



GASTRIN-RIA

KIPEMD302



GASTRIN-RIA

en

KIPEMD302

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTRODUCTION

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.

2 CLINICAL CONSIDERATIONS

Gastrin is one of the best studied gut hormones. It occurs in the circulation in several different forms, among those gastrin-34 and gastrin-17, sulphated and non-sulphated.

The determination of gastrin is useful in the diagnosis of gastrin-producing tumours and of achylia with or without pernicious anemia. In all these clinical situations the serum gastrin concentration is high. Treatment with powerful antiseecretagogues may cause a rise in the serum gastrin concentration, because of an impaired acid feedback inhibition of gastrin release. Measurement of serum gastrin can thus be used to monitor the treatment with antiseecretagogues.

Normal level of gastrin in human serum: ≤ 60 pmol/L (fasting level obtained with this procedure).

Mean value: 25 pmol/L $\pm$ 10 pmol/L (1SD).

Range: 11-54 pmol/L.

3 PRINCIPLE OF THE METHOD

The intended use of these reagents is for assay of gastrin in human serum. Gastrin in serum is assayed by a competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against a gastrin 17 albumin conjugate. Gastrin in calibrators and samples compete with ^{125}I -labelled gastrin-17 in binding to the antibodies. ^{125}I -gastrin binds in a reverse proportion to the concentration of gastrin in calibrators and samples. Antibody-bound ^{125}I -gastrin is separated from the unbound fraction using the double antibody-polyethyleneglycol 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 and gastrin-34.

4 PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only. This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

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

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

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.

5 COMPOSITION OF THE REAGENT KIT

Contents of the Kit

The reagents provided in each kit are sufficient for 100 tubes.

1.

REAG	A	Ab
------	---	----

 Rabbit antiserum raised against synthetic human gastrin-17 conjugated to bovine serum albumin, 21 mL antiserum. Diluent : 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25 % human serum albumin and 0.05 % sodium azide.
Colour : yellow.
2.

REAG	B	Ag	¹²⁵ I
------	---	----	------------------

 Contains 66 KBq or 1.8 µCi at the activity reference date. Synthetic human gastrin-17 is iodinated. The monoiodinated form is purified by HPLC.
Specific activity : 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilized in 2.5 mL, 0.5 M phosphate buffer, pH 7.4, with 2.5 % human serum albumin and 0.5 % sodium azide. Contains 0.12 mL normal rabbit serum. Colour : blue. Reconstitution in 25 mL distilled water.
3.

REAG	C	DAb
------	---	-----

 50 mL diluted goat anti-rabbit Ig antiserum in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25 % human serum albumin and 0.05 % sodium azide. Contains 5.0 % (w/v) polyethylene glycol 6000. Colour : red.
4.

REAG	D	ASSAY	BUF
------	---	-------	-----

 40 mL 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, with 0.25 % human serum albumin and 0.05 % sodium azide.
5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 Lyophilized. Concentration after reconstitution : 500pmol/L. The calibrator is produced from synthetic human gastrin-17. Diluted in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4; 0.25 % human serum albumin, 0.05 % sodium azide. Reconstitution in 5.00 mL distilled water.
6.

REAG	F-G	Control
------	-----	---------

 Lyophilized serum pools with low (normal) and high concentration of gastrin. 1.00 mL of each control after reconstitution. See exact values on the vial label.

Equipment required but not provided

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 Multipipette, 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 gammacounter.

Reagent preparation and storage

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 lyophilized 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 lyophilized 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.

Reagent A : Anti-gastrin

Ready for use. Store at 2-8° C.

Reagent B : ¹²⁵I-gastrin

Reconstitute with 25 mL distilled water. Store at 2-8° C.

Reagent C: Double antibody-PEG

Ready for use. Mix thoroughly before use. Store at 2-8° C.

Reagent D: Assay buffer

Ready for use. Store at 2-8° C.

Reagent E : Gastrin calibrator

Reconstitute with 5.00 mL distilled water. For preparation of working calibrators, see radioimmunoassay procedure.
Store at -18° C or lower if reused.

Reagent F-G : Controls

Reconstitute each vial with 1.00 mL distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.

6 SPECIMEN

Specimen collection

Patients 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.

7 ASSAY PROCEDURE

7.1 Procedure

- 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 different 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)**.

For an overview, see section 10.

- Reconstitute the lyophilized reagents according to the instructions on page 7 and allow the reagents to reach room temperature.
- Prepare the Gastrin working calibrators by dilution of the Gastrin calibrator 500 pmol/L (Reagent E) with assay buffer (Reagent D) according to the following example:
 - a. Reagent E 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).
- Pipette 100 µL of calibrators, controls and samples in their respective tubes. Pipette 300 µL assay buffer (Reagent D) into NSB-calibrator-tubes and 200 µL assay buffer into NSB-sample-tubes. Add 100 µL of any sample into the two NSB-sample-tubes.
- Pipette 200 µL of ¹²⁵I-Gastrin (Reagent B) into all tubes. The TOT-tubes are capped and kept aside.
- Pipette 200 µL anti-Gastrin (Reagent A) into all tubes **except** NSB and TOT.
- Vortex the tubes carefully and incubate for 60 min at room temperature (20-25° C).
- Add 500 µL of well mixed double antibody-PEG (Reagent C) into all tubes **except** TOT. Vortex carefully and incubate 30 min at room temperature.
- Centrifuge for 15 minutes at minimum 1700 x g, temperature 4° C.
- Decant the supernatant immediately after centrifugation, and count the radioactivity in the precipitates in a gamma counter.

7.2 Calculations

1. Subtract the average count rate (CPM) of the NSB-calibrator from the count rate (CPM) of the replicates of the calibrators, and NSB-samples from the controls and samples.
2. A calibration curve is generated by plotting the bound fraction, B/TOT against the concentrations of the gastrin calibrators. An example of a calibration curve is given on section 10.
3. Interpolate the gastrin concentrations of the controls and samples from the generated calibration curve.
4. The calibration curve and the calculation of the concentrations in samples can be done by a computer method.

8 ASSAY CHARACTERISTICS

8.1 Sensitivity

The lowest detectable concentration is 5 pmol/L. The figure corresponds to a decrease in binding of two x SD of the bound radioactivity in the zero-concentration calibrator.

8.2 Accuracy

A mean recovery of 97.6% was achieved when known amounts of gastrin in the range 65-222 pmol/L were added to serum samples.

8.3 Precision

8.3.1 Intra Assay Variation

<u>Level</u>	<u>Coefficient of variation (%CV)</u>	<u>N</u>
41 pmol/L	3.0%	20
135 pmol/L	2.2%	20

8.3.2 Inter Assay Variation

<u>Level</u>	<u>Coefficient of variation (%CV)</u>	<u>N</u>
47 pmol/L	7.5%	17
165 pmol/L	6.2%	17

8.4 Specificity

The following cross reactions have been found:

<u>Compound</u>	<u>Cross reaction</u>
Gastrin-17	100.0%
Gastrin-17, sulphated	83 %
Gastrin-34	61 %
CCK-8	36 %
Gastrin 1-14	<0.1 %
Gastrin releasing peptide	<0.01%
Vasoactive intestinal peptide	<0.01%
Motilin	<0.01%
Glucagon	<0.01%
Somatostatin 14	<0.01%
C-peptide	<0.01%

9 QUALITY CONTROL

9.1 The found concentrations of the control sera

(Reagent F and G) must be within the limits given on the labels of the vials.

