



Somatostatin - RIA

RB306RUO

Version : 240215

Date of issue : 15/02/2024

Revision date: 15/02/2024

History

Summary of change:

Current Version:	New Version:
230123	240215
-	<p>XV PRECAUTIONS AND WARNINGS</p> <p>This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (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:</p>
<i>V. REAGENTS PROVIDED</i> Contains color code	<i>V. REAGENTS PROVIDED</i> color code removed

en

Read entire protocol before use.

Somatostatin RIA

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of Somatostatin in human plasma.
For Research use only. Not for use in diagnostic procedures.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource Somatostatin RIA
- B. Catalog number : RB306RUO : 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. PRINCIPLES OF THE METHOD

Somatostatin in plasma is extracted with Sep-pak C18 cartridges. The extracts are analysed by a competitive radioimmunoassay using an antiserum to synthetic cyclic somatostatin 14. Somatostatin in standards and samples compete with ^{125}I -labelled somatostatin in binding to the antibodies. ^{125}I -Tyr1-somatostatin binds in a reverse proportion to the concentration of somatostatin in standards and samples. Antibody-bound ^{125}I -Tyr1-somatostatin is separated from the unbound fraction using the double antibody solid phase precipitation technique. The radioactivity of the precipitates is measured.

The result shall not be used for clinical diagnosis or patient management.

IV. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Reconstitution
[ANTISERUM]		
Rabbit antiserum to synthetic cyclic somatostatin : the immunogen was cyclic somatostatin conjugated to bovine thyroglobuline, in phosphate buffer with sodium azide, human serum albumin, disodium salt and aprotinin.	1 vial lyophilised	Add 22 ml distilled water
Ag ^{125}I	1 vial lyophilised 28 kBq	Add 25 ml distilled water
[DASP]	1 vial 11 mL	Ready for use
Double antibody-PEG : goat anti-rabbit-IG antiserum in phosphate buffer with human serum albumin, EDTA disodium salt, NaCl, NaN ₃ and Tween 80.		
[ASS BUF]	1 vial 50 mL	Ready for use
Diluent : Phosphate buffer containing human serum albumin, EDTA disodium salt, sodium azide, Tween 80 and aprotinin. To be used for the preparation of somatostatin standards, reconstitution of sample extracts and instead of antiserum in non-specific binding controls.		
[CAL]	1 vial lyophilised	Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label
Somatostatin standard in phosphate buffer containing human serum albumin, EDTA disodium salt, sodium azide (<0.1%) and aprotinin.		
[CONTROL N]	2 vials lyophilised	Add 1 mL distilled water
Controls - N = 1 or 2 Contains sodium azide.(<0.1%).		

V. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water.
2. Methanol, pro analysis.
3. Hydrochloric acid, 1 M.
4. Acetic acid, pro analysis.
5. 11-13 x 55 mm disposable test tubes (polystyrene).
6. Pipettes with disposable tips: 100, 200, 400 and 1000 μL .
7. Pipettes: 1 mL, 5 mL.
8. Vortex mixer.
9. Speedvac evaporator or freeze drier (for evaporation of methanol).
10. Centrifuge, refrigerated, giving a minimum of 1700 x g.
11. Gamma counter.
12. Sep-pak C18 cartridges.

VI. REAGENT PREPARATION

- A. **Anti-Somatostatin** : Reconstitute with 22 mL of distilled water. Store at 2-8° C.
- B. **^{125}I -somatostatin** : Reconstitute with 25 mL of distilled water. Store at -18° C or lower if reused.
- C. **Double antibody solid phase** : Ready for use. Mix continuously during pipetting of this reagent. Store at 2-8° C.
- D. **Assay diluent** : Ready for use. Store at 2-8° C.
- E. **Somatostatin standard** : Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. Store at -18° C or lower if reused.
- F. **Controls** : Reconstitute with 1 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.

VII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of the 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 un-reconstituted reagents. Reconstituted reagents are stable for 10 weeks or until the expiry date is reached when stored according to the instructions.

VIII. SPECIMEN COLLECTION

Blood is collected in 10 mL test tubes containing EDTA and aprotinin 5000 KIU/mL (Trasylol® or equivalent). The sample is cooled in an ice-bath immediately. Plasma is separated by centrifugation at +4° C. The plasma should be frozen within 30 minutes and stored at -20° C or lower until assayed. Store no longer than 3 to 4 weeks. For longer time store at -70° C. Repeated freezing and thawing must be avoided!!!

IX. PROCEDURE

I. Extraction of plasma samples

The described extraction procedure is based on the use of Sep-pak® C18 cartridges available from Millipore. The procedure has been tested with Sep-pak C18 cartridge, product no. WAT 020515.

It is important that the recovery is controlled under the user's own experimental conditions.

1. Thaw the samples immediately before starting the extraction. Store at 2-8° C until adding 1 M HCl.
2. Add 100 μl 1M HCl per mL of sample e.g. 500 μl 1M HCl to 5.0 mL sample. Vortex mix carefully.
3. The Sep-pak cartridge is wetted with 5 mL methanol.
4. Wash the Sep-pak cartridge with 20 mL distilled water.
5. Apply 1.00 mL plasma sample (to which has been added 0.1 mL 1M HCl per mL) on the Sep-pak cartridge. The flowrate should not exceed 1 mL/10 seconds.
6. Wash with 20 mL 4% acetic acid in distilled water.
7. Elute the somatostatin with 2.0 mL methanol. The flowrate should not exceed 1 mL/10 seconds.
Collect the eluate in a 10 mL glass tube.
8. Evaporate to dryness in a Speed vac evaporator.
9. Dissolve the extracted somatostatin in 1.00 mL assay diluent. Vortex mix and allow the sample to stay for 30 minutes before assay with the radioimmunoassay procedure.

RECOVERY CONTROLS

For the determination of the recovery in the extraction procedure prepare controls as follows:

To 800 μL blood donor EDTA-plasma, to which previously has been added 0.1 mL 1M HCl per mL plasma, add exactly 200 μl of the somatostatin standard 250 pmol/L. The concentration will be 50 pmol/L. Extract the control according to the procedure described for samples.

