



Gastrin - RIA

MD302RUO

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

Gastrin-RIA

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of gastrin in human serum.

For Research use only. Not for use in diagnostic procedures.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource Gastrin-RIA
- B. Catalog number :** MD302RUO : 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. BACKGROUND

Gastrin and the vagal nerves are the main regulators of gastric acid secretion. However other factors than gastrin contribute to the gastric acid secretion. The main site for gastrin production is the antropyloric mucosa of the stomach. A few gastrin producing cells may also be found in the duodenum and pancreas.

Gastrin occurs in many different forms in human serum. An amidated C-terminal is essential for the biological activity of the gastrins.

Progastrin is cleaved from preprogastrin. It has been shown that progastrin is partially sulphated in the tyrosine residues. The progastrin is enzymatically cleaved to the main circulating forms of biologically active gastrin: gastrin-34 and gastrin-17, which occur in sulphated and non-sulphated forms. Small amount of gastrin-52 (also named component 1), gastrin-14 (mini-gastrin) and even smaller fragments have been detected in serum.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

Gastrin in serum is assayed by a competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against a gastrin 17 bovine serum albumin conjugate. Gastrin in calibrators and samples compete with ¹²⁵I-labelled gastrin-17 in binding to the antibodies. ¹²⁵I-gastrin binds in a reverse proportion to the concentration of gastrin in calibrators and samples, in a two steps incubation protocol. Antibody-bound ¹²⁵I-gastrin 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 assay cross-reacts with gastrin-34 and the sulphated forms of gastrin-17.

For professional use within a laboratory.

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

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Reconstitution
[ANTISERUM] Rabbit antiserum raised against synthetic human gastrin-17 conjugated to bovine serum albumin. Diluent: phosphate buffer, human serum albumin and sodium azide (<0.1%).	1 vial 21mL	Ready for use
Ag ¹²⁵I TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled Gastrin in phosphate buffer with human serum albumin and NaN ₃ .	1 vial lyophilised 66 kBq	Add 25 mL distilled water
[Ab PEG] Double antibody-PEG: Goat anti-rabbit Ig antiserum in phosphate buffer with human serum albumin and sodium azide. (<0.1%). Contains polyethylene glycol	1 vial 50 mL	Ready for use
[ASS BUF] Assay buffer : phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide, (<0.1%).	1 vial 40 mL	Ready for use
[CAL] Gastrin Calibrator in phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide (<0.1%).	1 vial lyophilised	Reconstitute with distilled water by the volume stated on the vial label
[CONTROL N] Control - N = 1 or 2 Lyophilised controls with two different levels of gastrin.	2 vials lyophilised	Add 1 mL distilled water

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Disposable test tubes 11-13 x 55 mm, polystyrene.
2. Pipettes with disposable tips, 100, 200 and 500 µL.
3. A repeating pipette, e.g. Eppendorf Multichannel pipette, for volumes 200 and 500 µL will facilitate the dispensing of the reagents.
4. Vortex mixer.
5. Centrifuge, capable for min 1700 x g (refrigerated centrifuge is preferred).
6. Well-type gamma counter.

VII. REAGENT PREPARATION

- Antiserum** : Ready for use. Store at 2-8° C.
- ¹²⁵I-gastrin**: Reconstitute with 25 mL distilled water. Store at 2-8° C.
- Double Antibody-PEG**: Ready for use. Mix thoroughly before use. Store at 2-8° C.
- Assay buffer**: Ready for use. Store at 2-8° C.
- Gastrin calibrator**: Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. For preparation of working calibrators, see radioimmunoassay procedure. Store at -18° C or lower if reused.
- Controls**: Reconstitute each vial with 1 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 stability of the reagents is indicated on the labels of the vials. For lyophilised reagents the expiry date is valid for the unreconstituted reagents. The reconstituted reagents are stable for 8 weeks if stored properly.

The water used for reconstitution of lyophilised reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the content in a vial by gentle inversion and avoid foaming.

IX. SPECIMEN COLLECTION

Subjects should be fasting at least ten hours prior to sample collection. Vein blood is collected in tubes without additives. The sample is cooled in an ice-bath and allowed to clot. Serum is separated by centrifugation at +4° C.

The serum should be frozen within 4 hours and stored at -18° C or lower until assayed. Repeated freezing and thawing should be avoided.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Reconstitute the reagents as specified.

Reagents should be brought to room temperature, prior to use. Accuracy in all pipetting steps is essential. All tests (calibrators, controls and samples) should be performed in duplicate. A complete assay includes:

Calibrators: 7 concentrations, 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 and 500 pmol/L.

Controls: Low and high.

Samples.

Tubes for determining the non-specific binding (NSB-tubes).

Tubes for determining the total radioactivity (TOT-tubes).

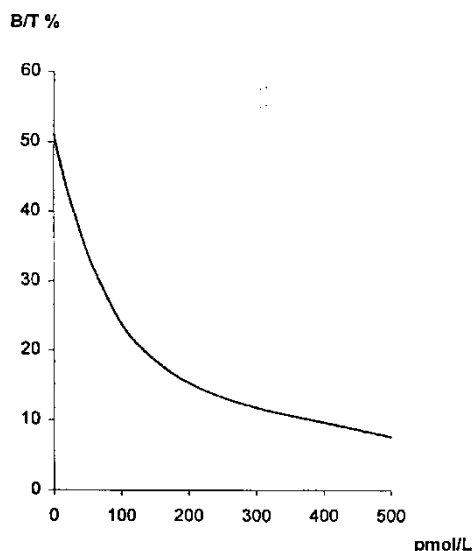
B. Procedure

1. Reconstitute the lyophilised reagents according to the instructions and allow the reagents to reach room temperature.
2. Prepare the gastrin working calibrators by dilution of the Gastrin calibrator 500 pmol/L with assay buffer according to the following example:
 - a. Gastrin calibrator after reconstitution = 500 pmol/L
 - b. 1.0 mL calibrator 500 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 250 pmol/L
 - c. 1.0 mL calibrator 250 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 125 pmol/L
 - d. 1.0 mL calibrator 125 pmol/L + 1.0 mL assay bufer = 62.5 pmol/L
 - e. 1.0 mL calibrator 62.5 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 31.2 pmol/L
 - f. 1.0 mL calibrator 31.2 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 15.6 pmol/L
 - g. Assay buffer = 0 pmol/L
(Store the calibrators at -20° C or lower if reused).
3. Pipette 100 µL of calibrators, controls and samples in their respective tubes.
4. Pipette 300 µL assay buffer into NSB-tubes.
5. Pipette 200 µL anti-Gastrin into all tubes except NSB and TOT.
6. Vortex the tubes and incubate for 60 min at room temperature (18-25°C).
7. Pipette 200 µL of ¹²⁵I-Gastrin into all tubes. The TOT-tubes are capped and kept aside.
8. Vortex the tubes and incubate for 60 min at room temperature (18-25° C).
9. Add 500 µL of well mixed double antibody-PEG into all tubes except TOT. Vortex carefully and incubate 30-60 min at room temperature.
10. Centrifuge for 15 minutes at minimum 1700 x g, temperature 4° C.
11. Decant the supernatant immediately after centrifugation, and count the radioactivity in the precipitates in a gamma counter.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Subtract the average count rate (CPM) of the NSB from the count rate (CPM) of the replicates of the calibrators, controls and samples.
- A calibration curve is generated by plotting the bound fraction, B/TOT against the concentrations of the gastrin calibrators.
- Interpolate the gastrin concentrations of the controls and samples from the generated calibration curve.
- The calibration curve and the calculation of the concentrations in samples can be done by a computer method. A spline method may be used.

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



XII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Limit of detection

The LoB (limit of blank) was calculated by measuring the blank 22 times and was calculated as the Mean - 2 Standard Deviations of the distribution of the test values. The LoB was calculated to be 6.3 pmol/L.

The LoD (Limit of Detection) was calculated as the LoB + 1.645 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different runs. The LoD was calculated to be 10 pmol/L.

The LoQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 4 low values samples, 10 times. The LoQ was calculated to be 11.6 pmol/L."

B. Precision

Intra assay variation

Level	Coefficient of variation (% CV)	N
35.4 pmol/L	4.1%	24
162.6 pmol/L	4.2%	24

Inter assay variation

Level	Coefficient of variation (% CV)	N
40.0 pmol/L	6.0%	10
177.4 pmol/L	4.0%	10

C. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concentration (pmol/L)	Measured Concentration (pmol/L)
A	1/1	145.71	145.71
	1/2	72.86	73.65
	1/4	36.43	40.57
	1/8	18.21	21.79
	1/16	9.11	10.79
B	1/1	46.78	46.78
	1/2	23.39	23.11
	1/4	11.70	12.76
	1/8	5.85	4.84

Samples were diluted with the assay buffer.

D. Specificity

The following cross reactions have been found:

Compound	Cross reaction (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulphated	87.8
Gastrin-34	83.1
CCK-8	40.4
Gastrin 1-14	< 0.01
Gastrin releasing peptide	<0.01

E. Interference

The effect of potential interfering substances on samples using the DAsource Gastrin RIA test was evaluated. Different levels of Haemoglobin, Bilirubin conjugated, Bilirubin non conjugated and Triglyceride were tested on samples with different Gastrin concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. The tested substances did not affect the performance of the DAsource Gastrin RIA test.

Substance	Gastrine concentration (pmol/L)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Haemoglobin	38.8	500	+1.0 %
		250	
	168.0	500	
		250	
Non conjugated Bilirubin	41.2	15	+4.5%
		10	
	159.4	15	
		10	
Conjugated Bilirubin	38.8	2	-2.1%
		0.4	
	168.0	2	
		0.4	
Triglyceride	49.4	250	+0.7%
		50	
	160.8	250	
		50	

XIII. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

1. 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 ¹²⁵I-gastrin in this kit will give 25000 CPM (-5, +20%) at the reference date (counting efficiency = 80%).

3. Maximum binding (B0/TOT)

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

$$\frac{B_0}{TOT} \times 100$$

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

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

The non-specific is less than 5%.

5. Slope of calibration curve

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

XIV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

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 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 ¹²⁵I (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 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.

XV. BIBLIOGRAPHY

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay. Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin. Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients. Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.

7. Immunoreactive gastrin components in human serum. Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F. Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome. Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity. Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.
11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenohypophysis. Nature 271:771, 1978.
12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells. J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.
13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs. J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.
14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones.
in: Gastrointestinal Hormones. Editor: George B. Jerzy Glass. Raven Press, New York (1980).
15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.
16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI.

SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrators	-	-	100 µL	-	-
Controls	-	-	-	100 µL	-
Samples	-	-	-	-	100 µL
Assay diluent	-	300µL	-	-	-
Antiserum	-	-	200 µL		
Vortex-mix and incubate for 60 min at 18-25°C					
¹²⁵ I Tracer	200 µL				
Vortex-mix and incubate for 60 min at 18-25°C					
Double antibody PEG	-	500 µL			
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 18-25°C					
Centrifuge 15 min (1700 g) at 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.

Gastrin-RIA

I. UTILISATION

Dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la gastrine dans le sérum humain.
Pour un usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. Nom du kit: DIAsource Gastrin-RIA
- B. Numéro de référence : MD302RUO : 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

La gastrine et le nerf vague sont les principaux régulateurs de la sécrétion de l'acide gastrique. La production de la gastrine se fait principalement dans les muqueuses antropyloriques de l'estomac. Quelques cellules de production de la gastrine peuvent également se trouver dans le duodénum et le pancréas.

La gastrine se présente sous différentes formes dans le sérum humain. Un amide C-terminal est essentiel à l'activité biologique des gastrines.

La progastrine provient du clivage de la prégastrine. Il a été montré que la progastrine est partiellement sulfatée sur les résidus tyrosine. La progastrine est clivée par une enzyme pour donner les principales formes circulantes biologiquement actives de la gastrine: la gastrine-34 et la gastrine-17, qui se présentent sous forme sulfatée et non sulfatée. De petites quantités de gastrine-52 (aussi appelée composant 1), la gastrine14 (mini-gastrine) et même des fragments plus petits ont été détectés dans le sérum

IV. PRINCIPES DE LA METHODE

La gastrine dans le sérum est analys e par une méthode radioimmunologique compétitive qui utilise un antisérum de lapin dirigé contre un conjugué gastrine 17 et d'albumine de sérum bovin. La gastrine des calibrateurs et des échantillons entre en compétition avec la gastrine-17 marquée à l'125 pour la liaison aux anticorps. La gastrine marquée à l' 125 se lie en proportion inverse en gastrine dans les calibrateurs et les échantillons, dans un protocole d'incubation en deux étapes. La gastrine 125 liée à l'anticorps est séparée de la fraction non liée par la technique de précipitation au polyéthylène glycol (PEG)   double anticorps. La radioactivité des précipités est mesurée. L'antisérum utilisé dans l'analyse réagit de manière croisée avec la gastrine-34 et les formes sulfatées des gastrine-17. Pour une utilisation professionnelle en laboratoire. Le résultat ne doit pas être utilisé pour le diagnostic clinique ou la prise en charge du patient.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 100 tests	Reconstitution
[ANTISÉRUM] Antisérum de lapin dirigé contre la gastrine-17 humaine synthétique conjuguée à de l'albumine sérique bovine. Diluant: tampon phosphate, albumine sérique humaine et azoture de sodium (<0,1%).	1 flacon 21 ml	Prêt à l'emploi
Ag I125 TRACEUR : Gastrine marquée à l'iode-125 dans un tampon phosphate avec du sérum humain et du NaN3.	1 flacon lyophilisé 66 kBq	Ajouter 25 ml d'eau distillée
[Ab PEG] PEG double anticorps : Antisérum de chèvre anti-Ig de lapin dilué dans un tampon de phosphate avec albumine sérique humaine et azoture de sodium. (<0,1%). Contient du polyéthylène glycol	1 flacon 50 ml	Prêt à l'emploi
[ASS BUF] Tampon d'analyse : tampon phosphate contenant de l'albumine sérique humaine et de l'azoture de sodium (<0,1 %).	1 flacon 40 ml	Prêt à l'emploi
[CAL] Calibrateur de gastrine dans tampon phosphate, albumine sérique humaine et azoture de sodium (<0,1 %).	1 flacon lyophilisé	Reconstituer avec de l'eau distillée en ajoutant le volume indiqué sur l'étiquette du flacon.
[CONTROL N] Contrôle - N = 1 ou 2 Contrôles lyophilisés avec deux niveaux de gastrine différents.	2 flacons lyophilisé	Ajouter 1 ml d'eau distillée

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis, mais non fourni avec la trousse :

1. Tubes d'analyse jetables (11-13 x 55 mm), polystyrène.
2. Pipettes avec pointes jetables, 100, 200 et 500  l.
3. Une pipette répétitive, par ex. Eppendorf Multipipette, pour des volumes de 200 et 500  L facilitera la distribution des réactifs.
4. Agitateur vortex.
5. Centrifugeuse pouvant assurer 1700 x g par minute (une centrifugeuse réfrigérée est préférée).
6. Compteur gamma à puits.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Antisérum : prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8  C.
- B. Gastrine I125 : Reconstituer avec 25 ml d'eau distillée. Conserver entre 2 et 8  C.