9.2 Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of ^{125}I -gastrin in this kit will give 25 000 CPM (-5%, +20%) at the activity reference date (counter efficiency = 80%).

9.3 Maximum binding (Bo/TOT)

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

$\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$ is generally 45-65%, when tested at the activity reference date.

9.4 Non-specific binding (NSB/TOT)

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

$\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$ is less than 5%.

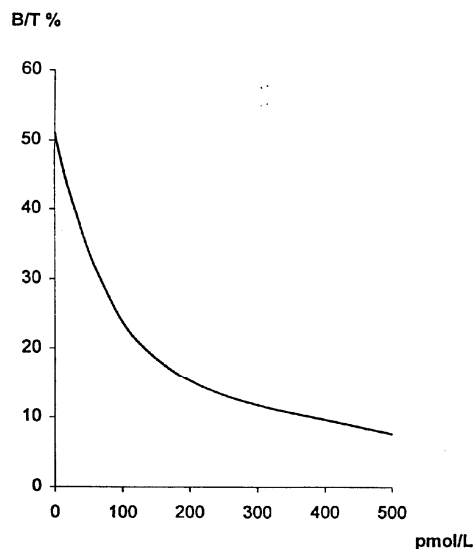
9.5 Slope of calibration curve

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

10 OUTLINE OF THE RIA PROCEDURE

Type of tubes	Tube no	Calibrator sample or control	Assay buffer (D)	^{125}I -gastrin with NRS (B)	Anti-Gastrin (A)		Double antibody PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 μL	-	Vortex-	-	Vortex-mix
NSB _{st}	3- 4	-	300 μL	200 μL	-	mix and	500 μL	and incubate
Calib 0	5- 6	100 μL	-	200 μL	200 μL	incubate	500 μL	for 30 min. at
Calib 15.6	7- 8	100 μL	-	200 μL	200 μL	for 60	500 μL	room
Calib 31.3	9-10	100 μL	-	200 μL	200 μL	min. at	500 μL	tempera-
Calib 62.5	11-12	100 μL	-	200 μL	200 μL	room	500 μL	ture.
Calib 125	13-14	100 μL	-	200 μL	200 μL	tempera-	500 μL	Centrifuge
Calib 250	15-16	100 μL	-	200 μL	200 μL	ture.	500 μL	15 min. at
Calib 500	17-18	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	1700 x g.
NSB _{Sample}	19-20	100 μL	200 μL	200 μL	-		500 μL	Decant at 4°C
Control low	21-22	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	and
Control high	23-24	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	count the
Sample 1	25-26	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	radioactivi-
								ty of the
								precipitates.

EXAMPLE OF GASTRIN CALIBRATION CURVE



11 REFERENCES

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

Revision date : 2009-11-24



GASTRIN-RIA

fr

KIPEMD302

DIAGNOSTIC IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTRODUCTION

La gastrine et le nerf vague sont les principaux régulateurs de la sécrétion de l'acide gastrique. D'autres facteurs que la gastrine contribuent cependant à 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 gastrine-14 (mini-gastrine) et même des fragments plus petits ont été détectés dans le sérum.

2 CONTEXTE CLINIQUE

La gastrine est une des hormones les mieux étudiées. Elle se rencontre dans la circulation sanguine sous différentes formes parmi lesquelles les gastrine-34 et gastrine-17, sulfatées et non sulfatées.

La détermination de la gastrine est utile dans le diagnostic des tumeurs produisant de la gastrine et de l'achylie avec ou sans anémie pernicieuse. La concentration sérique en gastrine est élevée dans toutes ces situations cliniques. Le traitement par de puissants inhibiteurs de la sécrétion d'acide gastrique peut provoquer une augmentation de la concentration sérique en gastrine à cause de la diminution de l'inhibition acide en retour de la libération de la gastrine. La mesure de la gastrine sérique peut donc être utilisée pour contrôler le traitement par inhibiteurs de la sécrétion d'acide gastrique.

Taux normal de la gastrine dans le sérum humain: ≤ 60 pmol/L (taux à jeun obtenu avec cette procédure-ci).

Valeur moyenne: 25 pmol/L $\pm$ 10 pmol/L (1 écart-type).

Fourchette: 11-54 pmol/L.

3 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Ces réactifs sont destinés à l'analyse de la gastrine dans le sérum humain. La gastrine dans le sérum est analysée par une méthode radio-immunologique qui utilise un antisérum de lapin dirigé contre un conjugué gastrine 17-albumine. La gastrine des calibrateurs et des échantillons entre en compétition, pour la liaison aux anticorps, avec une gastrine-17 marquée à l'I¹²⁵. La gastrine I¹²⁵ se lie en proportion inverse à la concentration en gastrine des calibrateurs et des échantillons. La gastrine I¹²⁵ liée à l'anticorps est séparée de la fraction non liée par une technique de précipitation double anticorps-polyéthylène glycol (PEG). On mesure la radioactivité des précipités. L'antisérum utilisé dans l'analyse réagit de manière croisée avec la gastrine-34 et les formes sulfatées des gastrine-17 et gastrine-34.

4 PRÉCAUTIONS

Uniquement pour le diagnostic in vitro. Ces trousse contiennent de l'I¹²⁵ (demi-vie: 60 jours) émettant des radiations ionisantes X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Les règlements pouvant changer d'un pays à l'autre, il est important que la personne responsable du laboratoire soit familière 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. Cependant, il convient de respecter toutes les précautions recommandées pour la manipulation de dérivés du sang.

Il faut prendre des dispositions pour assurer la manipulation correcte du matériel radioactif conformément aux réglementations locales et/ou nationales. Seules les personnes autorisées peuvent avoir accès à ces réactifs.

Les précautions suivantes doivent être observées lorsque l'on manipule du matériel radioactif:

- Le matériel radioactif doit être conservé dans des endroits spécialement destinés à cet effet, non accessibles au personnel non autorisé.
- La manipulation de matériel radioactif doit se faire uniquement dans des endroits autorisés.
- Il faut faire attention d'éviter l'ingestion et le contact avec la peau ou les vêtements. Ne pas pipeter de solutions radioactives avec la bouche.
- Il doit être interdit de boire, manger ou fumer lors de l'utilisation de matériel radioactif.
- 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 matériel 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 avec un détergent.

Les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium. Le contact avec des canalisations en cuivre ou en plomb peut provoquer la formation et 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 tuyauteries contaminées ou suspectées d'être contaminées par ces dépôts explosifs doivent être rincées à fond par une solution d'hydroxyde de sodium à 10%.