To another 800 μL volume of the same blood donor plasma (with 0.1 mL 1M HCl per mL plasma) add 200 μl of assay diluent. Extract the control according to the procedure described for samples. Control is used for correction for endogenous somatostatin in the calculation of the recovery of added somatostatin.

II. Radioimmunoassay of extracts

1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the somatostatin working standards by dilution of the 250 pmol/L standard with the assay diluent according to the following:
a/ 1.00 mL standard 250 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 125 pmol/L
b/ 1.00 mL standard 125 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 62.5 pmol/L

c/ 1.00 mL standard 62.5 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 31.3 pmol/L
d/ 1.00 mL standard 31.3 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 15.6 pmol/L
e/ 1.00 mL standard 15.6 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 7.8 pmol/L
f/ 1.00 mL standard 7.8 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 3.9 pmol/L
g/ Assay diluent = 0 pmol/L

Store the standard solutions a-g and 250 pmol/L standard at -18° C or lower if reused.

3. Pipette 100 µL of standards a-g, controls and reconstituted sample extracts and reconstituted control extracts in their respective tubes (duplicates). Pipette 100 µL of the zero-standard (assay diluent) in the NSB-tubes (duplicates).
4. Add 200 µL anti-somatostatin to all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
5. Add 200 µL assay diluent to the NSB-tubes.
6. Vortex mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
7. Add 200 µL ¹²⁵I-somatostatin to all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
8. Vortex mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
9. Add 100 µL double antibody, solid phase to all tubes except the TOT-tubes (stir continuously during pipetting).
10. Vortex mix and incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
11. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4° C (1700 x g).
12. Decant the supernatant immediately after centrifugation.
13. Count the radioactivity of the pellets in a gamma counter (counting time 2-4 min).

XI. CALCULATION OF RESULTS

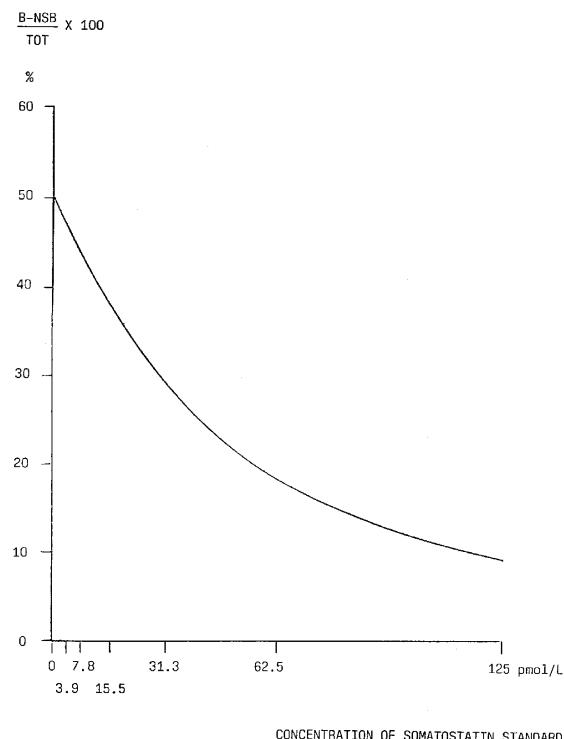
1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding from the count rate (CPM) of the replicates of standards, controls and samples.
2. A standard curve is generated by plotting the precipitated CPM, bound fraction (in CPM or %B/TOT) against the concentrations of the Somatostatin standards.
3. Interpolate the Somatostatin concentrations of the samples and controls from the generated standard curve.
4. Calculate the recovery of somatostatin in the recovery controls.
% recovered somatostatin =

$$\frac{(\text{Mean conc. of control a} - \text{Mean conc. of control b}) \times 100}{50} (= \text{added concentration})$$

5. Correct the sample concentrations for the % recovery.
Correct the sample concentrations for the increase of volume when adding 1M HCl. Multiply with a factor of 1.10.
6. 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

EXAMPLE OF SOMATOSTATIN STANDARD CURVE



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

- A. **Sensitivity**
The sensitivity calculated from a decrease in binding of 2 SD in the zero standard is 6 pmol/L.
- B. **Recovery**
The mean recovery in the extraction procedure is 79 ± 10% (obtained in this laboratory).
- C. **Precision**

Intra assay variation:

Level	Coefficient of variation (%CV)	N
16.4 pmol/L	8.3	20
57.3 pmol/L	2.8	20

Total variation (Inter assay):

Level	Coefficient of variation (%CV)	N
17.3 pmol/L	6.4	7
57.7 pmol/L	3.3	7

D. Specificity

The following cross reactions have been found:

Polypeptide	Cross reaction
Somatostatin, cyclic	100.0%
Tyr ¹ -somatostatin	100%
Linear somatostatin	50%
Tyr ¹¹ -somatostatin	38%
Des-ala-gly-somatostatin	25%

D. Interference

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

XIV. SOMATOSTATIN CONCENTRATION IN HUMAN PLASMA

The somatostatin concentration in normal fasting subjects assayed with these reagents was <16 pmol/L.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

In order for the laboratory to completely monitor the consistent performance of the radioimmunoassay there are some important factors which must be checked.

1. Controls

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

2. Recovery control

The recovery should be at least 60% for a valid assay. It is important that the recovery is controlled under the user's own experimental conditions. The recovery obtained at the product development laboratory was $79 \pm 10\%$.

3. Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of ^{125}I -Tyr1-somatostatin in this kit will give a total counts in the assay (TOT) of 10500 CPM (+ 20%, -5%) at the activity reference date (counter efficiency = 80%).

4. Maximum binding (Bo/TOT)

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-standard:

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

TOT

5. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

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

TOT

The non-specific binding should be less than 6%.

5. Shape 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

For research use only.

