de origen humano o animal. Se les ha hecho la prueba del antígeno de superficie de la hepatitis B, de los anticuerpos contra el VHC y de los anticuerpos contra el VIH-1 y el VIH-2 y han resultado negativos. No obstante, deben observarse todas las precauciones recomendadas para la manipulación de derivados de la sangre.

Este kit contiene I<sup>125</sup> (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV). Deben tomarse medidas para garantizar la correcta manipulación del material radiactivo, de acuerdo con la normativa local o nacional. Solo el personal autorizado debe tener acceso a los reactivos.

Al manipular materiales radiactivos deben observarse las siguientes precauciones:

- El material radiactivo debe almacenarse en áreas especialmente designadas, no accesibles normalmente al personal no autorizado.
- La manipulación de material radiactivo debe realizarse únicamente en zonas autorizadas.
- Se debe tener cuidado para evitar la ingestión y el contacto con la piel y la ropa. No pipeteé soluciones radiactivas por vía oral.
- Se debe prohibir beber, comer o fumar en los lugares donde se utiliza material radiactivo.

- Las manos deben protegerse con guantes y lavarse después de utilizar materiales radiactivos.
- El trabajo debe realizarse sobre una superficie cubierta por material absorbente desechable.
- Los derrames de material radiactivo deben ser retirados inmediatamente, y todos los materiales contaminados deben ser eliminados como residuos radiactivos. Las superficies contaminadas deben limpiarse con un detergente.
- Los reactivos de este kit contienen azida sódica. El contacto con tubos de desagüe de cobre o plomo puede dar lugar a la formación acumulada de depósitos de azida altamente explosivos. Al desechar los reactivos en el alcantarillado, se debe lavar siempre con abundante agua, lo que evita la formación de azida metálica. Las tuberías que se sospeche que están contaminadas con estos depósitos explosivos deben enjuagarse a fondo con una solución de hidróxido de sodio al 10%.

## XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. Fahrenkrug, J. y Schffalitzky de Muckadell, O. Radioinmunoanálisis del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) en plasma. *J. Lab Clin Med* 89:1379 (1977).
2. Lundberg, J.M., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., Martling, C.-R., Larsson, O., Tatemoto, K. y Ånggård, A. Coexistencia del péptido HI (PHI) y del VIP en los nervios que regulan el flujo sanguíneo y el tono del músculo liso bronquial en varios mamíferos, incluido el hombre. *Péptidos* 5:593-606 (1984).
3. Fahrenkrug, J. Evidencia de precursores comunes pero procesamiento diferencial de VIP y PHM en tumores productores de VIP. *Péptidos* 6:357-361 (1985).
4. Bloom, S.R., y Polak, J.M. Vipomas. In: *Péptido intestinal vasoactivo*. Editor: Said, S.I. Raven Press, New York, 457-468 (1982).
5. Bloom, S.R., Christofides, N.D., Delawarter, J., Buell, G., Kawashima, E. y Polak, J.M. Diarrea en pacientes con VIPoma asociada a la cosecreción de un segundo péptido activo (péptido histidina isoleucina) explicada por un único gen de alojamiento. *Lancet*. 1163-1165 (1983).

## XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibrador (0-6)	Controles	Muestras				
Diluyente estándar	-	200 µl	-	-	-				
Calibrador	-	-	200 µl	-	-				
Controles	-	-	-	200 µl	-				
Muestras	-	-	-	-	200 µl				
anti-VIP	-	-	200 µl						
Diluyente de ensayo	-	200 µl	-	-	-				
Mezcle en el vórtex e incube durante 24 horas a 2-8 °C.									
Trazador <sup>125I</sup>	100 µl								
Mezcle en el vórtex e incube durante 24 horas a 2-8 °C.									
Doble anticuerpo PEG	-	500 µl							
Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.									
Centrifugar 15 min. (1700 g; 4°C)									
Decantar y contar la radiactividad de los precipitados									

Otras traducciones de estas instrucciones de uso disponibles para su descarga en nuestra página web:

<https://www.diasource-diagnostics.com/>