5 COMPOSITION DE LA TROUSSE

Contenu de la trousse

Les réactifs fournis dans cette trousse sont en quantité suffisante pour 100 tubes.

1.

REAG	A	Ab
------	---	----

 Antisérum de lapin dirigé contre la gastrine-17 humaine synthétique conjuguée à de la sérumalbumine bovine, 21 mL d'antisérum. Diluant: tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, 0,25% de sérumalbumine humaine et 0,05% d'azoture de sodium.
Couleur : jaune.
2.

REAG	B	Ag	¹²⁵ I
------	---	----	------------------

 Contient 66 KBq ou 1,8μCi à la date de l'activité de référence. La gastrine-17 humaine synthétique est iodée. La forme monoiodée est purifiée par HPLC.
Activité spécifique : 1700 à 2100 μCi/nmol (62 à 77 MBq/nmol). Lyophilisé dans 2,5 mL, tampon phosphate 0,5 M, pH 7,4 avec 2,5% de sérumalbumine bovine et 0,5% d'azoture de sodium. Contient 0,12 mL de sérum de lapin normal (SLN). Couleur: bleu. Reconstituer dans 25 mL d'eau distillée.
3.

REAG	C	DAb
------	---	-----

 50 mL d'antisérum dilué Ig de chèvre anti-lapin en tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, 0,25% de sérumalbumine humaine et 0,05% d'azoture de sodium. Contient 5,0% (w/v) de polyéthylène glycol 60000.
Couleur : rouge.
4.

REAG	D	ASSAY	BUF
------	---	-------	-----

 40 mL de tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, avec 0,25 % de sérumalbumine humaine et 0,05% d'azoture de sodium.
5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 Lyophilisé. Concentration après reconstitution : 500 pmol/L.
Le calibrateur est produit à partir de gastrine-17 humaine synthétique. Dilué dans un tampon de phosphate de 0,05 M (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,05% d'azoture de sodium.
Reconstitution dans 5,00 ml d'eau distillée.
6.

REAG	F-G	Control
------	-----	---------

 Pools de sérums lyophilisés avec des concentrations en gastrine faibles (normales) et élevées. 1,00 mL de chaque contrôle après reconstitution. Pour les valeurs exactes, voir sur l'étiquette des flacons.

Matériel requis, mais non fourni

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

Préparation et conservation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2 et 8° C avant leur reconstitution et leur utilisation. La stabilité des réactifs se trouve sur l'étiquette des flacons. Pour les réactifs lyophilisés, la date d'expiration est valable pour les réactifs non reconstitués. Les réactifs reconstitués restent stables pendant 8 semaines s'ils sont conservés correctement.

L'eau utilisée pour la reconstitution des réactifs lyophilisés doit être distillée dans un appareil entièrement en verre ou elle doit être d'une pureté identique. Dissoudre le contenu des flacons en les inversant doucement et éviter la formation de mousse.

Réactif A : anti-gastrine

Prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8° C.

Réactif B : gastrine ¹²⁵I

Reconstituer avec 25 mL d'eau distillée. Conserver entre 2 et 8° C.

Réactif C : double anticorps-PEG

Prêt à l'emploi. Mélanger à fond avant utilisation. Conserver entre 2 et 8° C.

Réactif D : tampon d'analyse

Prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8° C.

Réactif E : Calibrateur de Gastrine

Reconstituer avec 5,00 ml d'eau distillée.

Pour la préparation des calibrateurs de travail de Gastrine, suivre la procédure de dosage immunoradiologique.

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

Réactifs F-G : contrôles

Reconstituer chacun des flacons avec 1,00 mL d'eau distillée.

Conserver à -18° C ou moins s'ils sont réutilisés.

6 ÉCHANTILLON

Prélèvement de l'échantillon

Les patients 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 et laissé se 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 de congélation-décongélation.

7 PROCÉDURE D'ANALYSE

7.1 Procédure

- Reconstituer les réactifs de la manière spécifiée.
- Les réactifs doivent être portés à température ambiante avant leur utilisation. La précision du pipetage est essentielle. Tous les tests (calibrateurs, contrôles et échantillons) doivent être réalisés en double. Une analyse complète inclut:

Calibrateurs : 7 concentrations différentes, 0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 et 500 pmol/L.

Contrôles : Bas et élevé.

Échantillons.

Tubes pour la détermination de la *liaison non spécifique (tubes NSB)*

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

Un résumé se trouve à la section 10.

- Reconstituer les réactifs lyophilisés conformément aux instructions de la page 23 et les laisser se stabiliser à température ambiante.
- Préparer les calibrateurs de travail de gastrine en diluant le calibrateur de gastrine de 500 pmol/l (Réactif E) avec le tampon de dosage (Réactif D) conformément aux indications suivantes exemple:
 - a. Réactif E = 500 pmol/l
 - b. 1,00 ml de calibrateur de 500 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 250 pmol/l.
 - c. 1,00 ml de calibrateur de 250 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 125 pmol/l
 - d. 1,00 ml de calibrateur de 125 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 62,5 pmol/l
 - e. 1,00 ml de calibrateur de 62,5 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 31,2 pmol/l.
 - f. 1,00 ml de calibrateur de 31,2 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 15,6 pmol/lg.
 - g. tampon de dosage = 0 pmol/l(Entreposer les calibrateurs à une température de -20° C ou inférieure en cas de réutilisation).
- Pipeter 100 µL de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dans leurs tubes respectifs. Pipeter 300 µL du tampon d'analyse (réactif D) dans les tubes NSB pour les calibrateurs et 200 µL du tampon d'analyse dans les tubes NSB pour les échantillons. Ajouter 100 µL de n'importe quel échantillon dans les deux tubes NSB pour les échantillons.
- Pipeter 200 µL de gastrine I¹²⁵ (réactif B) dans tous les tubes. Les tubes TOT sont scellés et gardés à part.
- Pipeter 200 µL d'anti-gastrine (réactif A) dans tous les tubes excepté les tubes NSB et les tubes TOT.
- Agiter soigneusement les tubes au vortex et incubé pendant 60 minutes à température ambiante (20 à 25°C).
- Ajouter 500 µL du double anticorps-PEG bien mélangé (réactif C) à tous les tubes **excepté** le tube TOT. Agiter soigneusement au vortex et incubé 30 minutes à température ambiante.
- Centrifuger pendant 15 minutes à minimum 1700 x g à une température de 4°C.
- Décanter le surnageant immédiatement après la centrifugation et compter la radioactivité des précipités dans un compteur gamma.

7.2 Calcul des résultats

1. Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des NSB pour les calibrateurs au taux de comptage (CPM) des calibrateurs réalisés en double et soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des NSB pour les échantillons au taux de comptage (CPM) des contrôles et des échantillons.
2. Établir une courbe de calibration en reportant la fraction liée, B/TOT, en fonction des concentrations en gastrine des calibrateurs. Vous trouverez un exemple de courbe de calibration à la section 10.
3. Interpoler les concentrations en gastrine des contrôles et des échantillons à partir de la courbe de calibration générée.
4. Il est également possible de réaliser la courbe de calibration et le calcul des concentrations dans les échantillons par une méthode informatisée.