As the regulations may vary from one country to another, it is essential that the person responsible for the laboratory is 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 by immunoassay 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}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (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 drainpipes 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. Peeters, Theo L., Depraetere, Y. and Van Trappen, R. Simple extraction method and radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. *Clin Chem* 27:888 (1981).
2. Berg, J., Nilsson, K., Ekman, R. and Giovanella, B. Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell carcinomas of the lung. *Acta Path Microbiol et Immunologica Scand* 93A:133-147, 1985.
3. Widerlöv, E., Walleus, H., Lindström, L.H., Karlsson, I., Nemerooff, C.B., Rehfeld, J.F. and Ekman, R. Neuropeptide alterations in cerebrospinal fluid and plasma from psychiatric patients. Proceedings of the IV world congress of biological psychiatry Philadelphia 1985.
4. Eds.: Shagass et al. Elsevier. New York (1986), pp 856-858.
5. Somatostatin
Wass, J.A.H.
In *Endocrinology* volume no. 1, pp 152-166.
Editor: De Groot, Leslie J.
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989.
6. Penman, E., Wass, J.A.H., Lund, A. et al. Development and validation of the specific radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. *Ann Clin Biochem* 16:15-25, 1979.
7. Saito, H., Ogawa, T., Ischimaru, K., et al. Plasma somatostatin in normal and diseased states. Program of the VIth International congress of endocrinology, Melbourne, 1980. Abst. 75.
- Arimura, A., Lundqvist, G., Rothman, J. et al. Radioimmunoassay of somatostatin. *Metabolism* 27 (Suppl 1):1139-1144, 1978.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrator	-	-	100 μl	-	-
Controls	-	-	-	100 μl	-
Samples	-	-	-	-	100 μl
Anti-somatostatin	-	-			200 μl
Assay diluent	-	300 μl	-	-	-
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
^{125}I Tracer					200 μl
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
Double antibody solid phase	-			100 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 pellets					

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

it

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

Somatostatin RIA

I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* di somatostatina nel plasma umano.
Solo per uso nella ricerca. Non utilizzare in procedure diagnostiche.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. **Nome brevettato :** DIAsource Somatostatin RIA
- B. **Numero di catalogo :** RB306RUO : 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. PRINCIPI DEL METODO

La somatostatina nel plasma viene estratta con cartucce Sep-pak C18. Gli estratti sono analizzati con un dosaggio radioimmunologico competitivo impiegando un antisiero alla somatostatina 14 ciclica sintetica 14. La somatostatina in standard e campioni compete con la somatostatina ^{125}I nel legarsi agli anticorpi. ^{125}I -Tyr1-somatostatina si lega in proporzione inversa alla concentrazione di somatostatina in standard e campioni. ^{125}I -Tyr1-somatostatina è separata dalla frazione non legata con la tecnica della precipitazione doppio anticorpo fase solida. Viene misurata la radioattività della precipitazione.

Il risultato non dovrà essere usato a scopo di diagnosi clinica o gestione del paziente.

IV. REAGENTI IN DOTAZIONE

Reagenti	Kit per 100 test	Ricostruzione
[ANTISERUM] Antisiero di coniglio per somatostatina ciclica sintetica: l'immunogeno era conjugato a somatostatina ciclicamente alla tiroglobulina bovina. In tampone fosfato con azoturo di sodio, albumina di siero umano, sale disodico e aprotinina.	1 fiala liofilizzato	Aggiungere 22 ml di acqua distillata
Ag ^{125}I TRACCIANTE: ^{125}I odio somatostatina in tampone fosfato albumina di siero umano, sale disodico EDTA azoturo di sodio e aprotinina.	1 fiala liofilizzato 28 kBq	Aggiungere 25 ml di acqua distillata
[DASP] Doppio anticorpo-PEG : antisiero di capra anti-coniglio IG in tampone fosfato con albumina di siero umano, sale disodico EDTA, NaCl, NaN ₃ e Tween 80.	1 fiala 11 mL	Pronto all'uso
[ASS BUF] Diluente : Tampone fosfato contenente albumina di siero umano, sale disodico EDTA, Tween 80 e aprotinina. Da usare per la preparazione di standard di somatostatina, ricostituzione degli estratti del campione e in luogo dell'antisiero in controlli leganti non specifici.	1 fiala 50 mL	Pronto all'uso
[CAL] Standard somatostatina in tampone fosfato contenente albumina di siero umano, sale disodico EDTA, azoturo di sodio (<0.1%) e aprotinina.	1 fiala liofilizzato	Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala
[CONTROL N] Controlli - N = 1 o 2 Contiene azoturo di sodio.(<0.1%).	2 fiale liofilizzato	Aggiungere 1 mL di acqua distillata

V. FORNITURE NON IN DOTAZIONE

Il seguente materiale è necessario ma non fornito con il kit:

- Acqua distillata.
- Metanolo, per analisi.
- Acido cloridrico, 1 M.
- Acido acetico, per analisi.
- Tubi usa e getta per test 11-13 x 55 mm (polistirene).
- Pipette con punte usa e getta: 100, 200, 400 e 1000 μL .
- Pipette di vetro: 1 mL, 5 mL.
- Agitatore a vortice.
- Evaporatore Speedvac o essiccatore a congelamento (per l'evaporazione del metanolo).
- Centrifugare, refrigerare, con un minimo di 1700 x g.
- Contatore Gamma.
- Cartucce Sep-pak C18.

VI. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

- Anti-Somatostatina** : Ricostituire con 22 mL di acqua distillata. Conservare a 2-8° C.
- ^{125}I -somatostatina** : Ricostituire con 25 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- Fase solida doppio anticorpo** : Pronto all'uso. Mescolare continuamente durante il pipettaggio di questo reagente. Conservare a 2-8° C.
- Diluente test** : Pronto all'uso. Conservare a 2-8° C.
- Standard somatostatina** : Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- Controlli** : Ricostituire con 1 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.

VII. 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 ricostituire i reagenti liofilizzati deve essere distillata in un apparecchio completamente in vetro oppure deve essere di purezza equivalente. 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 è valida per i reagenti non ricostituiti. I reagenti ricostituiti sono stabili per 10 settimane o fino alla data di scadenza se conservati secondo le istruzioni.