- C. PEG-double anticorps : prêt à l'emploi. Mélanger à fond avant utilisation. Conserver entre 2 et 8  C.
- D. Tampon d'analyse : prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8  C.
- E. Calibrateur de gastrine : reconstituer avec le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette du flacon. Pour la préparation des calibrateurs de travail, suivre la procédure de dosage radioimmunologique. Entreposer   -18 C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- F. Contrôles : Reconstituer chacun des flacons avec 1 ml d'eau distillée. Entreposer   -18 C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

VIII. CONSERVATION ET DATES DE PEREMPTION DES REACTIFS

Entreposer tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 C avant reconstitution et emploi. La stabilit  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 8 semaines dans de bonnes conditions d'entreposage. 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.

IX. RECUEIL DE L'ECHANTILLON

Les sujets doivent être à jeun au moins 10 heures avant la prise de sang. Du sang veineux est prélevé dans des tubes sans additifs. L'échantillon est réfrigéré dans un bain à glace. Le laisser coaguler. Le sérum est séparé par centrifugation à +4 C. Le sérum doit être congelé dans les 4 heures du prélèvement et conservé à -18 C ou moins jusqu'au moment de l'analyse. Il faut éviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

X. PROCEDURE

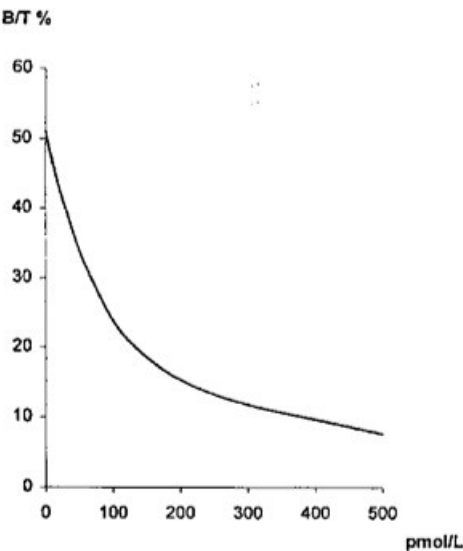
- A. Remarques concernant la manipulation
Reconstituer les réactifs de la manière spécifiée. Laisser les réactifs se stabiliser à température ambiante avant l'emploi. La précision est essentielle sur toutes les étapes du pipetage. Tous les tests (calibrateurs, contrôles et échantillons) doivent être réalisés en double. Un dosage complet comprend :
Calibrateurs : 7 concentrations différentes 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 et 500 pmol/L.
Contrôles : bas et élevé.
 chantillons.
Tubes pour la détermination de la liaison non spécifique (tubes NSB)
Tubes pour la détermination de la réactivité totale (tubes TOT).

- B. Procédure
1. Reconstituer les réactifs lyophilisés conformément aux instructions et les laisser se stabiliser à température ambiante.
2. Préparer les calibrateurs de travail de gastrine en diluant le calibrateur de gastrine de 500 pmol/l avec le tampon d'analyse conformément aux indications de l'exemple suivant :
a. Calibrateur de gastrine après reconstitution = 500 pmol/L
b. 1 ml de calibrateur de 500 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 250 pmol/l
c. 1 ml de calibrateur de 250 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 125 pmol/l
d. 1 ml de calibrateur de 125 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 62,5 pmol/l
e. 1 ml de calibrateur de 62,5 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 31,2 pmol/l.
f. 1 ml de calibrateur de 31,2 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 15,6 pmol/l.
g. tampon de dosage = 0 pmol/l
(Entreposer les calibrateurs à une température de -20  C ou inférieure en cas de réutilisation).
3. Pipeter 100  L de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dans leurs tubes respectifs.
4. Pipeter 300  L du tampon d'analyse dans les tubes NSB.
5. Pipeter 200  L d'anti-Gastrin dans tous les tubes sauf NSB et TOT.
6. Agiter soigneusement les tubes au vortex et incuber pendant 60 min à température ambiante (18-25 C).
7. Pipeter 200  L de 125I-Gastrin dans tous les tubes. Les tubes TOT sont bouchés et mis de côté.
8. Agiter soigneusement les tubes au vortex et incuber pendant 60 minutes à température ambiante (18-25  C).
9. Ajouter 500  L du double anticorps-PEG bien mélangé à tous les tubes, à l'exception du tube TOT Agiter soigneusement au vortex et incuber 30 minutes à température ambiante.
10. Centrifuger pendant 15 minutes à minimum 1700 x g à une température de 4 C.
11. Décanter le surnageant immédiatement après la centrifugation et compter la radioactivité des précipités dans un compteur gamma.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes de liaison non spécifique (NSB) du taux de comptage (CPM) des répliquats des calibrateurs, des contrôles et des échantillons.
- Établir une courbe de calibration en reportant la fraction liée, B/TOT, en fonction des concentrations en gastrine des calibrateurs
- Interpoler les concentrations en gastrine des contrôles et des échantillons à partir de la courbe de calibration générée.
- Il est également possible de réaliser la courbe de calibration et le calcul des concentrations dans les échantillons par une méthode informatisée. Un algorithme de spline cubique peut être utilisé.

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



XII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Limite de détection

La LoB (limite du blanc) a été calculée en mesurant le blanc 22 fois et a été calculée comme la moyenne - 2 écarts types de la distribution des valeurs de test. La LoB a été calculée à 6,3 pmol/L.

La LoD (limite de détection) a été calculée comme la LoB + 1,645 déviation standard d'un échantillon à faible concentration testé dans 10 séries différentes. La LoD a été calculée à 10 pmol/L.

La LoQ (limite de quantification) a été calculée en testant 4 échantillons de faible valeur, 10 fois. La LoQ a été calculée à 11,6 pmol/L.

B. Précision

Variation intra-essai :

Niveau	Coefficient de variation (% CV)	N
35.4 pmol/L	4.1%	24
162.6 pmol/L	4.2%	24

Variation inter-essai :

Niveau	Coefficient de variation (% CV)	N
40.0 pmol/L	6.0%	10
177.4 pmol/L	4.0%	10

C. Exactitude

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concentration théorique (pmol/L)	Concentration mesurée (pmol/L)
A	1/1	145.71	145.71
	1/2	72.86	73.65
	1/4	36.43	40.57
	1/8	18.21	21.79
	1/16	9.11	10.79
B	1/1	46.78	46.78
	1/2	23.39	23.11
	1/4	11.70	12.76
	1/8	5.85	4.84

Les échantillons ont été dilués avec le tampon d'analyse.

D. Spécificité

Les réactions croisées suivantes ont été observées :

Composé	Réaction croisée (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulphatée	87.8
Gastrin-34	83.1
CCK-8	40.4
Gastrin 1-14	< 0.01
Gastrin releasing peptide	<0.01

E. Interférence

L'effet des substances interférentes potentielles sur les échantillons à l'aide du test DIASource Gastrin RIA a été évalué. Différents niveaux d'hémoglobine, de bilirubine conjuguée, de bilirubine non conjuguée et de triglycérides ont été testés sur des échantillons présentant différentes concentrations de gastrine. Notre critère d'acceptation était d'avoir une interférence inférieure à 10 %. Les substances testées n'ont pas affecté les performances du test DIASource Gastrin RIA.

Substance	Concentration en Gastrin (pmol/L)	Concentration en Interferent (mg/dL)	Variation Moyenne %
Hémoglobine	38.8	500	+1.0 %
		250	
	168.0	500	
		250	
Bilirubine non conjuguée	41.2	15	+4.5%
		10	
	159.4	15	
		10	
Bilirubine conjuguée	38.8	2	-2.1%
		0.4	
	168.0	2	
		0.4	
Triglycéride	49.4	250	+0.7%
		50	
	160.8	250	
		50	

XIII. CONTROLE QUALITE 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. Contrôles

Les concentrations mesurées doivent être situées dans les limites indiquées sur les étiquettes des flacons.

2. Coups totaux

Les coups obtenus doivent correspondre environ au CPM prévu une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu

en gastrine ¹²⁵I de cette trousse donnera 25 000 CPM à la date d'activité de référence (efficacité du comptage = 80 %).

3. Liaison maximale (Bo/TOT)

Calculer pour chaque analyse le pourcentage de radioactivité liée pour le calibrateur zéro :
Bo... x 100
TOT

4. Liaison non spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque analyse le pourcentage de liaison non spécifique :
NSB x 100
TOT
La liaison non spécifique est inférieure à 5 %.

5. Pente de la courbe de calibration

Par exemple, surveiller les points 80, 50 et 20 % de la courbe de calibration pour vérifier la reproductibilité de série à série.

XIV. PRECAUTIONS ET MISES EN GARDE

Sécurité

Pour la recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

La réglementation étant susceptible de varier d'un pays à l'autre, il est essentiel que la personne responsable du laboratoire soit familiarisée avec la réglementation locale du moment concernant tous les aspects des matériaux radioactifs du type et de la quantité utilisés dans cette analyse.

Cette trousse contient des composants d'origine humaine. Ils ont été testés par analyse immunologique. Ils sont négatifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B, les anticorps anti-HCV et les anticorps anti-HIV-1 et HIV-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 I¹²⁵ (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 faut stocker le matériel radioactif dans des zones spécialement conçues à cet effet, et de manière générale, non accessibles au personnel non autorisé.
- La manipulation de matériel radioactif 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 doit être interdit de boire, manger ou fumer dans les endroits où du matériel radioactif est utilisé.
- Il faut se protéger les mains en portant des gants et il faut les laver après l'utilisation de matériel radioactif.
- Il faut travailler sur une surface recouverte d'un matériau absorbant jetable.
- Les éclaboussures de matériel radioactif doivent être immédiatement éliminées et tout le matériel contaminé jeté dans les déchets radioactifs. Les surfaces contaminées doivent être nettoyées à l'aide d'un détergent.

Les réactifs de cette trousse 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. Lors de l'évacuation des réactifs dans les canalisations d'évacuation des eaux usées, toujours rincer abondamment à l'eau pour 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 d'hydroxyde de sodium à 10 %.

XV. BIBLIOGRAPHIE

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.

2. Stadil, F. , and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.

3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.

4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.

5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.

6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.

7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.

8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.

9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.

10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenyphophysis.
Nature 271:771, 1978.

12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells.
J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.

13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L.-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs.
J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.

14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones.
in: Gastrointestinal Hormones.
Editor: George B. Jerzy Glass.
Raven Press, New York (1980).

15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.

16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI. RESUME DU PROTOCOLE

	Comptage total	NSB	Calibrateurs (0-6)	Contrôles	Échantillons
Calibrateurs	-	-	100 µL	-	-
Contrôles	-	-	-	100 µL	-
Échantillon	-	-	-	-	100 µL
Diluant de dosage	-	300µL	-	-	-
Antisérum	-	-	200 µL		
Mélanger au vortex et incubé pendant 60 min entre 18 et 25°C.					
Traceur I ¹²⁵	200 µL				
Mélanger au vortex et incubé pendant 60 min entre 18 et 25°C.					
PEG double anticorps	-	500 µL			
Mélanger au vortex et incubé pendant 30 à 60 min entre 18 et 25°C.					
Centrifuger pendant 15 min (1700 x g) à 4°C					
Décanter et compter la radioactivité des précipités.					

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

Gastrin-RIA

I. VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunoassay für die quantitative *In-vitro* -Messung von Gastrin in menschlichem Serum.
Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. Handelsbezeichnung:** DIAsource Gastrin-RIA
- B. Katalognummer:** MD302RUO: 100 Tests
- C. Hersteller:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:

Tel.: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. HINTERGRUND

Gastrin und die Vagusnerven sind die Hauptregulatoren der Magensäuresekretion. Zur Magensäuresekretion tragen jedoch andere Faktoren als Gastrin bei. Die Gastrinproduktion erfolgt im Wesentlichen in der antropylorischen Magenschleimhaut. Einige Gastrin produzierende Zellen sind unter Umständen auch im Zwölffingerdarm und in der Bauchspeicheldrüse vorhanden.

Gastrin kommt im menschlichen Serum in vielen verschiedenen Formen vor. Ein amidierter C-Terminus ist für die biologische Aktivität der Gastrine ausschlaggebend.

Progastrin wird von Preprogastrin gespalten. Es hat sich gezeigt, dass Progastrin in den Tyrosinresten teilweise sulfatiert ist. Das Progastrin wird enzymatisch in die wichtigsten zirkulierenden Formen von biologisch aktivem Gastrin gespalten: Gastrin-34 und Gastrin-17, die in sulfatierten und nicht sulfatierten Formen vorkommen. Geringe Mengen von Gastrin-52 (auch Komponente 1 genannt), Gastrin-14 (Mini-Gastrin) und noch kleinere Fragmente wurden im Serum nachgewiesen.

IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE

Gastrin im Serum wird in einem kompetitiven Radioimmunoassay unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums bestimmt. Das Antiserum ist gegen Gastrin-17 gerichtet und mit Rinderserumalbumin konjugiert. Bei der Bindung an die Antikörper konkurriert Gastrin in Kalibratoren und Proben mit ¹²⁵I-markiertem Gastrin-17. In einem zweistufigen Inkubationsprotokoll bindet ¹²⁵I-Gastrin in einem umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von Gastrin in Kalibratoren und Proben. Antikörpergebundenes ¹²⁵I-Gastrin wird unter Verwendung der doppelten Antikörper-Polyethylenglykol-Präzipitationstechnik von der ungebundenen Fraktion getrennt. Die Radioaktivität der Präzipitate wird gemessen. Das in diesem Assay verwendete Antiserum zeigt eine Kreuzreaktion mit Gastrin-34 und den sulfatierten Formen von Gastrin-17. Für den professionellen Einsatz innerhalb eines Labors. Das Ergebnis darf nicht für die klinische Diagnose oder das Patientenmanagement verwendet werden.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	100 Tests Kit	Rekonstitution		
[ANTISERUM] Kaninchen-Antiserum gegen synthetisches menschliches Gastrin-17 konjugiert mit Rinderserumalbumin. Verdünnungsmittel: Phosphatpuffer, humanes Serumalbumin und Natriumazid (<0,1 %).	1 Fläschchen 21mL	Gebrauchsfertig		
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵Jodmarkiertes Gastrin in Phosphatpuffer mit humanem Serumalbumin und NaN₃.	Ag	¹²⁵ I	1 Fläschchen lyophilisiert 66 kBq	25 ml destilliertes Wasser hinzufügen
Ag	¹²⁵ I			
[Ab PEG] Doppel-Antikörper-PEG: Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig Antiserum in Phosphatpuffer mit humanem Serumalbumin und Natriumazid. (<0,1 %). Enthält Polyethylenglycol	1 Fläschchen 50 ml	Gebrauchsfertig		
[ASS BUF] Assay-Puffer: Phosphatpuffer, der humanes Serumalbumin und Natriumazid enthält (<0,1 %).	1 Fläschchen 40 ml	Gebrauchsfertig		
[CAL] Gastrin-Kalibrator in Phosphatpuffer, der humanes Serumalbumin und Natriumazid enthält (<0,1 %).	1 Fläschchen lyophilisiert	Mit destilliertem Wasser mit dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumen rekonstituieren		
[CONTROL N] Kontrolle – N = 1 oder 2 Lyophilisierte Kontrollen mit zwei verschiedenen Gastrinkonzentrationen.	2 Fläschchen lyophilisiert	1 ml destilliertes Wasser hinzufügen		

VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Einweg-Reagenzgläser 11–13 x 55 mm, Polystyrol.
2. Pipetten mit Einwegspitzen, 100, 200 und 500 µl.
3. Eine Repetierpipette, z.B. Eppendorf Multipipette, für die Volumina 200 und 500 µl erleichtert die Dosierung der Reagenzien.
4. Vortexmischer.
5. Zentrifuge, für min 1700 x g geeignet (bevorzugt wird eine gekühlte Zentrifuge).
6. Gamma-Zähler, Kavitätstyp.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Antiserum:** Gebrauchsfertig. Bei 2– 8 °C lagern.
- B. **¹²⁵I-Gastrin:** Mit 25 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Bei 2– 8 °C lagern.
- C. **Doppel-Antikörper-PEG:** Gebrauchsfertig. Vor der Anwendung gründlich durchmischen. Bei 2- 8 °C lagern.
- D. **Assay-Puffer:** Gebrauchsfertig. Bei 2– 8 °C lagern.
- E. **Gastrinkalibrator:** Mit destilliertem Wasser mit dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumenrekonstituieren. Zur Vorbereitung funktionierender Kalibratoren siehe das Radioimmunassay-Verfahren. Zur Wiederverwendung bei -18 °C oder kühler lagern.
- F. **Kontrollen:** Jedes Fläschchen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren
Zur Wiederverwendung bei -18 °C oder kühler lagern.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien vor der Rekonstitution und Verwendung bei 2–8 °C lagern. Die Stabilität der Reagenzien ist auf den Etiketten der Fläschchen angegeben. Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die nicht rekonstituierten Reagenzien. Die rekonstituierten Reagenzien haben eine Haltbarkeit von 8 Wochen.
Das für die Rekonstitution der lyophilisierten Reagenzien verwendete Wasser sollte in einer Ganzglasapparatur destilliert werden oder von entsprechender Reinheit sein. Den Inhalt durch sanfte Inversion in einem Fläschchen auflösen und Schaumbildung vermeiden.

IX. PROBENENTNAHME

Die Probanden sollten mindestens zehn Stunden vor der Probenentnahme nüchtern bleiben. Venenblut wird ohne Zusatzstoffe in Röhrchen gesammelt. Die Probe wird in einem Eisbad abgekühlt und gerinnen gelassen. Das Serum wird durch Zentrifugieren bei +4 °C getrennt.
Das Serum sollte innerhalb von 4 Stunden eingefroren und bis zur Untersuchung bei -18 °C oder kühler gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

X. VERFAHREN

A. **Hinweise zur Handhabung**
Die Reagenzien wie angegeben rekonstituieren.
Die Reagenzien sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Genauigkeit bei allen Pipettierschritten ist unerlässlich. Alle Tests (Kalibratoren, Kontrollen und Proben) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Ein kompletter Testansatz beinhaltet:
Kalibratoren: 7 Konzentrationen, 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 und 500 pmol/l.
Kontrollen: Niedrig und hoch.
Proben.
Röhrchen zur Bestimmung der nicht spezifischen Bindung (NSB-Röhrchen)
Röhrchen zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität (TOT-Röhrchen).

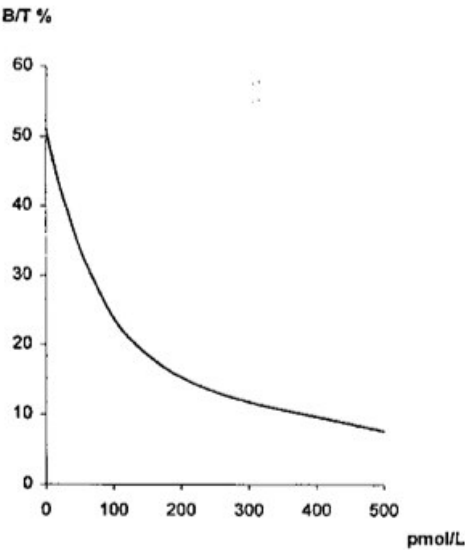
- B. **Verfahren**
1. Die lyophilisierten Reagenzien entsprechend den Anweisungen rekonstituieren und die Reagenzien Raumtemperatur erreichen lassen.
 2. Die Gastrin-Arbeitskalibratoren durch Verdünnung des Gastrinkalibrators 500 pmol/l mit Assay-Puffer wie folgt aufbereiten:
 - a. Gastrinkalibrator nach der Rekonstitution = 500 pmol/l
 - b. 1,0 ml Kalibrator 500 pmol/l + 1,0 ml Assay-Puffer = 250 pmol/l
 - c. 1,0 ml Kalibrator 250 pmol/l + 1,0 ml Assay-Puffer = 125 pmol/l
 - d. 1,0 ml Kalibrator 125 pmol/l + 1,0 ml Assay-Puffer = 62,5 pmol/l
 - e. 1,0 ml Kalibrator 62,5 pmol/l + 1,0 ml Assay-Puffer = 31,2 pmol/l
 - f. 1,0 ml Kalibrator 31,2 pmol/l + 1,0 ml Assay-Puffer = 15,6 pmol/l
 - g. Assay-Puffer = 0 pmol/l(Die Kalibratoren bei -20 °C oder kühler lagern, wenn sie wiederverwendet werden sollen).
 3. 100 µl Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
 4. 300 µl Assay-Puffer in die NSB-Röhrchen pipettieren.
 5. Pipettieren Sie 200 µL Anti-Gastrin in alle Röhrchen außer NSB und TOT.
 6. Die Röhrchen vorsichtig mit dem Vortexmischer durchmischen und 60 Min. bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
 7. Pipettieren Sie 200 µl ¹²⁵I-Gastrin in alle Röhrchen. Die TOT-Röhrchen werden verschlossen und beiseite gestellt.
 8. Die Röhrchen vorsichtig mit dem Vortexmischer durchmischen und 60 Min. bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren.
 9. Allen Röhrchen außer TOT 500 µl gut gemischtes Doppel-Antikörper-PEG hinzugeben. Vorsichtig mit dem Vortexmischer durchmischen und 30-60 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
 10. Bei mindestens 1700 x g, Temperatur 4 °C, 15 Minuten zentrifugieren.

11. Den Überstand unmittelbar nach dem Zentrifugieren dekantieren und die Radioaktivität in den Präzipitaten mit einem Gammazähler messen.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die durchschnittliche Zählrate (CPM) des NSB von der Zählrate (CPM) der Kalibrator-, Kontroll- und Probenreplikate substrahieren. Eine Kalibrierkurve wird durch Auftragen der gebundenen Fraktion B/TOT gegen die Konzentrationen der Gastrinkalibratoren erstellt. Die Gastrinkonzentrationen der Kontrollen und Proben aus der erstellten Kalibrierkurve interpolieren. Die Kalibrierkurve und die Berechnung der Gastrinkonzentrationen in den Proben können mit einer Computermethode durchgeführt werden. Es kann ein Spline-Verfahren verwendet werden.

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrierkurve verwendet werden.



XII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

A. Nachweisgrenze

Der LoB (limit of blank) wurde durch 22 Messungen des Blindwertes berechnet und ergibt sich aus dem Mittelwert - 2 Standardabweichungen der Verteilung der Testwerte. Der LoB-Wert wurde mit 6,3 pmol/L berechnet.

Die LoD (Limit of Detection) wurde als LoB + 1,645 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration berechnet, die in 10 verschiedenen Läufen getestet wurde. Die LoD wurde auf 10 pmol/L berechnet.

Der LoQ (Limit of Quantification) wurde berechnet, indem 4 Proben mit niedrigen Werten 10-mal getestet wurden. Der LoQ wurde auf 11,6 pmol/L berechnet.

B. Präzision

Intra-Assay-Variation

Spiegel	Variationskoeffizient (%CV)	N
35.4 pmol/L	4.1%	24
162.6 pmol/L	4.2%	24

Inter-Assay-Variation

Spiegel	Variationskoeffizient (%CV)	N
40.0 pmol/L	6.0%	10
177.4 pmol/L	4.0%	10

C. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konzentration (pmol/L)	Gemessene Konzentration (pmol/L)
A	1/1	145.71	145.71
	1/2	72.86	73.65
	1/4	36.43	40.57
	1/8	18.21	21.79
	1/16	9.11	10.79
B	1/1	46.78	46.78
	1/2	23.39	23.11
	1/4	11.70	12.76
	1/8	5.85	4.84

Die Proben wurden mit dem Assaypuffer verdünnt.

D. Spezifität

Es wurden folgende Kreuzreaktionen festgestellt:

Stoff	Kreuzreaktion (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulfatiert	87.8
Gastrin-34	83.1
CCK-8	40.4
Gastrin 1-14	< 0.01
Gastrinfreisetzendes Peptid	<0.01

E. Interferenz

Die Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen auf Proben, die mit dem DIASource Gastrin RIA-Test untersucht wurden, wurden bewertet. Verschiedene Hämoglobinwerte, konjugiertes Bilirubin, nicht konjugiertes Bilirubin und Triglyceride wurden an Proben mit unterschiedlichen Gastrin-Konzentrationen getestet. Unser Akzeptanzkriterium war eine Interferenz von weniger als 10 %. Die getesteten Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Leistung des DIASource Gastrin RIA-Tests

Substanz	Gastrine Konzentration (pmol/L)	Konzentration von Interferenz (mg/dL)	Mittlere prozentuale Variation (%)
Hämoglobin	38.8	500	+1.0 %
		250	
	168.0	500	
		250	
Nicht konjugiertes Bilirubin	41.2	15	+4.5%
		10	
	159.4	15	
		10	
Konjugiertes Bilirubin	38.8	2	-2.1%
		0.4	
	168.0	2	
		0.4	
Triglycerid	49.4	250	+0.7%
		50	
	160.8	250	
		50	

XIII. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Um es dem Labor zu ermöglichen, die konsistente Durchführung des Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, sollten die folgenden wichtigen Faktoren überprüft werden.

1. Kontrollen

Die gefundenen Konzentrationen der Kontrollen sollten innerhalb der auf den Etiketten der Fläschchen angegebenen Grenzwerte liegen.

2. Gesamtzahl der Zählungen

Die erhaltenen Zählungen sollten sich dem erwarteten CPM annähern, wenn sie um die Gegenwirksamkeit und den radioaktiven Zerfall bereinigt werden. Der

Gehalt an ¹²⁵I-Gastrin in diesem Kit ergibt zum Referenzdatum 25000 CPM (-5, + 20 %) (Zähleffizienz = 80 %).

3. Maximale Bindung (Bo/TOT)

Für jeden Assay die im Null-Kalibrator gebundene Radioaktivität in % berechnen:
$$\frac{Bo}{TOT} \times 100$$

4. Nicht spezifische Bindung (NSB/TOT)

Für jeden Assay die nicht-spezifische Bindung in % berechnen:
$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

Der nicht-spezifische Anteil beträgt weniger als 5 %.

5. Steigung der Kalibrierkurve

Die 80 %-, 50 %- und 20 %-Punkte der Kalibrierkurve z. B. auf Reproduzierbarkeit von Durchlauf zu Durchlauf überwachen.

XIV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

Da die Vorschriften von Land zu Land unterschiedlich sein können, ist es notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person(en) mit den geltenden örtlichen Vorschriften in Bezug auf alle Aspekte radioaktiver Materialien der bei diesem Test verwendeten Art und Menge vertraut ist bzw. sind.
Dieses Kit enthält Mischungsbestandteile menschlichen Ursprungs. Sie wurden mittels Immunassay auf Hepatitis-B-Oberflächenantigenen, Antikörper gegen HCV und auf Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden.
Dieses Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tage), die ionisierende X- (28 keV) und γ- (35,5 keV) Strahlen emittieren. Es sollten Maßnahmen ergriffen werden, um die ordnungsgemäße Handhabung des radioaktiven Materials gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften sicherzustellen. Nur autorisiertes Personal sollte Zugang zu den Reagenzien haben.
Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sind beim Umgang mit radioaktiven Materialien zu beachten:

- Radioaktives Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert werden, die normalerweise für unbefugtes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material sollte nur in genehmigten Bereichen durchgeführt werden.
- Es sollte darauf geachtet werden, dass Verschlucken und Kontakt mit Haut und Kleidung vermieden wird. Radioaktive Lösungen nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Verwendung von radioaktivem Material darf weder gegessen, getrunken oder geraucht werden
- Die Hände sollten durch Handschuhe geschützt und nach der Verwendung radioaktiver Materialien gewaschen werden.
- Die Arbeiten sollten auf einer Oberfläche durchgeführt werden, die mit absorbierendem Einwegmaterial bedeckt ist.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort entfernt und alle kontaminierten Materialien als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Oberflächen sollten mit einem Reinigungsmittel gereinigt werden.