8 CARACTÉRISTIQUES DE L'ANALYSE

8.1 Sensibilité

La limite de détection de l'essai est de 5 pmol/L. Ce chiffre représente la concentration correspondant à une radioactivité liée 2 écarts-types en dessous de la radioactivité liée du calibrateur de concentration zéro.

8.2 Exactitude

Un recouvrement moyen de 97,6% a été obtenu lorsque des quantités connues de gastrine, dans une fourchette de 65 à 222 pmol/L, ont été ajoutées à des échantillons de sérum.

8.3 Précision

8.3.1 Variation intra-essai

<u>Taux</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
41 pmol/L	3,0%	20
135 pmol/L	2,2%	20

8.3.2 Variation inter-essai

<u>Taux</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
47 pmol/L	7,5%	17
165 pmol/L	6,2%	17

8.4 Spécificité

Les réactions croisées suivantes ont été observées:

<u>Composé</u>	<u>Réaction croisée</u>
Gastrine-17	100,0%
Gastrine-17 sulfatée	83 %
Gastrine-34	61 %
CCK-8	36 %
Gastrine 1 à 14	<0,1 %
Peptide de libération de la gastrine	<0,01%
Peptide intestinal vasoactif	<0,01%
Motiline	<0,01%
Glucagon	<0,01%
Somatostatine 14	<0,01%
C-peptide	<0,01%

9 CONTRÔLE DE QUALITÉ

9.1 Les concentrations établies des sérums de contrôle

(réactifs F et G) sont dans les limites mentionnées sur les étiquettes des flacons.

9.2 Comptages totaux

Les comptages obtenus doivent être proches des CPM attendus lorsqu'ils sont ajustés pour l'efficacité du compteur et la désintégration radioactive. Le contenu en gastrine I^{125} de cette trousse donnera de 25 000 CPM (-5%, +20%) à la date d'activité de référence (efficacité du comptage = 80%).

9.3 Liaison maximale (Bo/TOT)

Calculer pour chaque analyse le % de radioactivité liée pour le calibrateur zéro: $\frac{Bo}{TOT} \times 100$.

$\frac{Bo}{TOT} \times 100$ est en général de 45 à 65% lorsque l'analyse est effectuée à la date d'activité de référence.

9.4 Liaison non spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque analyse la liaison non spécifique $\frac{NSB}{TOT} \times 100$.

$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ est moins de 5%.

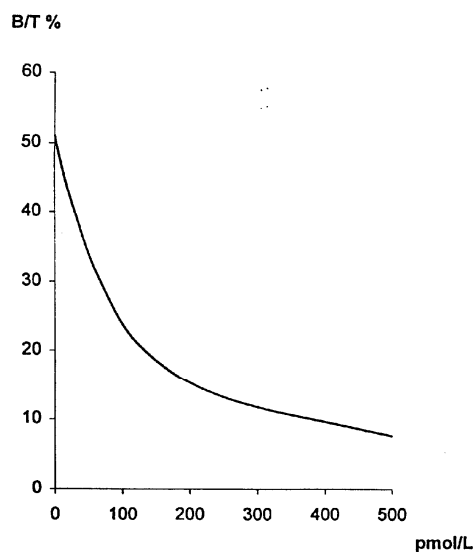
9.5 Pente de la courbe de calibration

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

10 PLAN DE LA PROCÉDURE RIA

Type de tubes	Tube no	Calibrateur, échantillon ou contrôle	Tampon de l'essai (D)	Gastrine I^{125} avec SLN (B)	Anti-gastrine (A)		Double anticorps-PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 μL	-	Mélang	-	Mélanger au
NSB _{st}	3- 4	-	300 μL	200 μL	-	er au	500 μL	Vortex et
Calib 0	5- 6	100 μL	-	200 μL	200 μL	Vortex	500 μL	incuber
Calib 15.6	7- 8	100 μL	-	200 μL	200 μL	et	500 μL	pendant
Calib 31.3	9-10	100 μL	-	200 μL	200 μL	incuber	500 μL	30 min. à
Calib 62.5	11-12	100 μL	-	200 μL	200 μL	pendant	500 μL	température
Calib 125	13-14	100 μL	-	200 μL	200 μL	60	500 μL	ambiante.
Calib 250	15-16	100 μL	-	200 μL	200 μL	min. à	500 μL	Centrifuger
Calib 500	17-18	100 μL	-	200 μL	200 μL	tempéra	500 μL	15 min. à
NSB _{Echantillon}	19-20	100 μL	200 μL	200 μL	-	ture	500 μL	1700 x g.
Contrôle bas	21-22	100 μL	-	200 μL	200 μL	ambiant	500 μL	Décanté à
Contrôle élevé	23-24	100 μL	-	200 μL	200 μL	e.	500 μL	4°C et
Échantillon 1	25-26	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	compter la radioactivité des précipités.

EXEMPLE DE COURBE CALIBRATION POUR LA GASTRINE



11 BIBLIOGRAPHIE

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

Date de révision: 2009-11-24



GASTRIN-RIA

de

KIPEMD302

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 EINLEITUNG

Das Polypeptidhormon Gastrin sowie die Vagusnerven sind die Hauptregulatoren der Magensaftproduktion. Jedoch gibt es noch eine Reihe anderer Faktoren, die zur Regulierung der Magensäuresekretion beitragen. Hauptbildungsort von Gastrin ist die Schleimhaut des Antrums und Pylorus im Magen. Auch werden gastrinproduzierende Zellen im Zwölffingerdarm sowie im Pankreas gefunden.

Gastrin tritt in verschiedenen Formen im menschlichen Serum auf. Ein amidierter C-Terminus ist essentiell für die biologische Aktivität von Gastrin. Pro-Gastrin wird vom Prä-Pro-Gastrin abgespalten. Es konnte gezeigt werden, daß Pro-Gastrin teilweise an den Tyrosinresten sulfatiert ist. Pro-Gastrin wird enzymatisch in die Hauptformen von biologisch aktivem Gastrin gespalten: Gastrin-34 sowie Gastrin-17. Beide treten in sulfatierter und nicht-sulfatierter Form auf. Kleinere Mengen von Gastrin-52 (auch als Komponente 1 bezeichnet), Gastrin-14 (Mini-Gastrin) und selbst kleinere Fragmente sind im Serum nachgewiesen worden.

2 KLINISCHE BEDEUTUNG

Gastrin gehört zu den mit am besten studierten gastrointestinalen Hormonen. Im Blut kommt es in verschiedenen Formen, darunter Gastrin-17 und Gastrin-34, sulphatiert und nicht sulphatiert.

Die Bestimmung von Gastrin ist nützlich bei der Diagnose von gastrinproduzierenden Tumoren und Achylia gastrica mit oder ohne perniziöser Anämie. Bei diesen klinischen Indikationen ist die Serumkonzentration an Gastrin hoch. Die Behandlung mit Anti-Sekretorika kann einen Anstieg in der Serum-Gastrinkonzentration hervorrufen, da eine gestörte Säure-Feedback-Inhibierung der Gastrinfreisetzung vorliegt. Aus diesem Grunde kann die Bestimmung von Serumgastrin zum Monitoring einer Behandlung mit Anti-Sekretorika verwendet werden.