VIII. RACCOLTA DI CAMPIONI

Viene raccolto il sangue in tubi per il test da 10 mL contenenti EDTA e aprotinina 5000 KIU/mL (Trasylol® o equivalente). Il campione viene raffreddato immediatamente in un bagno di ghiaccio. Il plasma viene separato tramite centrifugazione a +4°C. Il plasma deve essere congelato entro 30 minuti e conservato a -20° C o a temperatura inferiore fino all'analisi. Non conservare per più di 3 - 4 settimane. Per tempi più lunghi conservare a -70° C. Evitare congelamento e scongelamento ripetuti!!

IX. PROCEDURA

I. Estrazione di campioni di plasma

La procedura di estrazione descritta si basa sull'uso di cartucce Sep-pak® C18 disponibili da Millipore. La procedura è stata testata con cartucce Sep-pak C18, cod. prod. WAT 020515.

È importante che il recupero venga controllato alle condizioni sperimentali specifiche dell'utente.

- Scongelare i campioni subito prima di iniziare l'estrazione. Conservare a 2-8° C fino ad aggiungere 1 M HCl.
- Aggiungere 100 μl 1M HCl per mL di campione, ad es. 500 μl 1M HCl a 5.0 mL di campione. Miscelare nell'agitatore a vortice accuratamente.
- La cartuccia Sep-pak è inumidita con 5 mL di metanolo.
- Lavare la cartuccia Sep-pak con 20 mL di acqua distillata.
- Appicare 1.00 mL di campione di plasma (a cui è aggiunto 0.1 mL 1M HCl per mL) sulla cartuccia Sep-pak. La portata non deve superare 1 mL/10 secondi.
- Lavare con 20 mL 4% acido acetico in acqua distillata.
- Diluire la somatostatina con 2.0 mL di metanolo. La portata non deve superare 1 mL/10 secondi.
- Raccogliere l'eluato in un tubo di vetro da 10 mL.
- Evaporare per essiccare in un evaporatore rapido a vuoto.
- Sciogliere la somatostatina estratta in 1.00 mL di diluente del test. Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare riposare il campione per 30 minuti prima del test con il dosaggio radioimmunologico.

CONTROLLI DI RECUPERO

Per determinare il recupero nella procedura di estrazione, preparare i controlli come segue:

A 800 μL di EDTA-plasma del sangue donatore, a cui prima è stato aggiunto 0.1 mL 1M HCl per mL di plasma, aggiungere precisamente 200 μl dello standard di somatostatin 250 pmol/L. La concentrazione sarà di 50 pmol/L. Estrarre il controllo secondo la procedura descritta per i campioni.

Ad altri 800 μL di volume dello stesso plasma del sangue donatore (con 0.1 mL 1M HCl per mL plasma) aggiungere 200 μl di diluente del test. Estrarre il controllo secondo la procedura descritta per i campioni. Il controllo è usato per correggere la somatostatina endogena nel calcolo del recupero della somatostatina aggiunta.

II. Dosaggio radioimmunologico degli estratti

1. Ricostituire i reagenti secondo le istruzioni.
2. Preparare gli standard di lavoro per somatostatina diluendo 250 pmol/L di standard con il diluente del test secondo la seguente tabella:
 a/ 1.00 mL standard 250 pmol/L + 1.00 mL diluente del test = 125 pmol/L
 b/ 1.00 mL standard 125 pmol/L + 1.00 mL diluente del test = 62.5 pmol/L
 c/ 1.00 mL standard 62.5 pmol/L + 1.00 mL diluente del test = 31.3 pmol/L
 d/ 1.00 mL standard 31.3 pmol/L + 1.00 mL diluente del test = 15.6 pmol/L
 e/ 1.00 mL standard 15.6 pmol/L + 1.00 mL diluente del test = 7.8 pmol/L
 f/ 1.00 mL standard 7.8 pmol/L + 1.00 mL diluente del test = 3.9 pmol/L
 g/ diluente del test = 0 pmol/L.
 Conservare le soluzioni standard a-g e 250 pmol/L standard a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzate.
3. Pipettare 100 µL di standard a-g, controlli ed estratti dei campioni ricostituiti nei rispettivi tubi (duplicati). Pipettare 100 µL dello standard zero (diluente del test) nei tubi NSB (duplicati).
4. Aggiungere 200 µL di anti-somatostatina a tutti i tubi eccetto i tubi NSB e TOT.
5. Aggiungere 200 µL di diluente del test ai tubi NSB.
6. Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 20-24 ore a 2-8°C
7. Aggiungere 200 µL ¹²⁵I-somatostatina a tutti i tubi. I tubi TOT sono sigillati e tenuti da parte.
8. Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 20-24 ore a 2-8°C
9. Aggiungere 100 µL doppio anticorpo, fase solida a tutti i tubi eccetto i tubi TOT (durante il pipettaggio continuare a mescolare).
10. Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 30-60 minuti a 2-8°C
11. Centrifugare i tubi per 15 minuti a +4° C (1700 x g).
12. Lasciare decantare il surnanante subito dopo la centrifugazione.
13. Misurare la radioattività dei pellet in un contatore gamma (tempo misurazione 2-4 min.).

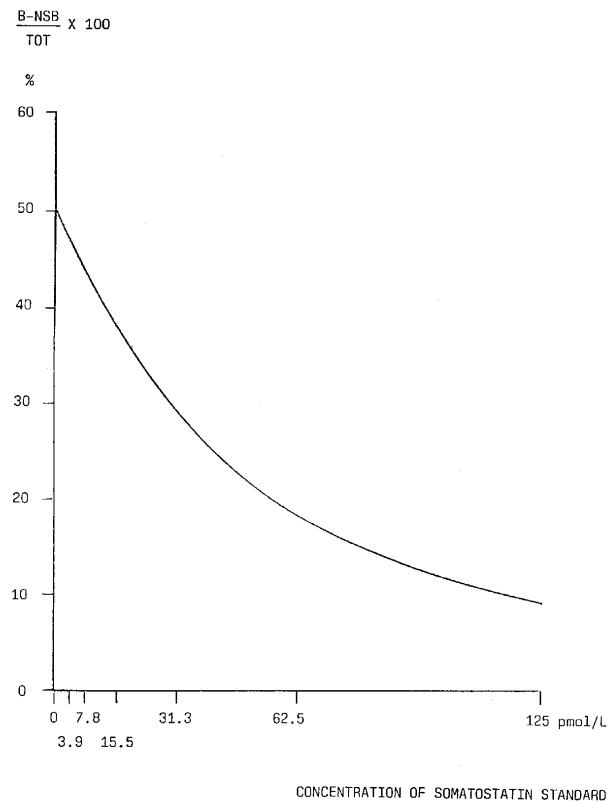
XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre il conteggio (CPM) medio del legante non specifico dal conteggio (CPM) dei replicati di standard, controlli e campioni.
2. Una curva standard viene generata tracciando il CPM precipitato, la frazione legata (in CPM o %B/TOT) rispetto alla concentrazione di standard somatostatina.
3. Interpolare le concentrazioni di somatostatina nei campioni e controlli dalla curva standard generata.
4. Calcolare il recupero della somatostatina nei controlli di recupero.
 $\% \text{ somatostatina recuperata} = \frac{(\text{Media conc. di controllo a} - \text{Media conc. di controllo b}) \times 100}{50}$ (= concentrazione aggiunta)