Die Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid. Der Kontakt mit Kupfer- oder Bleiabflussrohren kann zur kumulativen Bildung von hochexplosiven Azidablagerungen führen. Bei der Entsorgung der Reagenzien im Abwasser stets mit reichlich Wasser spülen, wodurch die Bildung von Metallazid verhindert wird. Rohrleitungen, bei denen der Verdacht besteht, dass sie mit diesen explosiven Ablagerungen kontaminiert sind, sollten gründlich mit 10%iger Natriumhydroxidlösung gespült werden.

XV. LITERATUR

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.

2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.

3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.

4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.

Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.

5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients. Gut. 14:369, 1973.

6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsöe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.

7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.

8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.

9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.

10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenohypophysis. Nature 271:771, 1978.

12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells.
J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.

13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L.-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs.
J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.

14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones. in: Gastrointestinal Hormones. Editor: George B. Jerzy Glass.
Raven Press, New York (1980).

15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.

16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	Gesamtzahl	NSB	Kalibratoren (0–6)	Kontrollen	Proben
Kalibratoren	-	-	100 µL	-	-
Kontrollen	-	-	-	100 µL	-
Proben	-	-	-	-	100 µL
Assay- Verdünnungsmittel	-	300µL	-	-	-
Antiserum	-	-	200 µL		
Mit dem Vortexmixer durchmischen und 60 Minuten bei 18-25 °C inkubieren					
¹²⁵ I-Tracer	200 µL				
Mit dem Vortexmixer durchmischen und 60 Minuten bei 18-25 °C inkubieren					
Doppel- Antikörper-PEG	-	500 µL			
Mit dem Vortexmixer durchmischen und 30-60 Minuten bei 18-25 °C inkubieren					
15 Min. (1700 g) bei 4 °C zentrifugieren					
Abgießen und Radioaktivität der Präzipitate messen					

Andere Übersetzungen dieser Gebrauchsanweisung können von unserer Website heruntergeladen werden: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

Gastrin-RIA

I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* della gastrina nel siero umano.
Solo per uso di ricerca. Non utilizzare nelle procedure diagnostiche.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome brevettato :** DIAsource Gastrin-RIA
- B. Numero di catalogo :** MD302RUO : 100 tests
- 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. ANTEFATTO

La gastrina e l'attività del nervo vago sono i regolatori principali della secrezione acida da parte dello stomaco, ma anche altri fattori possono influenzare tale secrezione. Il sito principale di produzione della Gastrina è la mucosa dell'antrum dello stomaco, ma alcune cellule gastrino secernenti si possono trovare anche nel duodeno e nel pancreas. La gastrina può essere presente nel siero in forme diverse, ma la presenza di un gruppo amidico all'estremità C-terminale della molecola, sembra essere essenziale per l'attività biologica della Gastrina.

Dal precursore preprogastrina viene liberata la progastrina, parzialmente solfatata nei residui tirosinici; per idrolisi enzimatica dalla progastrina viene prodotta la gastrina biologicamente attiva, gastrina-34 e gastrina-17, che possono essere sia solfatate che non solfatate. Nel siero si possono trovare anche piccole quantità di gastrina-52 (chiamata anche componente 1), gastrina-14 (mini gastrina) e piccoli frammenti peptidici.

IV. PRINCIPI DEL METODO

La gastrina nel siero viene dosata mediante un test radioimmunologico competitivo che utilizza un antisiero di coniglio sollevato contro un coniugato di gastrina-17 con sieroalbumina bovina. La gastrina presente nei calibratori e nei campioni compete con la gastrina-17 marcata con 125I per legarsi agli anticorpi. La gastrina 125I si lega in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di gastrina nei calibratori e nei campioni, in un protocollo di incubazione in due fasi. La 125I-gastrina legata agli anticorpi viene separata dalla frazione non legata mediante la tecnica di precipitazione con doppio anticorpo e polietilenglicole. La radioattività dei precipitati viene misurata. L'antisiero utilizzato in questo test reagisce in modo incrociato con la gastrina-34 e le forme solfatate della gastrina-17.

Per uso professionale in laboratorio.

Il risultato non deve essere utilizzato per la diagnosi clinica o la gestione del paziente.

V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	Kit per 100 test	Ricostruzione
[ANTISERUM] Anticorpo anti gastrina da coniglio preparato usando come immunogeno gastrina-17 coniugata con albumina bovina. Diluente: tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala 21mL	Pronto all'uso
Ag 125I TRACCIANTE : Gastrina¹²⁵Iodo in tampone fosfato con albumina di siero umano e NaN3.	1 fiala liofilizzato 66 kBq	Aggiungere 25 mL di acqua distillata
[Ab PEG] PEG doppio anticorpo : Anticorpo anti IgG di coniglio da capra in tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%). Contiene glicole polietilenico	1 fiala 50 mL	Pronto all'uso
[ASS BUF] Tampone del test : tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala 40 mL	Pronto all'uso
[CAL] Calibratore Gastrina in tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala liofilizzato	Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala
[CONTROL N] Controllo - N = 1 o 2 Controlli liofilizzati con due diversi livelli di Gastrina.	2 fiale liofilizzato	Aggiungere 1 mL di acqua distillata

VI. NON IN DOTAZIONE

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

- 1. Tubi usa e getta in polietilene 11-13x55 mm
- 2. Pipette con punte usa e getta: 100, 200 e 500 µL
- 3. Una pipetta ripetitiva, ad es. Eppendorf Multi Pipette, per volumi 200 e 500 µL faciliterà l'erogazione dei reagenti.
- 4. Agitatore a vortice
- 5. Centrifugare, refrigerati con minimo 1700 x g
- 6. Contatore Gamma

VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

- A. **Antiserum** : Pronto all'uso . Conservare a 2-8° C.
- B. **¹²⁵I-gastrina**: Ricostituire con 25 mL di acqua distillata. Conservare a 2-8° C.
- C. **PEG doppio anticorpo** : Pronto all'uso. Miscelare accuratamente prima dell'uso. Conservare a 2-8° C.
- D. **Tampone del test** : Pronto all'uso . Conservare a 2-8° C.
- E. **Calibratore Gastrina** : Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala. Per la preparazione di calibratori funzionanti con Gastrina, v. la procedura di dosaggio radioimmunologico.
- F. **Controllo**: Ricostituire con 1 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.

VIII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

Conservare i reattivi prima della ricostituzione a 2-8°C. La stabilità dei reattivi è riportata sull'etichetta di ciascun flacone; per i reattivi liofilizzati la data riportata si riferisce alla scadenza prima della ricostituzione. I reattivi ricostituiti sono stabili se conservati come prescritto, per almeno 8 settimane, ma non oltre la data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Ricostituire i reattivi con acqua bidistillata. Risospendere i reattivi ricostituiti per inversione evitando la formazione di schiuma.

IX. RACCOLTA DI CAMPIONI

I soggetti devono essere a digiuno da almeno 10 ore prima del prelievo. Raccogliere i campioni in provette senza anticoagulante. Porre immediatamente il campione in bagno di acqua e ghiaccio. Separare il siero per centrifugazione a 4°C. Portare entro 4 ore il siero a -18°C o a temperature inferiori fino al momento del dosaggio. Evitare ripetuti cicli di congelamento – scongelamento dei campioni.

X. PROCEDURA

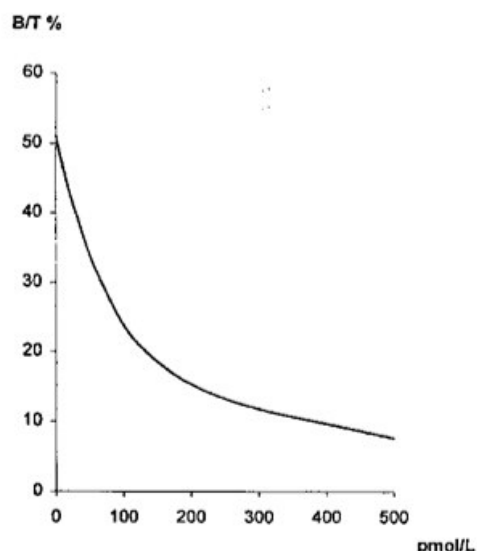
- A. **Note sulla manipolazione**
Ricostituire i reagenti come specificato. I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. È essenziale eseguire il pipettaggio con precisione. Tutti i test (calibratori, controlli e campioni) devono essere eseguiti in duplicati.
Un test completo comprende:
Calibratori: 7 diverse concentrazioni; 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 pmol/L.
Controlli: due controlli a concentrazione bassa e elevata di gastrina. Campioni.
Tubi per la determinazione del legame non specifico (tubi NSB).
Tubi per la determinazione della radioattività totale aggiunta (tubi TOT).

- B. **Procedura**
 - 1. Ricostituire i reagenti come specificato. Prima dell'uso portare i reattivi a temperatura ambiente
 - 2. Preparare i calibratori di lavoro Gastrina diluendo 500 pmol/L i calibratore Gastrina con il diluente del calibratore secondo la seguente tabella
 - a. Calibratore gastrina dopo ricostituzione = 500 pmol/L
 - b. 1.0 mL calibratore 500 pmol/L + 1.0 mL tampone = 250 pmol/L
 - c. 1.0 mL calibratore 250 pmol/L + 1.0 mL tampone = 125 pmol/L
 - d. 1.0 mL calibratore 125 pmol/L + 1.0 mL tampone = 62.5 pmol/L
 - e. 1.0 mL calibratore 62.5 pmol/L + 1.0 mL tampone = 31.2 pmol/L
 - f. 1.0 mL calibratore 31.2 pmol/L + 1.0 mL tampone = 15.6 pmol/L
 - g. Tampone = 0 pmol/L(Conservare i calibratori a -20 ° C o inferiori se riutilizzati)
 - 3. Pipettare 100 µL di calibratore, controlli e campioni nei tubi rispettivi.
 - 4. Pipettare 300 µL di tampone nelle tubi NSB.
 - 5. Pipettare 200 µL di anti-Gastrina in tutte le provette ad eccezione di NSB TOT.
 - 6. Agitare su vortex e incubare 60 minuti a temperatura ambiente (18-25°C).
 - 7. Pipettare 200 µL di 125I-Gastrina in tutte le provette. Le provette TOT vengono tappate e tenute da parte.
 - 8. Agitare su vortex e incubare 60 minuti a temperatura ambiente (18-25°C).
 - 9. Aggiungere 500 µL di PEG doppio anticorpo a tutti i tubi eccetto i tubi TOT. Agitare su vortex e incubare 30-60 min. a temperatura ambiente
 - 10. Centrifugare i tubi per 15 min. a 4°C (1700 x g).
 - 11. Eliminare immediatamente il surnatante per decantazione. Misurare la radioattività del precipitato, frazione legata, di tutti i tubi per almeno due minuti in un contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Sottrarre il conteggio medio (CPM) dei tubi leganti non specifici dal conteggio (CPM) dei replicati di calibratori, controlli e campioni.
- Una curva di calibrazione viene generata tracciando il CPM precipitato, la frazione legata in CPM o %B/TOT rispetto alla concentrazione di calibratori Gastrina.
- Interpolare le concentrazioni di Gastrina nei campioni e controlli dalla curva di calibrazione generata..
- La curva di calibrazione e il calcolo delle concentrazioni in campioni e controlli può anche essere eseguita con metodo computerizzato.

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



XII. ESECUZIONE E LIMITI

A. Limite di rilevamento

Il LoB (limite del bianco) è stato calcolato misurando il bianco 22 volte ed è stato calcolato come media - 2 deviazioni standard della distribuzione dei valori del test. Il LoB è stato calcolato pari a 6,3 pmol/L.

Il LoD (Limite di rilevamento) è stato calcolato come LoB + 1,645 deviazione standard di un campione a bassa concentrazione analizzato in 10 corse diverse. Il LoD è stato calcolato pari a 10 pmol/L.

Il LoQ (Limite di quantificazione) è stato calcolato analizzando 4 campioni a bassa concentrazione per 10 volte. Il LoQ è stato calcolato pari a 11,6 pmol/L.

B. Precisione

Variazione intra-test

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
35.4 pmol/L	4.1%	24
162.6 pmol/L	4.2%	24

Variazione inter-test

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
40.0 pmol/L	6.0%	10
177.4 pmol/L	4.0%	10

C. Accuratezza

PROVA DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pmol/L)	Concentrazione misurata (pmol/L)
A	1/1	145.71	145.71
	1/2	72.86	73.65
	1/4	36.43	40.57
	1/8	18.21	21.79
	1/16	9.11	10.79
B	1/1	46.78	46.78
	1/2	23.39	23.11
	1/4	11.70	12.76
	1/8	5.85	4.84

I campioni sono stati diluiti con il tampone del test.

D. Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

Composto	Reazione incrociata (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulphated	87.8
Gastrin-34	83.1
CCK-8	40.4
Gastrin 1-14	< 0.01
Gastrin releasing peptide	<0.01

D. Interferenza

È stato valutato l'effetto di potenziali sostanze interferenti sui campioni utilizzando il test DIASource Gastrin RIA. Su campioni con diverse concentrazioni di gastrina sono stati analizzati diversi livelli di emoglobina, bilirubina coniugata, bilirubina non coniugata e trigliceridi. I nostri criteri di accettazione prevedevano un'interferenza inferiore al 10%. Le sostanze testate non hanno influito sulle prestazioni del test DIASource Gastrin RIA.