Normalwerte von Gastrin im Serum von Menschen mit diesem Assay ermittelt:

≤ 60 pmol/l (Nüchternwerte)

Der Mittelwert beträgt 25 pmol/l ± 10 pmol/l (1SD).

Der absolute Bereich liegt bei 11-54 pmol/l.

3 TESTPRINZIP

Gastrin im Serum wird durch einen kompetitiven Radioimmunoassay unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen ein Gastrin-17 Albuminkonjugat gemessen. Das Gastrin der Kalibratoren und Proben konkurriert mit ¹²⁵I-markiertem Gastrin-17 um die Bindungsstellen am Antikörper. ¹²⁵I-Gastrin bindet im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von Gastrin in den Kalibratoren und Proben. Antikörpergebundenes ¹²⁵I-Gastrin wird von der ungebundenen Fraktion unter Anwendung der Doppel-Antikörper-Polyethylen-Glykol-Präzipitations-technik getrennt. Die Radioaktivität des Präzipitates wird gemessen. Das verwendete Antiserum dieses Testes kreuzreagiert mit Gastrin-34 und den sulfatierten Formen von Gastrin-17 und Gastrin-34.

4 VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in vitro Gebrauch. Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Es ist notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person mit den im jeweiligen Land gültigen, gesetzlichen Bestimmungen im Umgang mit radioaktivem Material vertraut ist.

Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanes Material enthalten, ergaben bei der Prüfung auf HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Es sollten geeignete Maßnahmen zum sicheren Umgang mit dem radioaktiven Material ergriffen werden. Nur autorisierte Personen sollten Zugang zu den Reagenzien haben.

Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sollten beim Umgang mit radioaktivem Material beachtet werden:

- Radioaktives Material muß in speziell ausgewiesenen Räumen gelagert werden, die für nicht autorisiertes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material darf nur in speziell gekennzeichneten Räumen erfolgen.
- Vorsicht ist geboten vor oraler oder dermalen Aufnahme von radioaktiven Stoffen oder Kontamination von Kleidung. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Testdurchführung darf weder gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Es wird empfohlen Einmalhandschuhe zu tragen. Nach Gebrauch radioaktiven Materials Hände waschen.
- Beim Umgang mit radioaktivem Material sollten die Labortische mit absorbierendem, wegwerfbarem Material abgedeckt sein.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort aufgenommen werden und kontaminiertes Material als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Tischoberflächen sollten mit einem Detergenz gesäubert werden.

Kitkomponenten enthalten Natriumazid. Kontakt mit Kupfer- oder Bleirohren kann zur Bildung von hochexplosiven Ablagerungen führen. Daher beim Einbringen in Abflüsse mit reichlich Wasser nachspülen, was die Bildung von Metallaziden verhindert. Rohre, die wahrscheinlich diese explosiven Ablagerungen enthalten vorsichtig mit 10%iger Natronlauge spülen.

5 KOMPONENTEN DES KITS

Die Reagenzien dieses Testkits sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

1.

REAG	A	Ab
------	---	----

 Kanichen-Antiserum gegen synthetisches Humangastrin-17, konjugiert an Rinder-Serumalbumin. 21 ml Antiserum. Verdünner: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,25 % humanes Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid. Gelb eingefärbt.
2.

REAG	B	Aa	¹²⁵ I
------	---	----	------------------

 Enthält 66 KBq oder 1,8 µCi am Herstellungstag. Synthetisches humanes Gastrin-17, jodiert. Die monojodierte Form wird HPLC-gereinigt. Spezifische Aktivität: 1.700-2.100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilisiert in 2,5 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 2,5 % humanem Serumalbumin und 0,5 % Natriumazid. Enthält 0,12 ml normales Kaninchenserum. Blau eingefärbt. In 25 ml bidest. Wasser rekonstituieren.
3.

REAG	C	DAb
------	---	-----

 50 mL verdünntes Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig-Antiserum in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,25 % humanem Serumalbumin und 0,05 % Natriumazid. Enthält 5,0 % w/v Polyethylen-Glykol 6.000. Rot eingefärbt.
4.

REAG	D	ASSAY	BUF
------	---	-------	-----

 40 mL 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,25 % humanem Serumalbumin und 0,05 % Natriumazid.
5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 Lyophilisiert. Konzentration nach Rekonstitution : 500 pmol/l. Der Kalibrator wird aus synthetischem, humanem Gastrin-17 hergestellt. In 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,25 % humanem Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid verdünnt. In 5,00 ml bidest. Wasse rekonstituieren.
6.

REAG	F-G	Control
------	-----	---------

 Lyophilisierte Serumpools mit niedriger (normal) und hoher Konzentration an Gastrin. 1,00 ml jeder Kontrolle nach Rekonstitution.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel (nicht im Kit enthalten)

1. Einmal-Teströhrchen 11-13 x 55 mm, Polystyrol
2. Pipetten mit Einmalspitzen, 100, 200 und 500 µl
3. Eppendorf-Multipipette für Volumina 200 und 500 µl
4. Vortexmixer
5. Zentrifuge, geeignet für mindestes 1.700xg (vorzugsweise Kühltentrifuge)
6. Gamma-Counter

Vorbereitung und Lagerung der reagenzien

Die Reagenzien sollten bei 2 – 8 °C gelagert werden. Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen angegeben. Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die ungeöffnete Flasche. Nach Rekonstitution haben die Reagenzien eine Haltbarkeit von 8 Wochen, wenn ordnungsgemäß gelagert.

Das für die Rekonstitution der lyophilisierten Reagenzien verwendete Wasser sollte mit einer Glasapparatur gewonnen werden, oder von entsprechender Reinheit sein. Den Inhalt der Fläschchen vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung lösen.

Reagenz A: Anti-Gastrin

Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2 – 8 °C

Reagenz B: ¹²⁵I-Gastrin

Mit 25 ml bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei 2-8 °C.

Reagenz C: Doppel-Antikörper-PEG

Gebrauchsfertig. Vor Gebrauch gründlich mischen. Lagerung bei 2-8 °C.

Reagenz D: Assaypuffer

Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2 – 8 °C.

Reagenz E : Gastrin-Kalibrator

Mit 5,00 ml bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung aliquotiert bei -18 °C oder tiefer, wenn diese wiederverwendet werden sollen.

Reagenz F-G : Kontrollen

Jedes Fläschchen mit 1,00 ml bidest. Wasser rekonstituieren.

Lagerung aliquotiert bei -18 °C oder tiefer, wenn diese wiederverwendet werden sollen.

6 PROBEN

Vor der Blutentnahme sollten die Patienten mindestens 10 Stunden nüchtern sein.