5. Correggere le concentrazioni del campione per il recupero %. Correggere le concentrazioni del campione per l'aumento di volume quando si aggiunge 1M HCl. Multiplicare per un fattore di 1.10.
6. 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

EXAMPLE OF SOMATOSTATIN STANDARD CURVE



XIII. ESECUZIONE E LIMITI

- A. Sensibilità**
La sensibilità calcolata da una diminuzione del legame di 2 SD nel zero standard è 6 pmol/L.
- B. Recupero**
Il recupero medio nella procedura di estrazione è $79 \pm 10\%$ (ottenuto in questo laboratorio).
- C. Precisione**

Variazione all'interno del test:

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
16.4 pmol/L	8.3	20
57.3 pmol/L	2.8	20

Variazione totale (interno test):

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
17.3 pmol/L	6.4	7
57.3 pmol/L	3.3	7

D. Specificità

Sono state trovate le seguenti reazioni incrociate:

Polipeptide	Reazione incrociata
Somatostatina, ciclica	100.0%
Tyr ¹ -somatostatina	100%
Somatostatina lineare	50%
Tyr ¹¹ -somatostatina	38%
Des-ala-gly-somatostatina	25%

D. Interferenza

Campioni torbidi, con emolisi, iperlipemia o contenenti fibrina potrebbero dare risultati non precisi.

XIV. CONCENTRAZIONE DI SOMATOSTATINA NEL PLASMA UMANO

La concentrazione di somatostatina nei soggetti normali a digiuno testata con questi reagenti è stata di <16 pmol/L.

XV. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Affinché il laboratorio possa monitorare completamente la prestazione coerente del dosaggio radioimmunologico, occorre verificare i seguenti importanti fattori.

1. Controlli

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

2. Controllo di recupero

Il recupero deve essere almeno del 60% affinché il test sia valido. È importante che il recupero venga controllato alle condizioni sperimentali specifiche dell'utente. Il recupero ottenuto al laboratorio di sviluppo prodotto è stato di $79 \pm 10\%$.

3. 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}I -Tyr1-somatostatina in questo kit darà un conteggio totale nel test (TOT) di 10500 CPM (+ 20%, -5%) alla data di riferimento attività (efficienza contatore = 80%).

4. Legame massimo (Bo/TOT)

Per ogni test, calcolare la % di radioattività legata nello standard zero:

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

TOT

5. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:

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

TOT

Il legame non specifico deve essere inferiore a 6%.

5. Forma 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 con il dosaggio immunologico per l'antigene superficiale dell'epatite B, anticorpi di HCV e anticorpi di HIV-1 e HIV-2 e trovati negativi. Ciononostante, vanno osservate tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

Questo kit contiene ^{125}I (periodo di dimezzamento: 60 giorni), radiazioni emittenti ionizzanti X (28 keV) e γ (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 deve essere conservato in aree appositamente designate, non normalmente accessibili a personale non autorizzato.
- La manipolazione del materiale radioattivo deve essere effettuata soltanto nelle aree autorizzate.
- Prestare attenzione a prevenire l'ingestione e il contatto con pelle e abbigliamento.
Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.
- Deve essere vietato bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.
- Le mani vanno protette con guanti e lavate dopo aver utilizzato materiale radioattivo.
- Eseguire il lavoro su una superficie coperta da materiale assorbente usa e getta.
- Eliminare immediatamente eventuali fuoriuscite di materiale radioattivo e gettare tutti i materiali contaminati 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 di rame o piombo potrebbe provocare l'accumulo di depositi di azoturi 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. Peeters, Theo L., Depraetere, Y. and Van Trappen, R. Simple extraction method and radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. *Clin Chem* 27:888 (1981).
2. Berg, J., Nilsson, K., Ekman, R. and Giovanella, B. Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell carcinomas of the lung. *Acta Path Microbiol et Immunologica Scand* 93A:133-147, 1985.
3. Widerlöv, E., Walleus, H., Lindström, L.H., Karlsson, I., Nemerooff, C.B., Rehfeld, J.F. and Ekman, R. Neuropeptide alterations in cerebrospinal fluid and plasma from psychiatric patients. Proceedings of the IV world congress of biological psychiatry Philadelphia 1985.
4. Eds.: Shagass et al. Elsevier. New York (1986), pp 856-858.
5. Somatostatin
Wass, J.A.H.
In *Endocrinology* volume no. 1, pp 152-166.
Editor: De Groot, Leslie J.
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989.
6. Penman, E., Wass, J.A.H., Lund, A. et al. Development and validation of the specific radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. *Ann Clin Biochem* 16:15-25, 1979.
7. Saito, H., Ogawa, T., Ischimaru, K., et al. Plasma somatostatin in normal and diseased states. Program of the VIth International congress of endocrinology, Melbourne, 1980. Abst. 75.
8. Arimura, A., Lundqvist, G., Rothman, J. et al. Radioimmunoassay of somatostatin. *Metabolism* 27 (Suppl 1):1139-1144, 1978.