Sostanza	Concentrazione gastrica (pmol/L)	Concentrazione di interferente (mg/dL)	Variazione % media
Emoglobina	38.8	500	+1.0 %
		250	
	168.0	500	
		250	
Bilirubina non coniugata	41.2	15	+4.5%
		10	
	159.4	15	
		10	
Bilirubina coniugata	38.8	2	-2.1%
		0.4	
	168.0	2	
		0.4	
Trigliceridi	49.4	250	+0.7%
		50	
	160.8	250	
		50	

XIII. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Per 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. 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

Gastrina ¹²⁵I in questo kit darà 25000 CPM (-5, +20%) alla data di riferimento dell'attività (efficienza del conteggio = 80%).

3. Legame massimo (Bo/TOT)

Calcolare per ogni test la % di radioattività legata nel calibratore zero:
 $\frac{Bo}{TOT} \times 100$

4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:
 $\frac{NSB}{TOT} \times 100$
Il legame non specifico deve essere inferiore a 5%.

5. Discesa della curva di calibrazione

Per esempio, monitorare i punti a 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità interfase.

XIV. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Solo per uso di ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche

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 ¹²⁵I (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 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.

XV. BIBLIOGRAFIA

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.

2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay. Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.

3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin. Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.

4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.

5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients. Gut. 14:369, 1973.

6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum. Gut. 15:102, 1974.

7. Rehfeld, J.F.

Radioimmunoassay of gastrin. In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.

8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome. Lancet 2:1200, 1972.

9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity. Regulatory Peptides. 2:333, 1981.

10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenohypophysis. Nature 271:771, 1978.

12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells. J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.

13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L.-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs. J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.

14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones. in: Gastrointestinal Hormones. Editor: George B. Jerzy Glass. Raven Press, New York (1980).

15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.

16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibratori	-	-	100 µL	-	-
Controlli	-	-	-	100 µL	-
Campioni	-	-	-	-	100 µL
Tompone	-	300µL	-	-	-
Antiserio	-	-	200 µL		
Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 60min a 18-25°C					
Tracciatore ¹²⁵ I	200 µL				
Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 60min a 18-25°C					
Double antibody PEG	-	500 µL			
Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 30-60min a 18-25°C					
Centrifugare 15 min (1700 g a 4°C)					
Decantare e misurare la radioattività del precipitato					

Lea todo el protocolo antes del uso.

Gastrin-RIA

I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la medición cuantitativa in vitro de la gastrina en serum humano.

Sólo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Número de catálogo:** MD302RUO : 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

La gastrina y los nervios vagales son los principales reguladores de la secreción de ácido gástrico. Sin embargo, además de la gastrina, hay otros factores que contribuyen a la secreción de ácido gástrico. El principal lugar donde se produce la gastrina es la mucosa antro pilórica del estómago. En el duodeno y en el páncreas también se puede encontrar una cantidad reducida de células productoras de gastrina.

En el suero humano, la gastrina se da en muchas formas distintas. La forma amidada C-terminal es fundamental para la actividad biológica de las gastrinas.

La progastrina se segmenta a partir de la preprogastrina. Se ha constatado que la progastrina está parcialmente sulfatada en los residuos de la tirosina. Las enzimas segmentan la progastrina en las principales formas circulantes de gastrina biológicamente activa: gastrina-34 y gastrina-17, que se dan en forma sulfatada y no sulfatada. En el suero se han detectado pequeñas cantidades de gastrina-52 (también conocida como componente 1), gastrina-14 (mini-gastrina) e incluso fragmentos de menor tamaño.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La gastrina en suero se analiza mediante un radioinmunoanálisis competitivo utilizando un antisuero de conejo planteado contra un conjugado de gastrina 17 y albúmina sérica bovina. La gastrina de los calibradores y muestras compite con la gastrina-17 marcada con I ¹²⁵ en la fijación a los anticuerpos. La 125I-gastrina se une en proporción inversa a la concentración de gastrina en los calibradores y las muestras, en un protocolo de incubación de dos pasos. La gastrina I ¹²⁵ fijada a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada mediante una técnica de precipitación de doble anticuerpo con glicol polietilénico. A continuación se mide la reactividad de los precipitados. El antisuero utilizado en este ensayo presenta reacciones cruzadas con la gastrina-34 y las formas sulfatadas de la gastrina-17 y la gastrina-34.

Para uso profesional dentro del laboratorio.

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

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 100 pruebas	Reconstitución
[ANTISERUM] Antisuero de conejo enfrentado a gastrina 17 humana sintética, conjugado con albúmina de suero bovino. Diluyente: tampón fosfato, albúmina de suero humano y azida sódica (<0,1%).	1 vial 21 ml	Listo para usar
Ag I¹²⁵ TRAZADOR: Gastrina marcada con yodo ¹²⁵ en tampón fosfato con albúmina de suero humano y NaN ₃ .	1 vial lío­filizado 66 kBq	Añadir 25 ml de agua destilada
[Ab PEG] Doble anticuerpo con PEG: Antisuero Ig de cabra anticonejo tampón fosfato con albúmina de suero humano y azida sódica. (<0,1%). Contiene glicol polietilénico	1 vial 50 ml	Listo para usar
[ASS BUF] Tampón del ensayo: tampón fosfato que contiene albúmina de suero humano y azida sódica (<0,1%).	1 vial 40 ml	Listo para usar
[CAL] Calibrador de gastrina en tampón de fosfato que contiene albúmina de suero humano y azida sódica (<0,1%).	1 vial lío­filizado	Reconstituir con agua destilada según el volumen indicado en la etiqueta del vial
[CONTROL N] Control - N = 1 o 2 Controles liofilizados con dos niveles diferentes de gastrina.	2 viales lío­filizado	Añadir 1 ml de agua destilada

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

Los siguientes materiales son necesarios pero no se proporcionan con el kit:

1. Tubos de ensayo de poliestireno desechables de 11-13 x 55 mm.
2. Pipetas con puntas desechables, 100, 200 y 500 µl.
3. Una pipeta de repetición, p. ej., una Eppendorf Multipipette, para volúmenes de 200 y 500 µl facilitará la distribución de los reactivos.
4. Agitador.
5. Centrífuga, capacidad de 100 x g por minuto (preferentemente una centrífuga refrigerada).
6. Contador gama de pozo.

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. Antisuero: Listo para usar. Conservar a 2-8 °C.
- B. Gastrina I¹²⁵: Reconstituir con 25 ml de agua destilada. Conservar a 2-8 °C.

- C. Doble anticuerpo-PEG: Listo para usar. Mezclar bien antes de utilizarlo. Conservar a 2-8 °C.
- D. Tampón del ensayo: Listo para usar. Conservar a 2-8 °C.
- E. Calibrador de gastrina: Reconstituir con agua destilada según el volumen indicado en la etiqueta del vial.. Para la preparación de los calibradores de trabajo, consultar el procedimiento del radioinmunoensayo. Conservar a -18 °C o temperatura inferior en caso de reutilización.
- F. Controles: Reconstituir todos los viales con 1 ml de agua destilada. Conservar a -18 °C o temperatura inferior en caso de reutilización.

VIII. ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

Conservar todos los reactivos a 2-8 °C antes de reconstituirlos y usarlos. La estabilidad de los reactivos se indica en las etiquetas de los viales. En lo que respecta a los reactivos liofilizados, la fecha de caducidad es válida para los reactivos no reconstituidos. Los reactivos reconstituidos son estables durante 8 semanas si se almacenan correctamente.

El agua utilizada para la reconstitución de los reactivos liofilizados debe destilarse en un aparato que sea enteramente de vidrio o que tenga la pureza correspondiente. Disolver el contenido en los viales invirtiéndolos con suavidad y evitando que se forme espuma.

IX. RECOGIDA DE MUESTRAS

Los sujetos deben estar en ayunas por lo menos durante 10 horas antes de la recogida de muestras. La sangre venosa se recoge en tubos sin aditivos. La muestra se enfria inmediatamente en un baño de hielo y se deja coagular. El suero se separa por centrifugación a +4 °C.

El suero debe congelarse en un plazo máximo de 4 horas y conservarse a -18 °C o a temperatura inferior hasta ser analizado. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

X. PROCEDIMIENTO

- A. Manipulación
- Reconstituir los reactivos tal como se especifica.
- Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos. La precisión es fundamental en todos los pasos que implican pipetear. Todas las pruebas (calibradores, controles y muestras) deben hacerse por duplicado. Un ensayo completo incluye:
- Calibradores: 7 concentraciones, 0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 y 500 pmol/l
- Controles: Bajo y alto.
- Muestras.
- Tubos para la determinación de la fijación no específica (tubos NSB).
- Tubos para la determinación de la radiactividad total añadida (tubos TOT).

- B. Procedimiento
1. Reconstituir los reactivos liofilizados de acuerdo con las instrucciones y esperar a que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Preparar los calibradores de trabajo de gastrina diluyendo el calibrador de Gastrina de 500 pmol/l con el tampón del ensayo de acuerdo con el siguiente ejemplo:

a. Calibrador de gastrina después de la reconstitución = 500 pmol/l

b. 1,0 ml calibrador 500 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 250 pmol/l

c. 1,00 ml calibrador 250 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 125 pmol/l

d. 1,00 ml calibrador 125 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 62,5 pmol/l

e. 1,00 ml calibrador 62,5 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 31,2 pmol/l

f. 1,00 ml calibrador 31,2 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 15,6 pmol/l

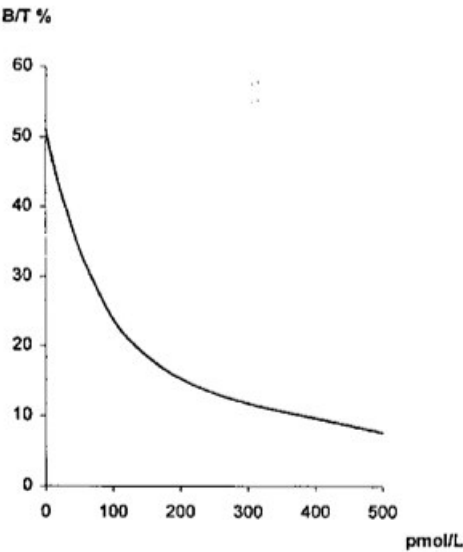
g. Tampón del ensayo = 0 pmol/l

(Conservar los calibradores a -20 °C o temperatura inferior en caso de reutilización).
3. Pipetear 100 µl de los calibradores, controles y muestras en sus respectivos tubos.
4. Pipetear 300 µl del tampón del ensayo en los tubos NSB.
5. Pipetear 200 µl de antigastrina en todos los tubos excepto NSB y TOT.
6. Agitar con cuidado los tubos e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
7. Pipetear 200 µl de 125I-Gastrina en todos los tubos. Los tubos TOT se tapan y se reservan.
8. Agitar con cuidado los tubos e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
9. Añadir 500 µl del doble anticuerpo PEG bien mezclado a todos los tubos excepto a los tubos TOT. Agitar con cuidado e incubar durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar durante 15 minutos a 1700 x g como mínimo, a una temperatura de 4 °C.
11. Decantar los sobrenadantes inmediatamente después de la centrifugación, y contar la radiactividad de los precipitados mediante un contador gamma.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Restar la media de la tasa de recuento (CPM) del NSB de la tasa de recuento (CPM) de los duplicados de los calibradores, controles y muestras.
- Se puede obtener una curva representando gráficamente la fracción fijada B/TOT en función de las concentraciones de los calibradores de gastrina.
- Interpolan las concentraciones de gastrina de los controles y muestras a partir de la curva de calibración obtenida.
- La curva de calibración y el cálculo de las concentraciones de las muestras también se puede realizar utilizando un programa informático. También puede utilizarse un método spline.

Los siguientes datos solo se muestran a modo de ejemplo y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración en tiempo real.



XII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Sensibilidad

El LoB (límite de blanco) se calculó midiendo el blanco 22 veces y se calculó como la Media - 2 Desviaciones Estándar de la distribución de los valores de prueba . Se calculó que el LoB era de 6,3 pmol/L.

El LoD (Límite de Detección) se calculó como el LoB + 1.645 de desviación estándar de una muestra de baja concentración analizada en 10 corridas diferentes. Se calculó que el LoD era de 10 pmol/L

El LoQ (Límite de Cuantificación) se calculó probando 4 muestras de valores bajos, 10 veces. El LoQ se calculó en 11.6 pmol/L

B. Precisión

Variación intraensayo

Nivel	Coficiente de variación (%CV)	N
35.4 pmol/L	4.1%	24
162.6 pmol/L	4.2%	24

Variación interensayo

Nivel	Coficiente de variación (%CV)	N
40.0 pmol/L	6.0%	10
177.4 pmol/L	4.0%	10

C. Precisión

PRUEBA DE DILUCIÓN			
Muestra	Dilucion	Concentración Teórica (pmol/L)	Concentración medida (pmol/L)
A	1/1	145.71	145.71
	1/2	72.86	73.65
	1/4	36.43	40.57
	1/8	18.21	21.79
	1/16	9.11	10.79
B	1/1	46.78	46.78
	1/2	23.39	23.11
	1/4	11.70	12.76
	1/8	5.85	4.84

Las muestras se diluyeron con el tampón de ensayo.

D. Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

Compuesto	Reacción cruzada (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulphated	87.8
Gastrin-34	83.1
CCK-8	40.4
Gastrin 1-14	< 0.01
Gastrin releasing peptide	<0.01

E. Interferencia

Se evaluó el efecto de las posibles sustancias que interfieren en las muestras utilizando la prueba DAsource Gastrin RIA. Se analizaron diferentes niveles de hemoglobina, bilirrubina conjugada, bilirrubina no conjugada y triglicéridos en muestras con diferentes concentraciones de gastrina. Nuestro criterio de aceptación fue tener una interferencia de menos del 10%. Las sustancias analizadas no afectaron el rendimiento de la prueba DAsource Gastrin RIA.

Sustancia	Concentración de gastrina (pmol/L)	Concentración de Interferente (mg/dL)	Variación % media
Hemoglobina	38.8	500	+1.0 %
		250	
	168.0	500	
		250	
Bilirrubina no conjugada	41.2	15	+4.5%
		10	
	159.4	15	
		10	
Bilirrubina conjugada	38.8	2	-2.1%
		0.4	
	168.0	2	
		0.4	
Triglicéridos	49.4	250	+0.7%
		50	
	160.8	250	
		50	

XIII. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para que el laboratorio pueda monitorizar completamente el rendimiento consistente del radioinmunoensayo, deben comprobarse los siguientes factores importantes.