Venenblut wird in Röhrchen ohne Zusätze gesammelt. Die Proben werden bis zur Gerinnung in einem Eisbad gekühlt. Serum wird durch Zentrifugation bei +4 °C gewonnen.

Das Serum sollte nach der Entnahme innerhalb von 4 Stunden untersucht werden oder bei -18 °C bis zur Analyse gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

7 TESTDURCHFÜHRUNG

7.1 Durchführung

Rekonstituiere die Reagenzien wie beschrieben.

Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Alle Reagenzien (v.a. Reagenz C) sollten direkt vor Gebrauch gründlich gemischt werden.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet (Doppelansatz der Proben wird empfohlen):

Kalibratoren 7 Konzentrationen (0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 und 500 pmol/l)

Kontrollen niedrig und hoch

Proben

Röhrchen für die Bestimmung der **nicht spezifischen Bindung (NSB-Röhrchen)**

Röhrchen für die Bestimmung der **Totalaktivität (TOT-Röhrchen)**

Siehe Übersicht auf Abschnitt 10.

- Die lyophilisierten Reagenzien wie beschrieben rekonstituieren. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellen der Gastrin Arbeitskalibratoren durch Verdünnung des Gastrin Kalibratoren 500pmol/L (Reagenz E) mit Assaypuffer (Reagenz D) nach dem folgenden Schema:
 - Reagenz E = 500pmol/l
 - 1.00 mL Kalibrator 500 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 250 pmol/L
 - 1.00 mL Kalibrator 250 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 125 pmol/L
 - 1.00 mL Kalibrator 125 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 62,5 pmol/L
 - 1.00 mL Kalibrator 62,5 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 31,2 pmol/L
 - 1.00 mL Kalibrator 31,3 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 15,6 pmol/L
 - Assaypuffer = 0 pmol/LDie Kalibratoren bei -20°C oder tiefer lagern.
- 100 µl der Kalibratoren, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. **300 µl Assaypuffer** (Reagenz D) nur in die **NSB-Röhrchen der Kalibratoren** und **200 µl Assaypuffer** in die **NSB-Röhrchen der Proben** pipettieren. In letztere 100 µl irgend einer Probe zusätzlich pipettieren.
- 200 µl ¹²⁵I-Gastrin** (Reagenz B) in alle Röhrchen pipettieren. Die TOT-Röhrchen werden verschlossen und zur Seite gestellt.
- 200 µl Anti-Gastrin** (Reagenz A) in alle Röhrchen **außer** NSB und TOT pipettieren.
- Sorgfältig vortexen und für **60 Minuten bei Raumtemperatur** (20-25 °C) inkubieren.
- 500 µl** von gut gemixtem **Doppel-Antikörper-PEG** (Reagenz C) in alle Röhrchen **außer** TOT pipettieren. Gründlich vortexen und für **30 Minuten bei Raumtemperatur** inkubieren.
- Röhrchen bei **4 °C 15 Minuten bei 1.700xg zentrifugieren**.
- Überstand unmittelbar nach Zentrifugation **dekantieren**, und die Radioaktivität des Präzipitates in einem Gamma-Counter messen.

7.2 Testauswertung

Bei Doppelbestimmung wird der cpm-Mittelwert berechnet. Von den Mittelwerten der Kalibratoren wird der cpm-Mittelwert der Nichtspezifischen Bindung (NSB) der Kalibratoren und von den Mittelwerten der Proben und Kontrollen der cpm-Mittelwert der Nichtspezifischen Bindung (NSB) der Proben subtrahiert.

Für jeden Kalibrator, Kontrolle und Probe wird % B/TOT wie folgt berechnet:

$$\% \text{ B/TOT} = \frac{\text{cpm (Mittelwert Kalibrator/Probe)} - \text{Mittelwert NSB}}{\text{cpm TOT (Mittelwert)}} \times 100$$

% B/TOT der Kalibratoren (y-Achse) wird gegen die entsprechende Konzentration in pmol/l (x-Achse) aufgetragen.

Steht ein entsprechendes Computerprogramm zur Verfügung, so können die Kalibrationskurve und die Berechnung der Konzentrationen der Proben durch ein entsprechendes Computerprogramm durchgeführt werden.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze, definiert als die zweifache Kalibratorabweichung des Nullkalibratoren, beträgt ca. 5 pmol/l (bezogen auf die Kalibrationskurve).

8.2 Richtigkeit

Eine mittlere Wiederfindung von 97,6 % wurde erreicht, wenn Gastrinkonzentrationen von 65 – 222 pmol/L zu normalem Serum gespikt wurden.

8.3 Präzision

8.3.1 Intra assay

Konzentration	Variationskoeffizient (VK %)	N
41 pmol/L	3,0 %	20
135 pmol/L	2,2 %	20

8.3.2. Inter assay

Konzentration	Variationskoeffizient (VK %)	N
47 pmol/L	7,5 %	17
165 pmol/L	6,2 %	17

8.4 Spezifität

Folgende strukturverwandte Substanzen wurden auf mögliche Kreuzreaktion im Gastrin-RIA geprüft:

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Gastrin-17	100
Gastrin-17, sulfatiert	82
Gastrin-34	100
Gastrin-34, sulfatiert	80
Gastrin-14	100
CCK-8	12
Gastrin-releasing Peptid	<0,01
VIP	<0,01
Motilin	<0,01
Glukagon	<0,01
Somatostatin 14	<0,01
C-Peptid	<0,01

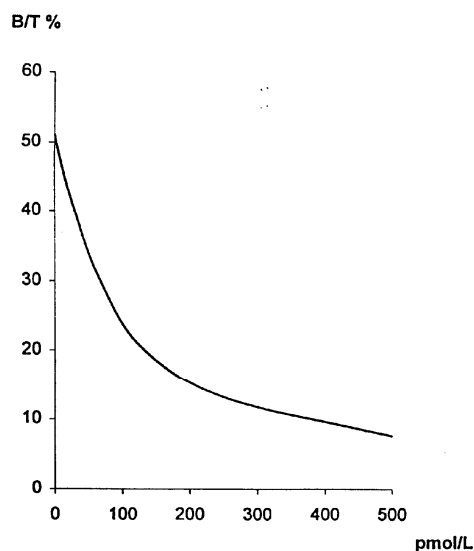
9 QUALITÄTSKONTROLLE

- Die wiedergefundenen Konzentrationen der Kontrollseren (Reagenz F und G) sollten innerhalb der auf den Etiketten angegebenen Werten liegen.
- Total Counts
Der Gehalt an ¹²⁵I-Gastrin dieses Kits beträgt ca. 25.000 CPM (-5 %, +20 %) am Tag der Markierung (Wirkungsgrad des Counters = 80 %).
- Maximale Bindung (Bo/TOT)
Für jeden Assay wird die gebundene Radioaktivität des Nullkalibrator (Bo/TOTx100) berechnet. Bo/TOTx100 beträgt normalerweise 45 - 65 % am Tag der Markierung. Gegen Ende der Laufzeit kann der Wert um einige Prozent absinken.
- Unspezifische Bindung (NSB/TOT)
Für jeden Assay wird die unspezifische Bindung in Prozent (NSB/TOTx100) berechnet. Die NSB/TOTx100 beläuft sich auf weniger als 5 %, wenn korrekt dekantiert wird.
- Form der Kalibrationskurve
Als Marker für die Reproduzierbarkeit können die Punkte bei 80, 50 und 20 % der Kalibrator kurve von Testlauf zu Testlauf verwendet werden.