XVIII. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	Conteggi gio totale	NSB	Calibratore (0-6)	Controlli	Campioni			
Calibratore	-	-	100 μl	-	-			
Controlli	-	-	-	100 μl	-			
Campioni	-	-	-	-	100 μl			
Anti-somatostatina	-	-	200 μl					
Diluente del test	-	300 μl	-	-	-			
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.								
Tracciatore ^{125}I	200 μl							
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.								
Fase solida doppio anticorpo	-	100 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 dei pellet								

es

Lea todo el protocolo antes de usar.

Somatostatin RIA

I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la medición cuantitativa *in vitro* de la somatostatina en plasma humano.
Solo para uso en investigación. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial: DIAsource Somatostatin RIA
- B. Número de catálogo: RB306RUO: 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. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La somatostatina en el plasma se extrae con cartuchos Sep-pak C18. Los extractos se analizan mediante un radioinmunoanálisis competitivo utilizando un antisero contra la somatostatina cíclica 14 sintética. La somatostatina en los estándares y en los sampillones compite con la somatostatina marcada con 125I en la unión a los anticuerpos. 125I-Tyr1-somatostatina se une en proporción inversa a la concentración de somatostatina en los estándares y las muestras. Anticuerpo 125I-Tyr1-somatostatina unida a anticuerpos se separa de la fracción no unida mediante la técnica de precipitación en fase sólida con doble anticuerpo. Se mide la radiactividad de los precipitados.

El resultado no se utilizará para el diagnóstico clínico o el tratamiento del paciente.

IV. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 100 pruebas	Reconstitución
[ANTISERUM]		
Antisero de conejo contra la somatostatina cíclica sintética: el inmunógeno era somatostatina cíclica conjugada con tiroglobulina bovina, en tampón fosfato con azida sódica, albúmina sérica humana, sal disódica y aprotinina.	1 vial liofilizados	Añadir 22 ml de agua destilada
Ag 125I	1 vial liofilizado 28 kBq	Añadir 25 ml de agua destilada
TRAZADOR: Somatostatina marcada con 125 yodo en tampón fosfato de albúmina de suero humano, sal disódica EDTA, azida sódica y aprotinina.		
[DASP]	1 vial 11 ml	Listo para usar
Doble anticuerpo-PEG: antisero anti-conejo-IG de cabra en tampón fosfato con albúmina de suero humano, sal disódica EDTA, NaCl, Na3Y y Tween 80.		
[ASS BUF]	1 vial 50 ml	Listo para usar
Diluyente: Tampón fosfato que contiene albúmina de suero humano, sal disódica EDTA, azida sódica, Tween 80 y aprotinina. Para ser utilizado en la preparación de estándares de somatostatina, en la reconstitución de extractos de muestras y en lugar del antisero en controles de unión no específica.		
[CAL]	1 vial liofilizados	Reconstituya con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial
Estándar de somatostatina en tampón fosfato que contiene albúmina de suero humano, sal disódica EDTA, azida sódica (<0,1%) y aprotinina.		
[CONTROL N]	2 viales liofilizados	Añadir 1 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 Contiene azida sódica (<0.1%).		

V. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada
2. Metanol, pro análisis.
3. Ácido clorhídrico, 1 M.
4. Ácido acético, pro análisis.
5. Tubos de ensayo desechables de 11-13 x 55 mm (poliestireno).
6. Pipetas con puntas desechables: 100, 200, 400 y 1000 µl.
7. Pipetas: 1 ml, 5 ml.
8. Agitador tipo vórtex.
9. Evaporador Speedvac o liofilizador (para la evaporación del metanol).
10. Centrifugar, refrigerado, dando un mínimo de 1700 x g.
11. Contador gamma
12. Cartuchos Sep-pak C18.

VI. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Anti-Somatostatina:** Reconstituya con 22 ml de agua destilada. Conservar a 2-8 °C.
- 125I-somatostatina :** Reconstituir con 25 mL de agua destilada. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.
- Fase sólida de doble anticuerpo : Lista para usar. Mezclar continuamente durante el pipeteo de este reactivo. Conservar a 2-8 °C.
- Diluyente de ensayo : Lista para usar. Conservar a 2-8 °C.
- Estándar de somatostatina ::** Reconstituir con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.
- Controles:** Reconstituir con 1 mL de agua destilada. Almacene a -18 °C o menos si se reutiliza.

VII. 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 no reconstituidos. Los reactivos reconstituidos son estables durante 10 semanas o hasta la fecha de caducidad si se almacenan según las instrucciones.

VIII. RECOGIDA DE MUESTRAS

La sangre se recoge en tubos de ensayo de 10 ml que contienen EDTA y aprotinina 5000 KIU/ml (Trasylol® o equivalente). La muestra se enfriá inmediatamente en un baño de hielo. El plasma se separa por centrifugación a +4° C. El plasma debe congelarse en 30 minutos y almacenarse a -20° C o menos hasta su análisis. Conserve no más de 3 a 4 semanas. Para un tiempo más prolongado almacenar a -70° C. Se debe evitar congelar y descongelar.

IX. PROCEDIMIENTO

I. Extracción de las muestras:

El procedimiento de extracción descrito se basa en el uso de cartuchos Sep-pak® C18 disponibles en Millipore. El procedimiento ha sido probado con el cartucho Sep-pak C18, producto no. WAT 020515.

Es importante que la recuperación se controle bajo las condiciones Experimentales del usuario.

1. Descongele las muestras inmediatamente antes de iniciar la extracción. Conserve a 2-8 °C hasta añadir 1 M HCl
2. Añada 100 µl de 1M HCl por ml de muestra, p. ej., 500 µl de 1M HCl a 5,0 ml de muestra. Mezcle en el vórtex con cuidado.
3. El cartucho Sep-pak se moja con 5 ml de metanol.
4. Lave el cartucho Sep-pak con 20 ml de agua destilada.
5. Aplique 1,00 ml de muestra de plasma (a la que se ha añadido 0,1 ml de 1M HCl por ml) en el cartucho Sep-pak. El caudal no debe superar 1 ml/10 segundos.
6. Lave con 20 ml de ácido acético al 4% en agua destilada.
7. Elyuya la somatostatina con 2,0 ml de metanol. El caudal no debe superar 1 ml/10 segundos.
- Recoge el eluido en un tubo de vidrio de 10 ml.
8. Evapore hasta sequedad en un evaporador Speed vac.
9. Disuelva la somatostatina extraída en 1,00 ml de diluyente de ensayo. Mezcle en el vórtex y dejar que la muestra permanezca durante 30 minutos antes de realizar el procedimiento de radioinmunoanálisis.