1. Controles

Las concentraciones detectadas en los controles deben estar dentro de los límites que figuran en las etiquetas de los viales.

2. Recuentos totales

Los recuentos totales obtenidos deben aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficiencia del recuento y el deterioro radiactivo. El contenido de gastrina I¹²⁵ de este kit dará un recuento total de 25 000 CPM (-5 , +20%) en la fecha de referencia (eficacia de recuento = 80%).

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

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

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

Calcular para cada ensayo el porcentaje de fijación no específica:

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

La fijación no específica es menos del 5%.

5. Pendiente de la curva de calibración

Por ejemplo, monitorizar los puntos 80, 50 y 20% de la línea de calibración para controlar la reproducibilidad entre ensayos.

XIV. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Sólo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico.

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 I¹²⁵ (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 zonas especialmente designadas para tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en zonas autorizadas.
- Debe tenerse mucho cuidado para evitar la ingestión del material y el contacto del material con la piel y la ropa. No pipetear soluciones radiactivas con la boca.
- En los lugares donde se está utilizando material radiactivo, debe estar prohibido beber, comer o fumar.
- Las manos se deben proteger con guantes y deben lavarse después de utilizar materiales radiactivos.
- El trabajo se debe realizar sobre una superficie cubierta de un material absorbente desechable.
- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente y todos los materiales contaminados deben ser eliminados como residuos radiactivos. Las superficies contaminadas deben limpiarse con detergente.

Los reactivos de este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando depósitos acumulados de azida altamente explosivos. Al eliminar los reactivos por el desagüe, verter siempre abundantes cantidades de agua para evitar la formación de azidas metálicas. Las tuberías que se sospeche se han contaminado con estos depósitos explosivos deben limpiarse a fondo con una solución del 10% de hidróxido de sodio.

XV. REFERENCIAS

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.

2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.

3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.

4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.

5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.

6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsöe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.

7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, págs. 145-148.

8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.

9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.

10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenohypophysis.
Nature 271:771, 1978.

12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells.
J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.

13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs.
J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.

14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones.
in: Gastrointestinal Hormones.
Editor: George B. Jerzy Glass.
Raven Press, New York (1980).

15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.

16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibradores (0-6)	Controles	Muestras
Calibradores	-	-	100 µL	-	-
Controles	-	-	-	100 µL	-
Muestras	-	-	-	-	100 µL
Diluyente del ensayo	-	300µL	-	-	-
Antisero	-	-	200 µL		
Agitar e incubar durante 60 minutos a 18-25 °C.					
Trazador I ¹²⁵	200 µL				
Agitar e incubar durante 60 minutos a 18-25 °C.					
Doble anticuerpo-PEG	-	500 µL			
Agitar e incubar durante 30-60 minutos a 18-25 °C.					
Centrifugar durante 15 minutos (1700 g) a 4 °C					
Decantar y contar la radiactividad de los precipitados					

Desde nuestro sitio web se pueden descargar otras traducciones de estas Instrucciones de uso: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Przed użyciem należy zapoznać się z treścią całego protokołu.

Gastrin-RIA

I. PRZEZNACZENIE

Test radioimmunologiczny do pomiaru ilościowego *in vitro* gastryny w surowicy ludzkiej.

Wyłącznie do użytku badawczego. Nie do użytku w procedurach diagnostycznych.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa handlowa:** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Numer katalogowy:** MD302RUO: 100 testów
- C. **Producent:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-La-Neuve, Belgium.

W celu uzyskania wsparcia technicznego lub informacji na temat składania zamówień prosimy o kontakt:

Tel.: +32 (0) 10 84 99 11

Faks: +32 (0) 10 84 99 91

III. TŁO

Gastryna i nerwy błędne są głównymi regulatorami wydzielania kwasu żołądkowego. Niemniej jednak do wydzielania kwasu żołądkowego przyczyniają się inne czynniki niż gastryna. Głównym miejscem wytwarzania gastryny jest błona śluzowa żołądka. Nieliczne komórki wytwarzające gastrynę można również znaleźć w dwunastnicy i trzustce.

Gastryna występuje w wielu różnych postaciach w surowicy ludzkiej. Aktywność biologiczną gastryn warunkuje amidowany C-końcowy fragment.

Progastryna jest odszczepiana od preprogastryny. Wykazano, że progastryna jest częściowo siarczanowana w resztach tyrozynowych. Progastryna ulega enzymatycznemu odszczepieniu do głównych krążących form aktywnej biologicznie gastryny: gastryny-34 i gastryny-17, które występują w formie siarczanowanej i niesiarczanowanej. W surowicy wykryto niewielkie ilości gastryny-52 (zwanej również składnikiem 1), gastryny-14 (mini-gastryna) i jeszcze mniejszych fragmentów.

IV. ZASADY METODY

Gastrynę w surowicy oznacza się za pomocą kompetycyjnego testu radioimmunologicznego z wykorzystaniem surowicy odpornościowej królika wyhodowanej przeciwko koniugatowi gastryny 17 z albuminą surowicy bydłowej. Gastryna w kalibratorach i próbkach konkuruje ze znakowaną ¹²⁵I gastryną-17 w wiązaniu się z przeciwciałami. Gastryna ¹²⁵I wiąże się w odwrotnej proporcji do stężenia gastryny w kalibratorach i próbkach, w dwuetapowym protokole inkubacji. Związana z przeciwciałem gastryna ¹²⁵I jest oddzielana od niezwiązanej frakcji przy użyciu techniki wytrącania podwójnym przeciwciałem – glikolem polietylenowym. Dokonuje się pomiaru promieniotwórczości osadów. Surowica odpornościowa wykorzystana w tym teście reaguje krzyżowo z gastryną-34 i siarczanowymi postaciami gastryny-17.

Do użytku profesjonalnego w laboratorium.

Wyniku nie wykorzystuje się do rozpoznania klinicznego ani w leczeniu pacjentów.

V. ODCZYNNIKI ZAWATE W ZESTAWIE

Odczynniki	Zestaw 100 testów	Odtworzenie		
[ANTISERUM] Surowica odpornościowa królika wyhodowana przeciwko koniugatowi gastryny 17 z albuminą surowicy bydłowej. Rozcieńczalnik: bufor fosforanowy, albumina surowicy ludzkiej i azydek sodu (< 0,1 %).	1 fiolka 21 ml	Postać gotowa do użycia		
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ZNACZNIK: Gastryna znakowana jodem ¹²⁵ w buforze fosforanowym z albuminą surowicy ludzkiej i NaN₃.	Ag	¹²⁵ I	1 fiolka liofilizowana a 66 kBq	Dodać 25 ml wody destylowanej
Ag	¹²⁵ I			
[Ab PEG] Podwójne przeciwciało-PEG: Kozia surowica odpornościowa przeciwko przeciwciałom króliczym Ig w buforze fosforanowym z albuminą surowicy ludzkiej i azydkiem sodu. (< 0,1 %). Zawiera glikol polietylenowy	1 fiolka 50 ml	Postać gotowa do użycia		
[ASS BUF] Bufor testowy: bufor fosforanowy zawierający albuminę surowicy ludzkiej i azydek sodu, (< 0,1 %).	1 fiolka 40 ml	Postać gotowa do użycia		
[CAL] Kalibrator gastryny w buforze fosforanowym zawierającym albuminę surowicy ludzkiej i azydek sodu (< 0,1 %).	1 fiolka liofilizowana a	Odtwarzać wodą destylowaną do objętości podanej na etykiecie fiolki		
[CONTROL N] Kontrola - N = 1 lub 2 Liofilizowane kontrole z dwoma różnymi poziomami gastryny.	2 fiolki liofilizowane e	Dodać 1 ml wody destylowanej		

VI. MATERIAŁY NIE DOSTARCZONE

Następujące materiały są wymagane ale nie zawarte w zestawie:

1. Probówki testowe jednorazowego użytku 11-13 x 55 mm, polistyrenowe.
2. Pipety z końcówkami jednorazowego użytku, 100, 200 i 500 µl.
3. Pipeta powtarzalna, np. pipeta wielokanałowa Eppendorf, dla objętości 200 i 500 µl ułatwi dozowanie odczynników.
4. Mieszarka Vortex.
5. Wirówka o wydajności min. 1 700 x g (preferowana wirówka chłodzona).
6. Licznik promieniowania gamma typu dołkowego.

VII. SPORZĄDZENIE ODCZYNNIKA

- A. **Surowica odpornościowa:** Postać gotowa do użycia. Przechowywać w temp. 2–8 °C.
- B. **Gastryna ¹²⁵I:** Odtwarzać 25 ml wody destylowanej. Przechowywać w temp. 2–8 °C.
- C. **Podwójne przeciwciało-PEG:** Postać gotowa do użycia. Dokładnie wymieszać przed użyciem. Przechowywać w temp. 2–8 °C.
- D. **Bufor testowy:** Postać gotowa do użycia. Przechowywać w temp. 2–8 °C.
- E. **Kalibrator gastryny:** Odtwarzać wodą destylowaną do objętości podanej na etykiecie fiolki. Aby sporządzić kalibratory robocze, patrz procedura testu radioimmunologicznego.
Przechowywać w temp. -18 °C lub niższej w przypadku ponownego użycia.
- F. **Kontrola:** Odtwarzać każdą fiolkę z wykorzystaniem 1 ml wody destylowanej.
Przechowywać w temp. -18 °C lub niższej w przypadku ponownego użycia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I USTALANIE DATY WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

Przed odtworzeniem i użyciem wszystkie odczynniki należy przechowywać w temp. 2–8 °C. Stabilność odczynników jest podana na etykietach fiolek. W przypadku odczynników liofilizowanych data ważności dotyczy odczynników nieodtworzonych. Odtworzone odczynniki pozostają niezmienione w swoich właściwościach przez 8 tygodni, o ile są prawidłowo przechowywane.

Woda wykorzystywana do odtworzenia liofilizowanych odczynników powinna być destylowana w całkowicie szklanej aparaturze lub mieć odpowiednią czystość.

Zawartość fiolki należy rozpuścić przez delikatne odwrócenie. Unikać spienienia.

IX. POBIERANIE PRÓBEK

Osoby badane powinny być na czczo co najmniej dziesięć godzin przed pobraniem próbki. Krew żylną pobiera się do próbek bez dodatków. Probkę schładza się w łaźni lodowej i pozostawia do skrzepnięcia. Surowicę oddziela się przez odwirowanie w temp. +4 °C.

Surowicę należy zamrozić w ciągu 4 godzin i przechowywać w temperaturze -18 °C lub niższej do czasu oznaczenia. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.

X. PROCEDURA

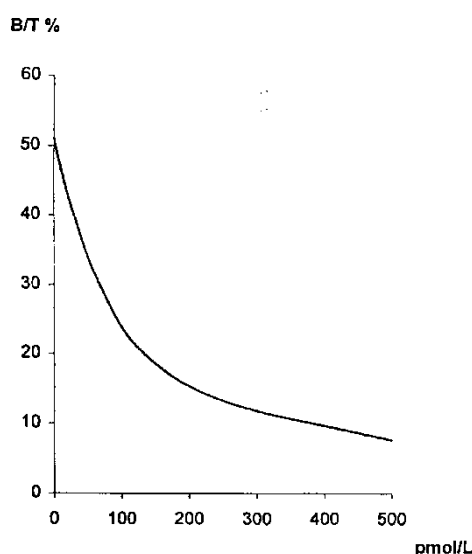
- A. **Uwagi dotyczące obchodzenia się z zestawem**
Odtworzyć odczynniki zgodnie ze wskazówkami.
Przed użyciem odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Dokładność we wszystkich etapach pipetowania ma zasadnicze znaczenie. Wszystkie testy (kalibratory, kontrole i próbki) należy wykonywać w powtórzeniu. Kompletny test zawiera:
Kalibratory: 7 stężeń, 0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 i 500 pmol/l.
Kontrola: niska i wysoka.
Próbki.
Próbówki do oznaczania wiązania nieswoistego (próbówki NSB).
Próbówki do oznaczania promieniotwórczości całkowitej (próbówki TOT).
- B. **Procedura**
 1. Odtworzyć liofilizowane odczynniki zgodnie z instrukcjami i odczekać, aż osiągną temperaturę pokojową.
 2. Sporządzić kalibratory robocze gastryny przez rozcieńczenie kalibratora gastryny 500 pmol/l buforem testowym zgodnie z przykładem zamieszczonym poniżej:
 - a. Kalibrator gastryny po odtworzeniu = 500 pmol/l
 - b. 1,0 ml kalibratora 500 pmol/l + 1,0 ml bufora testowego = 250 pmol/l
 - c. 1,0 ml kalibratora 250 pmol/l + 1,0 ml bufora testowego = 125 pmol/l
 - d. 1,0 ml kalibratora 125 pmol/l + 1,0 ml bufora testowego = 62,5 pmol/l
 - e. 1,0 ml kalibratora 62,5 pmol/l + 1,0 ml bufora testowego = 31,2 pmol/l
 - f. 1,0 ml kalibratora 31,2 pmol/l + 1,0 ml bufora testowego = 15,6 pmol/l
 - g. Bufor testowy = 0 pmol/l(Przechowywać kalibratory w temp. -20 °C lub niższej w przypadku ponownego użycia).
 3. Przenieść pipetą 100 µl kalibratorów, kontroli i próbek do odpowiednich próbek.
 4. Przenieść pipetą 300 µl bufora testowego do próbek NSB.
 5. Przenieść pipetą 200 µl anty-gastryny do wszystkich próbek z wyjątkiem NSB i TOT.
 6. Zworteksować mieszaninę i inkubować przez 60 min w temperaturze pokojowej (18–25 °C).
 7. Przenieść pipetą 200 µl gastryny ¹²⁵I do wszystkich próbek. Probówki TOT są zamykane i odkładane na bok.
 8. Zworteksować mieszaninę i inkubować przez 60 min w temperaturze pokojowej (18–25 °C).