10 TESTSCHEMA

Röhrchen	Röhrchen Nr.	Kalibrator Probe oder Kontrolle	Assay-Puffer (D)	¹²⁵ I-Gastrin mit NRS (B)	Anti-Gastrin (A)		Doppel-Antikörper-PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 µL	-	Vortexen und für 60 min bei Raumtemperatur inkubieren.	-	Vortexen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugieren für 15 min bei 1700 x g. Dekantieren bei 4°C und Radioaktivität des Präzipitats messen.
NSB _{st}	3- 4	-	300 µL	200 µL	-		500 µL	
Kalib 0	5- 6	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kalib 15.6	7- 8	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kalib 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kalib 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kalib 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kalib 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kalib 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
NSB _{Probe}	19-20	100 µL	200 µL	200 µL	-		500 µL	
Kontrolle low	21-22	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Kontrolle high	23-24	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Probe 1	25-26	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	

BEISPIEL GASTRIN KALIBRATIONSKURVE



11 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 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.

Revisionsdatum: 2009-11-24



GASTRIN-RIA

es

KIPEMD302

USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTRODUCCIÓN

La gastrina y los nervios vagales son los principales reguladores de la secreción de ácido gástrico. Sin embargo, hay otros factores, aparte de la gastrina, que contribuyen a la secreción de ácido gástrico. El principal lugar donde se secreta 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.

2 CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La gastrina es una de las hormonas intestinales mejor estudiadas. En la circulación, se da en varias formas diferentes, entre las que se incluyen la gastrina-34 y la gastrina-17, sulfatadas y no sulfatadas.

La determinación de la gastrina es útil en el diagnóstico de los tumores productores de gastrina y de la acilia con o sin anemia perniciosa. En todas estas situaciones clínicas, la concentración de gastrina en suero es elevada. El tratamiento con antiseoretos potentes puede provocar un incremento de la concentración de gastrina en suero, debido a un funcionamiento deficiente del circuito de retroalimentación ácido que regula la liberación de gastrina. Por lo tanto, la medición de la concentración de gastrina en suero se puede utilizar para monitorizar el tratamiento con antiseoretos.

Nivel normal de gastrina en suero humano: ≤ 60 pmol/l (nivel obtenido en ayunas con este procedimiento).

Valor medio: 25 pmol/l ± 10 pmol/l (1SD).

Rango: 11-54 pmol/l.

3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aplicación de estos reactivos es la determinación de la gastrina en suero humano. La gastrina en suero se mide mediante un radioinmunoensayo competitivo utilizando antisuero de conejo que se enfrenta a una gastrina-17 conjugada con albúmina. La gastrina de los calibradores y muestras compete con una gastrina marcada con I^{125} en la fijación a los anticuerpos.

La gastrina I^{125} se fija a los anticuerpos en proporción inversa a la concentración de gastrina de los calibradores y muestras. La gastrina I^{125} fijada a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada utilizando la técnica de precipitación de doble anticuerpo con polietilenglicol. Seguidamente se mide la radiactividad 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.

4 PRECAUCIONES

Sólo para uso en diagnóstico in vitro. Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

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 HCV y los anticuerpos del HIV-1 y HIV-2, dando todos ellos negativo. De todos modos, se deben observar todas las precauciones recomendadas para manipular cualquier derivado de la sangre.

Se deben seguir los pasos necesarios para garantizar la correcta manipulación del material radiactivo de acuerdo con la normativa local y/o nacional vigente. Sólo debería tener acceso a los reactivos el personal autorizado.

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

- El material radiactivo debe almacenarse en áreas especialmente diseñadas a tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en áreas autorizadas.
- Debe tenerse mucho cuidado a fin de evitar la ingesta 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 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 en este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando azidas metálicas altamente explosivas. Al eliminar los reactivos en el sistema de cañerías, verter siempre abundante agua a chorro para evitar la formación de azidas metálicas. Asimismo, también se debería verter ocasionalmente un 10% de hidróxido de sodio en las tuberías de metal.

5 COMPOSICIÓN DEL KIT

Los reactivos que contiene cada kit son suficientes para 100 tubos.

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

Antisero de conejo enfrentado a gastrina-17 humana sintética conjugada con albúmina de suero bovino, 21 ml de antisuero. Diluyente: tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.
Color: Amarillo.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

Contiene 66KBq o 1,8 µCi en la fecha de referencia. La gastrina-17 humana sintética está iodada. La forma moniodada está purificada mediante HPLC.
Actividad específica: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Liofilizada en 2,5 ml de tampón fosfato de 0,5 M y pH de 7.4, con 2,5% de albúmina de suero humano y 0,5% de azida sódica.
Contiene 0,12 ml de suero normal de conejo.
Color: Azul. Reconstituir en 25 ml de agua destilada.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | C | Dab |
|------|---|-----|

50 mL de antisuero Ig de cabra anti-conejo diluido en tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.
Contiene 5% (p/v) de glicol polietilénico 6000.
Color: Rojo.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

40 mL de tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25 de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

Liofilizado. Concentración después de la reconstitución: 500 pmol/l.
El calibrador se producen a partir de la gastrina-17 humana sintética. Diluido en tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.
Reconstituir en 5 ml de agua destilada.
- | | | |
|------|-----|---------|
| REAG | F-G | Control |
|------|-----|---------|

Mezclas de suero liofilizadas con concentraciones de gastrina baja (normal) y alta. 1 ml de cada control después de la reconstitución.

Material Requerido Pero No Suministrado

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, por ejemplo una Multipipeta de Eppendorf, para volúmenes de 200 y 500 µl facilitará la operación de distribución de los reactivos.
4. Agitador.
5. Centrifuga, con un mínimo de 1700 x g (preferentemente refrigerada).
6. Contador gamma.

Preparación Y Almacenamiento De Los Reactivos

Conservar todos los reactivos a 2-8° C antes de la reconstitución y el uso. La estabilidad de los reactivos figura en las etiquetas de los viales. En lo que se refiere 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 en la reconstitución de los reactivos liofilizados debe destilarse dentro de un aparato que sea enteramente de vidrio o bien ser de la pureza correspondiente. Disolver el contenido de los frascos invirtiéndolos con suavidad y evitando que se forme espuma.

Reactivo A: Anti-gastrina

Listo para su uso. Conservar a 2-8° C.

Reactivo B: Gastrina I-¹²⁵

Reconstituir con 25 ml de agua destilada. Conservar a 2-8° C.

Reactivo C: Doble Anticuerpo con PEG

Listo para su uso. Mezclar bien antes de utilizarlo. Conservar a 2-8° C.