CONTROLES DE RECUPERACIÓN

Para la determinación de la recuperación en el procedimiento de extracción de, prepare los controles de la siguiente manera:

A 800 µl de plasma EDTA de donante de sangre, al que previamente se ha añadido 0,1 ml de 1M HCl por ml de plasma, se añaden exactamente 200 µl del estándar de somatostatina 250 pmol/l. La concentración será de 50 pmol/l. Extraiga el control según el procedimiento descrito para las muestras.

A otro volumen de 800 µl del mismo plasma del donante de sangre (con 0,1 ml de 1M HCl por ml de plasma) se añaden 200 µl de diluyente del ensayo. Extraiga el control según el procedimiento descrito para las muestras. El control se utiliza para corregir la somatostatina endógena en el cálculo de la recuperación de la somatostatina añadida.

II. Radioinmunoanálisis de extractos

1. Reconstituya los reactivos según las instrucciones.
2. Prepare los estándares de trabajo de somatostatina por dilución del estándar de 250 pmol/l con el diluyente del ensayo de acuerdo con lo siguiente:
 - a/ 1.00 ml de estándar de 250 pmol/l + 1.00 ml de diluyente de prueba = 125 pmol/l
 - b/ 1.00 ml de estándar de 125 pmol/l + 1.00 ml de diluyente de ensayo = 62.5 pmol/l
 - c/ 1.00 ml de estándar 62.5 pmol/l + 1.00 ml de diluyente del ensayo = 31.3 pmol/l
 - d/ 1.00 ml de estándar de 31.3 pmol/l + 1.00 ml de diluyente del ensayo = 15.6 pmol/l
 - e/ 1.00 ml de estándar de 15.6 pmol/l + 1.00 ml de diluyente de ensayo = 7.8 pmol/l
 - f/ 1.00 ml de estándar de 7.8 pmol/l + 1.00 ml de diluyente del ensayo = 3.9 pmol/l
 - g/ Diluyente del ensayo = 0 pmol/l.
- Conserve las soluciones estándar a-g y el estándar de 250 pmol/l a -18° C o menos si se reutilizan.
3. Pipetear 100 µl de los estándares a-g, de los controles y de los extractos de muestra reconstituidos y de los extractos de control reconstituidos en sus respectivos tubos (duplicados). Pipetear 100 µl del estándar cero (diluyente del ensayo) en los tubos NSB (duplicados).
4. Añadir 200 µl de antisomatostatina a todos los tubos, excepto a los tubos NSB y TOT.
5. Añada 200 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB.
6. Mezcle en el vórtex e incube durante 20-24 horas a 2-8 °C.
7. Añada 200 µl de 125I-somatostatina a todos los tubos. Los tubos TOT se sellan y se almacenan.
8. Mezcle en el vórtex e incube durante 20-24 horas a 2-8 °C.
9. Añada 100 µl de doble anticuerpo, fase sólida, a todos los tubos excepto a los tubos TOT (agitarse continuamente durante el pipeteo).
10. Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.
11. Centrifugar los tubos durante 15 minutos a +4 °C (1700 x g).
12. Decante el sobrenadante inmediatamente después de la centrifugación.
13. Mida la radiactividad de los gránulos en un contador gamma (tiempo de conteo 2-4 min).

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

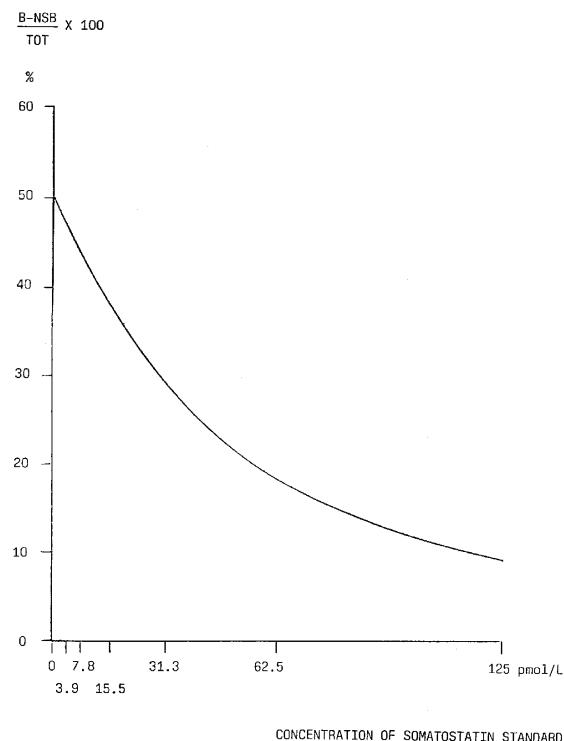
1. Reste la tasa de recuento media (CPM) de la unión no específica de la tasa de recuento (CPM) de las réplicas de estándares, controles y muestras.
2. Se genera una curva estándar graficando el CPM precipitado, la fracción ligada (en CPM o %B/TOT) contra las concentraciones de los estándares de Somatostatina.
3. Interpolar las concentraciones de somatostatina de las muestras y los controles a partir de la curva estándar generada.
4. Calcule la recuperación de somatostatina en los controles de recuperación.
% de somatostatina recuperada =

$$\frac{(\text{Conc. media de control a} - \text{Conc. media de control b}) \times 100}{50} (= \text{concentración añadida})$$

5. Corrige las concentraciones de la muestra para el % de recuperación. Corregir las concentraciones de la muestra por el aumento de volumen al añadir 1M HCl. Multiplica con un factor de 1,10.
6. 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

EXAMPLE OF SOMATOSTATIN STANDARD CURVE



XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Sensibilidad

La sensibilidad calculada a partir de una disminución de la unión de 2 SD en el estándar cero es de 6 pmol/l.