9. Dodać 500 µl dobrze wymieszanego podwójnego przeciwciała-PEG do wszystkich próbek z wyjątkiem TOT. Ostrożnie wortexować i inkubować przez 30–60 minut w temperaturze pokojowej.
10. Wirować przez 15 minut z prędkością co najmniej 1700 x g, w temperaturze 4 °C.
11. Zdekantować supernatant natychmiast po odwirowaniu i zliczyć promieniotwórczość w osadach za pomocą licznika promieniowania gamma.

XI. OBLICZENIE WYNIKÓW

- Odcząć średnią liczbę zliczeń (CPM) NSB od liczby zliczeń (CPM) powtarzalnych kalibratorów, kontroli i próbek.
- Krzywą wzorcową generuje się poprzez wykreślenie frakcji związanej, B/TOT względem stężeń kalibratorów gastryny.
- Interpolować stężenia gastryny w kontrolach i próbkach z wygenerowanej krzywej wzorcowej.
- Krzywą kalibracji i obliczenie stężeń w próbkach można wykonać komputerowo. Można zastosować metodę splajn.

Poniższe dane mają jedynie charakter poglądowy i nigdy nie powinny być używane zamiast krzywej wzorcowej w czasie rzeczywistym.



XII. WYDAJNOŚĆ I OGRANICZENIA

A. Wartość graniczna wykrywania

LoB (wartość graniczną ślepej próby) obliczono poprzez 22-krotny pomiar ślepej próby i obliczono jako średnią - 2 odchylenia standardowe rozkładu wartości testowych. Obliczono, że LoB wynosi 6,3 pmol/l.

LoD (wartość graniczną wykrywania) obliczono jako LoB + 1,645 odchylenia standardowego próbki o niskim stężeniu testowanej w 10 różnych analizach. Obliczono, że LoD wynosi 10 pmol/l.

LoQ (wartość graniczną oznaczania ilościowego) obliczono poprzez 10-krotne testowanie 4 próbek o niskich wartościach. Obliczono, że LoQ wynosi 11,6 pmol/l.

B. Precyzja

Zmienność w obrębie testów

Poziom	Współczynnik zmienności (% CV)	N
35,4 pmol/l	4,1 %	24
162,6 pmol/l	4,2 %	24

Zmienność między testami

Poziom	Współczynnik zmienności (% CV)	N
40,0 pmol/l	6,0 %	10
177,4 pmol/l	4,0 %	10

C. Dokładność

TEST ROZCIEŃCZANIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stężenie teoretyczne (pmol/l)	Zmierzone stężenie (pmol/l)
A	1/1	145,71	145,71
	1/2	72,86	73,65
	1/4	36,43	40,57
	1/8	18,21	21,79
	1/16	9,11	10,79
B	1/1	46,78	46,78
	1/2	23,39	23,11
	1/4	11,70	12,76
	1/8	5,85	4,84

Próbki rozcieńczono buforem testowym.

D. Swistość

Stwierdzono następujące reakcje krzyżowe:

Związek	Reakcja krzyżowa (%)
Gastryna-17	100
Gastryna-17, siarczanowana	87,8
Gastryna-34	83,1
CCK-8	40,4
Gastryna 1-14	< 0,01
Peptyd uwalniający gastrynę	< 0,01

E. Zakłócenie

Dokonano oceny wpływu potencjalnie zakłócających substancji na próbki przy użyciu testu DAsource Gastrin RIA. Różne poziomy hemoglobiny, bilirubiny sprzężonej, bilirubiny niesprzężonej i trójglicerydów zostały zbadane na próbkach o różnych stężeniach gastryny. Naszym kryterium akceptacji było uzyskanie zakłócenia poniżej 10 %. Badane substancje nie miały wpływu na wydajność testu DAsource Gastrin RIA.

Substancja	Stężenie gastryny (pmol/l)	Stężenie substancji zakłócającej (mg/dl)	Średnia zmienność %
Hemoglobina	38,8	500	+1,0 %
		250	
	168,0	500	
		250	
Bilirubina niesprzężona	41,2	15	+4,5 %
		10	
	159,4	15	
		10	
Bilirubina sprzężona	38,8	2	-2,1 %
		0,4	
	168,0	2	
		0,4	
Trójgliceryd	49,4	250	+0,7 %
		50	
	160,8	250	
		50	

XIII. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

Aby umożliwić laboratorium pełne monitorowanie spójnego sposobu przeprowadzania testu radioimmunologicznego, należy sprawdzić wymienione poniżej ważne czynniki.

1. Kontrole

Stwierdzone stężenia w kontrolach powinny mieścić się w wartościach granicznych podanych na etykietach fiolek.

2. Całkowita liczba zliczeń

Po dostosowaniu do wydajności licznika i rozpadu promieniotwórczego uzyskane zliczenia powinny być zbliżone do oczekiwanego CPM. Zawartość gastryny ¹²⁵I w tym zestawie da 25 000 CPM (-5, +20 %) w dniu odniesienia (wydajność zliczania = 80 %).

3. Maksymalne wiązanie (B0/TOT)

Dla każdego testu obliczyć % związanej promieniotwórczości w kalibratorze zerowym:

$$\frac{B0}{TOT} \times 100$$

4. Nieswoiste wiązanie (NSB/TOT)

Obliczyć dla każdego testu % nieswoistego wiązania:

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

Wynosi on mniej niż 5 %.

5. Nachylenie krzywej wzorcowej

Monitorować np. punkty 80, 50 i 20 % krzywej wzorcowej dla odtwarzalności analizy.

XIV. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Wyłącznie do użytku badawczego. Nie do użytku w procedurach diagnostycznych.

Z uwagi na to, że przepisy mogą różnić się w zależności od kraju, istotne jest, aby osoba odpowiedzialna za laboratorium zapoznała się z obecnie obowiązującymi przepisami miejscowymi w zakresie wszystkich aspektów związanych z materiałami promieniotwórczymi danego typu i w ilościach wykorzystywanych w tym teście.

Zestaw ten zawiera składniki pochodzenia ludzkiego. Zostały one przebadane testem immunologicznym na obecność antygenu powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B, przeciwciał przeciwko HCV oraz przeciwciał przeciwko HIV-1 i HIV-2 i uzyskały wynik ujemny. Niemniej jednak należy przestrzegać wszystkich zalecanych środków ostrożności dotyczących obchodzenia się z pochodnymi krwi.

Ten zestaw zawiera ¹²⁵I (okres półtrwania: 60 dni), emitujące promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV). Należy podjąć kroki w celu zapewnienia właściwego obchodzenia się z materiałem promieniotwórczym, zgodnie z miejscowymi i/lub krajowymi przepisami. Dostęp do odczynników powinien mieć wyłącznie upoważniony personel.

Podczas obchodzenia się z materiałami promieniotwórczymi należy przestrzegać następujących środków ostrożności:

- Materiały promieniotwórcze należy przechowywać w specjalnie wyznaczonych miejscach, niedostępnych dla nieupoważnionego personelu.
- Obchodzenie się z materiałami promieniotwórczymi winno odbywać się wyłącznie w zatwierdzonych obszarach.
- Należy zachować ostrożność, aby zapobiec połknięciu i zetknięciu się ze skórą i odzieżą. Nie wciągać roztworów promieniotwórczych do pipety ustami.
- Podczas używania materiałów promieniotwórczych nie wolno pić, jeść ani palić tytoniu.
- Należy chronić dłonie używając rękawic i myć je po użyciu materiałów promieniotwórczych.
- Prace należy wykonywać na powierzchni pokrytej materiałem pochłaniającym jednorazowego użytku.
- Rozsypany materiał promieniotwórczy należy natychmiast usunąć, a wszystkie skażone materiały zutylizować jako odpady promieniotwórcze. Zanieczyszczone powierzchnie należy oczyścić detergentem.

Odczynniki w tym zestawie zawierają azcydek sodu. Zetknięcie się z miedzianymi lub ołowianymi rurami kanalizacyjnymi może skutkować nagromadzeniem się wysoce wybuchowych osadów azydku. Przy odprowadzaniu odczynników do kanalizacji należy zawsze spłukiwać je dużą ilością wody, co zapobiega tworzeniu się azydków metali. Jeżeli istnieje podejrzenie, że instalacja wodno-kanalizacyjna jest zanieczyszczona tymi wybuchowymi osadami, należy ją dokładnie przepłukać 10 % roztworem wodorotlenku sodu.

XV. BIBLIOGRAFIA

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay. Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin. Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients. Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsöe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum. Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F. Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome. Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity. Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.
11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenohypophysis. Nature 271:771, 1978.
12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells. J. Mol. Endocrinol. 1:87, 1988.
13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L.-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs. J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.
14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones.
in: Gastrointestinal Hormones. Editor: George B. Jerzy Glass. Raven Press, New York (1980).
15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.
16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI. STRESZCZENIE PROTOKOŁU

	Ogólna liczba	NSB	Kalibratory (0–6)	Kontrole	Próbki
Kalibratory	-	-	100 µl	-	-
Kontrole	-	-	-	100 µl	-
Próbki	-	-	-	-	100 µl
Rozcieńczalnik do testu	-	300 µl	-	-	-
Surowica odpornościowa	-	-	200 µl		
Zworteksować mieszaninę i inkubować przez 60 min w temp. 18–25 °C					
Znacznik ¹²⁵ I	200 µl				
Zworteksować mieszaninę i inkubować przez 60 min w temp. 18–25 °C					
Podwójne przeciwciało PEG	-	500 µl			
Zworteksować mieszaninę i inkubować przez 30–60 min w temp. 18–25 °C					
Wirować przez 15 min (1700 g) w temp. 4 °C					
Zdekantować i policzyć promieniotwórczość osadów.					

Inne tłumaczenia niniejszej Instrukcji obsługi można pobrać z naszej strony internetowej: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Pročitati ceo protokol pre upotrebe

Gastrin-RIA

I. NAMENA

Radioimunološki test za *in vitro* kvantitativno merenje gastrina u humanom serumu.
Samo za istraživačku upotrebu. Nije za upotrebu u dijagnostičkim procedurama.

II. OPŠTE INFORMACIJE

- A. **Zaštićeni naziv :** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Kataloški broj :** MD302RUO : 100 testsova
- C. **Proizvođač :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgija.

Za tehničku pomoć ili informacije o poručivanju pozovite:
Tel: +32 (0) 10 84 99 11 Faks: +32 (0) 10 84 99 91

III. SLIKA

Gastrin i vagalni nervi su glavni regulatori izlučivanja želudačne kiseline. Međutim, i drugi faktori pored gastrina doprinose lučenju želudačne kiseline. Osnovno mesto gde se proizvodi gastrin jeste antropilorična sluznica želuca. Određeni broj ćelija koje proizvode gastrin se mogu naći u dvanaestopalačnom crevu i pankreasu.

Gastrin se javlja u više različitih oblika u humanom serumu. Amidirani C - terminal je od suštinskog značaja za biološku aktivnost gastrina.

Progastrin se odvaja od preprogastrina. Pokazalo se/dokazano je da je progastrin delimično sulfatiran u tirozinskim ostacima. Progastrin se enzimatski odvaja u glavne cirkulišuće oblike biološki aktivnog gastrina: gastrin-34 i gastrin-17, koji se javljaju u sulfatiranim i nesulfatiranim oblicima. Male količine gastrina-52 (takođe označen kao komponenta 1), gastrina-14 (mini gastrin) pa čak i manji fragmenti su bili primećeni u serumu.

IV. PRINCIPI METAODA

Gastrin u serumu se određuje kompetitivnim radioimunološkim testom koristeći zečji antiserum u odnosu na konjugat gastrina 17 govedeg serumskog albumina. Gastrin u kalibratorima i uzorci se takmiče sa gastrinom-17 označenim sa ¹²⁵I u vezivanju sa antitelima. ¹²⁵I-gastrin se vezuje u obrnutoj proporciji koncentracije gastrina u kalibratorima i uzorcima. ¹²⁵I-gastrin se vezuje u obrnutoj proporciji sa koncentracijom gastrina u kalibratorima i uzorcima, u protokolu inkubacije u dva koraka. Meri se radioaktivnost taloga. Antiserum korišćen u ovom određivanju unakrsno reaguje sa gastrinom-34 i sulfatiranim oblicima gastrina-17 i gastrina-34. Za profesionalnu upotrebu u laboratoriji. Rezultat se ne smije koristiti za kliničku dijagnozu ili liječenje pacijenata.

V. OBEZBEĐENI REAGENSI

Reagensi	100 paketa za testiranje	Rastvaranje		
[ANTISERUM] Zečji antiserum upotrebljen u odnosu na sintetički humani gastrin-17 konjugovan sa goveđim serumskim albuminom. Razblaživač: fosfatni pufer, humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).	1 bočica 21mL	Spremnno za upotrebu		
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> INDIKATOR: ¹²⁵Jod-Gastrin u fosfatnom puferu sa humanim serumskim albuminom i NaN₃ (natrijum azid).	Ag	¹²⁵ I	1 bočica liofilizovan 66 kBq	Dodati 25 ml destilovane vode
Ag	¹²⁵ I			
[Ab PEG] Dvostruko antitelo-PEG: Protiv zečji Ig antiserum kože u fosfatnom puferu sa humanim serumskim albuminom i natrijum azidom. (<0.1%). Sadrži polietilen glikol	1 bočica 50 mL	Spremnno za upotrebu		
[ASS BUF] Određivanje pufera: fosfatni pufer koji sadrži humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).	1 bočica 40 mL	Spremnno za upotrebu		
[CAL] Kalibrator gastrina u fosfatnom puferu koji sadrži humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).	1 bočica liofiliziran	Rekonstituirajte destiliranom vodom prema zapremini navedenoj na etiketi bočice		
[KONTROLA N] Kontrola - N = 1 ili 2 Kontrolni materijal za liofiliziranje sa dva različita nivoa gastrina.	2 bočice liofiliziran	Dodati 1 ml destilovane vode		

VI. NISU OBEZBEĐENE ZALIHE

- Dole navedeni materijal je potreban ali nije obezbeđen u pakovanju:
- Epruvete za jednokratnu upotrebu 11-13 x 55 mm, polistiren.
 - Pipete sa vrhovima za jednokratnu upotrebu, 100, 200 i 500 µL.
 - Pipete za višekratnu upotrebu, npr. Eppendorf Multipipette za zapreminu od 200 i 500 µL će olakšati doziranje reagenasa.
 - Vorteks mikser.
 - Centrifuga sa najmanje 1700 x g (poželjna je hladena centrifuga).
 - Gajgerov brojač za male uzorke

VII. PRIPREMA REAGENSA

- Antiserum** : Spremnno za upotrebu. Čuvati na temperaturi od 2-8° C.
- ¹²⁵I-gastrin**: Rastvoriti u 25 ml destilovane vode. Čuvati na temperaturi od 2-8° C.
- Dvostruko antitelo PEG**: Spremnno za upotrebu. Dobro promućkati pre upotrebe. Čuvati na temperaturi od 2-8° C.
- Testni pufer**: Spremnno za upotrebu. Čuvati na temperaturi od 2-8° C.
- Kalibrator gastrina**: Rekonstituirajte destiliranom vodom prema zapremini navedenoj na etiketi bočice. Za pripremu kalibratora, videti proceduru radioimunološkog testiranja. Čuvati na temperaturi od -18° C ili nižoj u slučaju ponovne upotrebe.
- Kontrola**: Rastvoriti sadržaj svake bočice u 1 ml destilovane vode. Čuvati na temperaturi od -18° C ili nižoj u slučaju ponovne upotrebe.