B. Recuperación

La recuperación media en el procedimiento de extracción es de $79 \pm 10\%$ (obtenida en este laboratorio).

C. Precisión

Variación intraensayo:

Nivel	Coeficiente de variación (%CV)	N
16.4 pmol/l	8,3	20
57,3 pmol/l	2,8	20

Variación total (interensayo):

Nivel	Coeficiente de variación (%CV)	N
17.3 pmol/l	6,4	7
57,7 pmol/l	3,3	7

B. Especificidad

Se han encontrado las siguientes reacciones cruzadas:

Polipéptido	Reactividad cruzada
Somatostatina, cíclica	100,0 %
Tyr ¹ -somatostatina	100 %
Somatostatina lineal	50 %
Tyr ¹¹ -somatostatina	38 %
Des-ala-gly-somatostatina	25%

D. Interferencia

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

XIV. CONCENTRACIÓN DE SOMATOSTATINA EN EL PLASMA HUMANO

La concentración de somatostatina en sujetos normales en ayunas analizada con estos reactivos fue de <16 pmol/l.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para que el laboratorio pueda controlar completamente el rendimiento consistente del radioinmunoanálisis, hay algunos factores importantes que deben comprobarse.

1. Controles

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

2. Control de recuperación

La recuperación debe ser de al menos el 60% para que el ensayo sea válido. Es importante que la recuperación se controle bajo las propias condiciones experimentales del usuario. La recuperación obtenida en el laboratorio de desarrollo de productos fue del 79 ± 10%.

3. 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 ^{125}I -Tyr1-somatostatina en este kit dará un recuento total en el ensayo (TOT) de 10500 CPM (+ 20%, -5%) en la fecha de referencia de la actividad (eficiencia del contador = 80%).

4. Máxima vinculación (Bo/TOT)

Calcular para cada ensayo el % de radiactividad ligada en el estándar cero:

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

TOT

5. Unión no específica (NSB/TOT)

Calcular para cada ensayo el % de unión no específica:

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

TOT

La unión no específica debe ser inferior al 6%.

5. Forma 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

Solo para uso en investigación

Puesto que la normativa varía de un país a otro, es fundamental 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 cantidad de los utilizados en esta prueba.

Este kit contiene componentes de origen humano. Todos ellos han sido analizados mediante inmunoensayos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, los anticuerpos del VHC y los anticuerpos del VIH-1 y VIH-2, dando todos ellos negativo. No obstante, se deben respetar todas las precauciones recomendadas para manipular cualquier derivado de la sangre.

Este kit contiene I^{125} (vida media: 60 días), emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes. Se deben seguir los pasos necesarios para garantizar la correcta manipulación del material radiactivo de acuerdo con la normativa local y/o nacional. Solo el personal autorizado debe tener acceso a los reactivos.

Al manipular materiales radiactivos, se deben adoptar las siguientes precauciones:

- El material radiactivo debe almacenarse en áreas especialmente designadas, normalmente no accesibles 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 pipetee soluciones radiactivas por vía oral.
- Debe prohibirse 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 desecharable.
- 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 tuberías 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. Peeters, Theo L., Depraetere, Y. y Van Trappen, R. Simple extraction method and radioimmunoassay for somatostatin in human plasma (Método sencillo de extracción y radioinmunoanálisis para la somatostatina en plasma humano). Clin Chem, 27:1486-888 (1981)
2. Berg, J., Nilsson, K., Ekman, R. and Giovannella, B. Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell (Establecimiento y caracterización de líneas celulares de células pequeñas y grandes humanas) carcinomas of the lung (carcinomas de pulmón). Acta Path Microbiol et Immunologica Scand 93A:133-147, 1985.
3. Widerlöv, E., Walleus, H., Lindström, L.H., Karlsson, I., Nemeroff, C.B., Rehfeld, J.F. y Ekman, R. Neuropeptide alterations in cerebrospinal fluid and plasma from psychiatric patients (Alteraciones de neuropeptidos en el líquido cefalorraquídeo y el plasma de pacientes psiquiátricos). Proceedings of the IV world congress of biological psychiatry Philadelphia 1985 (Actas del IV congreso mundial de psiquiatría biológica Filadelfia 1985). Eds.: Ciprandi y cols. Elsevier. Marcel Dekker, New York, 1986, páginas. 856-858.
4. Somatostatin (Somatostatina) Wass, J.A.H. In Endocrinology volume no. 1 (En el volumen de Endocrinología no. 1), páginas 152-166.
Editor: De Groot, Leslie J.
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989, p.1821.
5. Penman, E., Wass, J.A.H., Lund, A. et al. Development and validation of the specific radioimmunoassay for somatostatin in human plasma (Desarrollo y validación del radioinmunoensayo específico para la somatostatina en plasma humano). Ann Clin Biochem 16:15-25, 1979.
6. Saito, H., Ogawa, T., Ischimaru, K., et al. Plasma somatostatin in normal and diseased states (Somatostatina plasmática en estados normales y enfermos). Program of the VIth International congress of endocrinology (Programa del VI Congreso Internacional de Endocrinología), Melbourne, 1980. Abst. 75.
7. Arimura, A., Lundqvist, G., Rothman, J. et al. Radioimmunoassay of somatostatin. (Radioinmunoanálisis de la somatostatina). Metabolism 27 (Suppl 1):1139-1144, 1978.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibradores (0-6)	Controles	Muestras
Calibrador	-	-	100 μl	-	-
Controles	-	-	-	100 μl	-
Muestras	-	-	-	-	100 μl
Antisomatostatina	-	-			200 μl
Diluyente de ensayo	-	300 μl	-	-	-
Mezcle en el vórtex e incube durante 20-24 horas a 2 - 8 °C.					
Trazador ^{125}I			200 μl		
Mezcle en el vórtex e incube durante 20-24 horas a 2 - 8 °C.					
Fase sólida de doble anticuerpo	-		100 μl		
Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.					
Centrifugar 15 min. (1700 g; 4°C)					
Decante y calcule la radiactividad de los gránulos					

Otras traducciones de estas instrucciones de uso disponibles para su descarga en nuestra página web:
<https://www.diasource-diagnostics.com/>