VIII. ČUVANJE I ROK UPOTREBE REAGENASA

Čuvati sve reagense na temperaturi od 2-8° C pre rastvaranja i upotrebe. Stabilnost reagenasa je naznačena na deklaracijama na bočicama. Za liofilizirane reagense, rok upotrebe je isti kao i za nerastvorene reagense. Rastvoreni reagensi su stabilni 8 nedelja ukoliko se čuvaju na adekvatan način. Voda koja se koristi za rastvaranje liofiliziranih reagenasa treba da je destilovana i u staklenoj ambalaži ili da bude odgovarajuće čistoće. Rastvorite sadržaj u bočici laganim mešanjem izbegavajući stvaranje pene.

IX. UZIMANJE UZORAKA

Subjekti treba da ne jedu barem deset sati pre uzimanja uzorka. Krv iz vene skuplja se u epruvetama bez dodataka. Uzorak se hladi u hladnoj vodi i ostavlja se da se zgruša. Serum se izdvaja centrifugiranjem na temperaturi od +4° C. Serum treba zamrznuti u roku od 4 sata i čuvati na temperaturi od -18° C ili nižoj do testiranja. Treba izbegavati ponovno zamrzavanje i odmrzavanje.

X. POSTUPAK

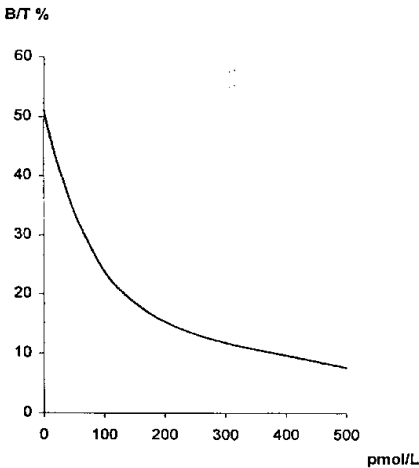
Rastorite naznačene reagense. Reagensi treba da budu dovedeni do sobne temperature pre upotrebe. Tačnost u svim koracima pipetiranja je od suštinskog značaja. Svi testovi (kalibratori, kontrolni materijali i uzorci) treba da se vrše duplo. Kompletno određivanje uključuje: Kalibratori: 7 različitih koncentracija, 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 i 500 pmol/L. Kontrolni materijal: Nizak i visok. Uzorci. Epruvete za određivanje nespecifičnog vezivanja (NSB epruvete). Epruvete za određivanje ukupne radioaktivnosti (TOT epruvete).

- Postupak**
- Rastvorite liofilizirane reagense prema uputstvima i pustite da reagensi dostignu sobnu temperaturu.
- Pripremite kalibratore gastrina rastvaranjem kalibratora gastrina 500 pmol/L sa testnim puferom prema sledećem primeru:
 - Kalibrator gastrina nakon rastvaranja = 500 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora500 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 250 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 250 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 125 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 125 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 62,5 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 62.5 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 31,2 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 31.2 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 15,6 pmol/L
 - testni pufer = 0 pmol/L(Čuvati kalibratore na temperaturi od -20° C ili nižoj u slučaju ponovne upotrebe).
- Pipetirati 100 µL kalibratora, kontrolnog materijala i uzorak u njihove odgovarajuće epruvete.
- Pipetirati 300 µL testnog pufera u NSB-epruvete.
- Pipetirati 200 µL anti-Gastrina u sve epruvete osim NSB i TOT.
- Epruvete pažljivo zavrteti i inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi (18-25° C).
- Pipetirati 200 µL ¹²⁵I-Gastrina u sve epruvete. TOT epruvete imaju zatvorene poklopce i drže se po strani.
- Epruvete pažljivo zavrteti i inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi (18-25° C).
- Dodati 500 µL dobro promešang duplog antitela-PEG u sve epruvete osim TOT epruvete. Pažljivo zavrteti i inkubirati najmanje 30-60 minuta na sobnoj temperaturi.
- Centrifugirati 15 minuta na najmanje 1700 x g, na temperaturi od 4° C.
- Dekantovati supernatant odmah nakon centrifugiranja i zabeležiti radioaktivnost taloga u gama brojaču.

XI. IZRAČUNAVANJE REZULTATA

- Oduzeti prosečnu stopu (CPM) NBS-a od stope (CPM) replika kalibratora, kontrolnih materijala i uzoraka.
- Kalibraciona kriva se generiše crtanjem vezane frakcije, B/TOT u odnosu na koncentracije gastrinovog kalibratora
- Interpolirati koncentracije gastrina kontrolnog materijala i uzoraka u odnosu na generisanu kalibracionu krivu.
- Kalibraciona kriva i cirkulisanje koncentracija u uzorcima se može uraditi putem računara. Može se koristiti i spline metoda.

Dole navedeni podaci služe samo kao primer i nikada se ne smeju koristiti umesto stvarne kalibracione krive.



XII. DEJSTVO I OGRANIČENJA

A. Granica detekcije

LoB (ograničenje slijepog uzorka) je izračunato mjerenjem slijepog uzorka 22 puta i izračunato je kao srednja - 2 standardne devijacije distribucije testnih vrijednosti. LoB je izračunato na 6,3 pmol/L.

LoD (Limit of Detection) je izračunata kao LoB + 1,645 standardne devijacije uzorka niske koncentracije testiranog u 10 različitih serija. LoD je izračunat na 10 pmol/L

LoQ (Limit of Quantification) je izračunat testiranjem 4 uzorka niske vrijednosti, 10 puta. LoQ je izračunat na 11,6 pmol/L

B. Preciznost

Varijacije između testova

Nivo	Koeficijent varijacije (%CV)	N
35.4 pmol/L	4.1%	24
162.6 pmol/L	4.2%	24

Varijacije unutar testa

Nivo	Koeficijent varijacije (%CV)	N
40.0 pmol/L	6.0%	10
177.4 pmol/L	4.0%	10

C. Tačnost

TEST RAZREDIVANJA

uzorak	Razblaživanje	Teorijska koncentracija (pmol/L)	Measured Concentration (pmol/L)
A	1/1	145.71	145.71
	1/2	72.86	73.65
	1/4	36.43	40.57
	1/8	18.21	21.79
	1/16	9.11	10.79
B	1/1	46.78	46.78
	1/2	23.39	23.11
	1/4	11.70	12.76
	1/8	5.85	4.84

Uzorci su razblaženi puferom za ispitivanje

D. Specifičnost

Ustanovljene su sledeće unakrsne reakcije:

Smeša	Unakrsna reakcija (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulphated	87.8
Gastrin-34	83.1
CCK-8	40.4
Gastrin 1-14	< 0.01
Gastrin releasing peptide	<0.01

E. Mešanje

Procenjen je efekat potencijalno interferirajućih supstanci na uzorke korišćenjem DIAsource Gastrin RIA testa. Različiti nivoi hemoglobina, bilirubina konjugiranog, nekonjugiranog bilirubina i triglicerida testirani su na uzorcima s različitim koncentracijama gastrina. Naš kriterijum prihvatanja je bio da imamo smetnje manje od 10%. Ispitane supstance nisu uticale na performanse DIAsource Gastrin RIA testa.

Supstanca	Koncentracija gastrina (pmol/L)	Koncentracija interferenta (mg/dL)	Srednja varijacija u %
Hemoglobin	38.8	500	+1.0 %
		250	
	168.0	500	
		250	
Nekonjugirani bilirubin	41.2	15	+4.5%
		10	
	159.4	15	
		10	
Konjugovani bilirubin	38.8	2	-2.1%
		0.4	
	168.0	2	
		0.4	
Trigliceridi	49.4	250	+0.7%
		50	
	160.8	250	
		50	

XIII. INTERNA KONTROLA KVALITETA

Da bi laboratorija mogla da u potpunosti nadgleda konzistentno vršenje radioimunološkog testa, sledeći važni faktori moraju biti provereni:

1. Kontrolni materijal:

Pronađene koncentracije kontrolnih materijala moraju biti u granicama datim na deklaraciji bočica.

2. Ukupni rezultati

Dobijeni rezultati treba da budu približni očekivanom CPM kada su prilagođeni za efikasnost brojanja i radioaktivni raspad. Sadržaj ¹²⁵I-gastrina u ovom pakovanju daje 25000 CPM (-5, +20%) na naznačeni datum (efikasnost brojanja = 80%).

3. Maksimalno vezivanje (Bo/TOT)

Izračunati sa svaki test procenat vezivanja radioaktivnosti u nultom kalibratoru:
 $\frac{Bo}{TOT} \times 100$

4. Nespecifično vezivanje (NSB/TOT)

Izračunati sa svaki test procenat nespecifičnog vezivanja:
 $\frac{NSB}{TOT} \times 100$
Nespecifično je manje od 5%.

5. Nagib kalibracione krive

Na primer, pratite tačke na 80, 50 i 20% kalibracone krive da bi se pokrenula reproduktivnost.

XIV. PREDOSTROŽNOST I UPOZORENJA

Bezbednost

Samo za istraživačku upotrebu. Nije za upotrebu u dijagnostičkim procedurama.

S obzirom da se propisi razlikuju od zemlje do zemlje, od ključne je važnosti da je odgovorno lice u laboratoriji upoznato sa važećim lokalnim propisima koji se odnose na sve aspekte radioaktivnih materijala koji su iste vrste i kvaliteta kao oni korišćeni u ovom testu.

Ovo pakovanje sadrži sastojke ljudskog porekla. Testirani su imunološkim određivanjem na površinski antigen hepatitisa B, antitela HCB-a i na antitela za HIV-1 i HIV-2 i negativni su na iste. Međutim, trebalo bi poštovati sve mere opreza predviđene za rukovanje derivatima krvi.

Ovo pakovanje sadrži ¹²⁵I (vreme poluraspada: 60 dana), emituje jonizujuće X (28 keV) i (35.5 keV) zračenje. Treba preduzeti odgovarajuće korake kako bi se obezbedilo odgovarajuće rukovanje radioaktivnim materijalom, shodno lokalnim i/ili nacionalnim propisima. Samo ovlašćeno osoblje treba da ima pristup reagensima.

Treba poštovati sledeće mere predostrožnosti kada se rukuje radioaktivnim materijalima:

- radioaktivni materijal treba da se čuva u posebno predviđenom prostorijama koje nisu dostupne neovlašćenom osoblju,
- rukovanje radioaktivnim materijalom treba da se obavlja samo u za to predviđenim prostorijama,
- treba postupati sa pažnjom kako bi se izbeglo gutanje i kontakt sa očima i kožom i odećom. Ne pipetirajte radioaktivne rastvore ustima.
- piće, hrana ili pušenje treba da budu zabranjeni kada se koristi radioaktivni materijal.
- ruke treba da budu zaštićene rukavicama i treba ih oprati nakon korišćenja radioaktivnog materijala.
- rad treba obavljati na površini prekrivenoj upijajućim materijalom za jednokratnu upotrebu.
- ukoliko se radioaktivni materijal prospe, treba ga odmah ukloniti a sav zahvaćeni materijal treba odložiti kao radioaktivni otpad. Zahvaćene površine treba očistiti deterdžentom.

Reagensi u ovom pakovanju sadrže natrijum azid. Kontakt sa bakarnim ili olovnim odvodnim cevima može dovesti do formiranja visoko eksplozivnih depozita azida. Nakon bacanja reagenasa u kanalizaciju, uvek isperite sa obilnom količinom vode, što sprečava formiranje metalnih azida. Odvodne cevi za koje se sumnja da su zahvaćene ovim eksplozivnim depozitima treba temeljno isprati desetoprocenatnim rastvorom natrijum hidroksida.

XV. BIBLIOGRAFIJA

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.

2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.

3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.

4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.

5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.

6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsöe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.

7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.

8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.

9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.

10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenyphophysis.
Nature 271:771, 1978.

12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells.
J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.

13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L.-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs.
J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.

14. Rehfeld, J.F.
Heterogenity of gastrointestinal hormones.
in: Gastrointestinal Hormones.
Editor: George B. Jerzy Glass.
Raven Press, New York (1980).

15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.

16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVI. SADRŽAJ PROTOKOLA

	Ukupni rezultati	NSB	Kalibratori (0-6)	Kontrolni materijal	Uzorci
Kalibratori	-	-	100 µL	-	-
Kontrolni materijal	-	-	-	100 µL	-
Uzorci	-	-	-	-	100 µL
Razblaživač za testiranje	-	300µL	-	-	-
Antiserum	-	-	200 µL		
Promešati u vorteks mikseru i inkubirati 60 minuta na temperaturi od 18-25 °C					
¹²⁵ I indikator	200 µL				
Promešati u vorteks mikseru i inkubirati 60 minuta na temperaturi od 18-25 °C					
Dvostruko antitelo PEG	-	500 µL			
Promešati u vorteks mikseru i inkubirati 30-60 minuta na temperaturi od 18-25 °C					
Centrifugirati 15 minuta (1700g) na 4°C					
Dekantovati i izračunati radioaktivnost taloga					