Reactivo D: Tampón de ensayo

Listo para su uso. Conservar a 2-8° C.

Reactivos E : Calibrador de Gastrina

Reconstituir cada vial con 5,00 ml de agua destilada.

Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivos F-G : Controles

Reconstituir cada vial con 1 ml de agua destilada.

Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

6 LA MUESTRA

Antes de recoger las muestras, los pacientes deberían estar en ayunas por lo menos durante 10 horas. La sangre venosa se recoge en tubos que no contienen aditivos. La muestra se enfría inmediatamente en un baño de hielo para coagularse. El suero se separa por centrifugación a +4° C.

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

7 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

7.1 Reconstituir los reactivos liofilizados de acuerdo a las instrucciones que aparecen en la página 39 y esperar que los reactivos se pongan a temperatura ambiente.

7.2 Preparar los calibradores de trabajo de la gastrina diluyendo el calibrador **gastrina** de 500 pmol/l (Reactivo E) con el tampón de ensayo (Reactivo D) de acuerdo con las siguientes indicaciones:

- a. Reactivo E = 500 pmol/l
- b. 1 ml de calibrador de 500 pmol/l + 1 ml de tampón = 250 pmol/l
- c. 1 ml de calibrador de 250 pmol/l + 1 ml de tampón = 125 pmol/l
- d. 1 ml de calibrador de 125 pmol/l + 1 ml de tampón = 62,5 pmol/l
- e. 1 ml de calibrador de 62,5 pmol/l + 1 ml de tampón = 31,2 pmol/l
- f. 1 ml de calibrador de 31,2 pmol/l + 1 ml de tampón = 15,6 pmol/l

Tampón de ensayo = 0 pmol/l

Conservar los calibradores a -20° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

7.3 Procedimiento

Reconstituir los reactivos tal y como se especifica.

Esperar a que los reactivos se pongan 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 diferentes: 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 (tubos TOT)**.

Para un resumen del procedimiento véase párrafo10.

7.4 Realización

- Pipetear 100 µl de calibradores, controles y muestras en sus tubos respectivos. Pipetear 300 µl de tampón de ensayo (Reactivo D) en los tubos NSB calibrador y 200 µl de tampón de ensayo en los tubos NSB de las muestras. Añadir 100 µl de cualquier muestra en las muestras NSB.
- Pipetear 200 µl de gastrina I-¹²⁵ (Reactivo B) en todos los tubos. Tapar y guardar aparte los tubos TOT.
- Pipetear 200 µl de anti-gastrina (Reactivo A) en todos los tubos **exceptuando** los tubos NSB y TOT.
- Agitar con cuidado los tubos e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25° C).
- Añadir 500 µl del doble anticuerpo PEG (Reactivo C) bien mezclado a todos los tubos **exceptuando** los tubos TOT. Agitar con cuidado e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos a 1700 x g como mínimo, a 4° C.
- Decantar los sobrenadantes inmediatamente después de la centrifugación, y contar la radiactividad de los precipitados mediante un contador gamma.

7.5 Cálculos

- Restar la media de CPM del calibrador de NSB de la media de CPM de los duplicados de los calibradores, y las muestras de NSB de las muestras y controles.
- Representando gráficamente la fracción fijada CPM o B/TOT en función de las concentraciones de los calibradores de gastrina, se genera una curva de calibración. Se muestra un ejemplo de la curva de calibración en la párrafo10.
- Interpolan las concentraciones de gastrina de los controles y las muestras de la curva de calibración generada.
- La curva de calibración y el cálculo de las concentraciones de las muestras también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos.

8 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

8.1 Sensibilidad

La concentración mínima detectable es 5 pmol/l. Esta cifra corresponde 2 desviaciones calibrador por debajo de la radiactividad fijada por el calibrador de concentración cero.

8.2 Recuperación

Cuando se añadieron cantidades conocidas de gastrina con un rango del 65-222 pmol/l a las muestras de suero, se alcanzó una recuperación media del 97,6%.

8.3 Precisión

8.3.1 Variación intra-ensayo

<u>Nivel</u>	<u>Coeficiente de Variación (%CV)</u>	<u>N</u>
41 pmol/l	3%	20
135 pmol/l	2,2%	20

8.3.2 Variación inter-ensayo

<u>Nivel</u>	<u>Coeficiente de Variación (%CV)</u>	<u>N</u>
47 pmol/l	7,5%	17
165 pmol/l	6,2%	17

8.4 Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada</u>
Gastrina-17	100%
Gastrina-17 sulfatada	83 %
Gastrina-34	61 %
CCK-8	36 %
Gastrina 1-14	<0,1 %
Péptido liberador de gastrina	<0,01%
Péptido intestinal vasoactivo	<0,01%
Motilina	<0,01%
Glucagón	<0,01%
Somatostatina 14	<0,01%
Péptido C	<0,01%

9 CONTROL DE CALIDAD

9.1 Las concentraciones encontradas del suero de control

(Reactivos F y G) deben estar dentro de los límites que figuran en las etiquetas de los viales.

9.2 Cuentas totales

Las cuentas obtenidas deberían aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficacia del contador y la decadencia radiactiva. El contenido de gastrina I-¹²⁵ de este kit dará unas cuentas de 25000 CPM (-5+20%) en la fecha de referencia (eficacia de cuenta: 80%).

9.3 Máxima fijación (Bo/TOT)

Calcular para cada ensayo el % de radiactividad fijada del calibrador cero: $\frac{Bo}{TOT} \times 100$

$\frac{Bo}{TOT} \times 100$ generalmente es del 45-65% en la fecha de referencia.

9.4 Fijación no específica (NSB/TOT)

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

$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ es inferior al 5%.

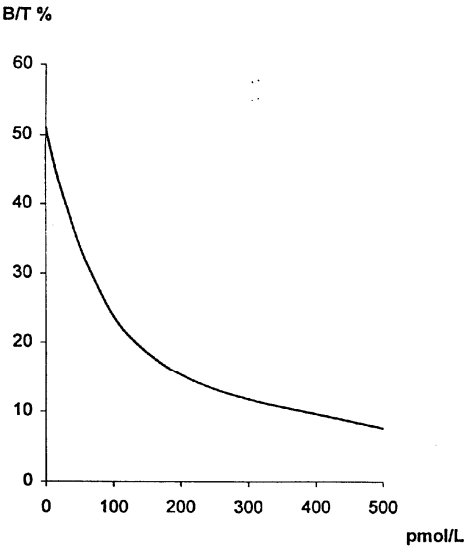
9.5 Forma de la curva de calibración

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

10 TABLA RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO RIA

Tipo de tubos	Número de tubo	Muestra o control calibrador	Tampón de ensayo (D)	Gastrina I- ¹²⁵ con NRS (B)	Antigastrina (A)		Doble anticuerpo con PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 µl	-	Mezclar	-	Mezclar con el
NSB _{Es}	3- 4	-	300 µl	200 µl	-	e	500 µl	agitador e
Calib 0	5- 6	100µl	-	200 µl	200 µl	incubar	500 µl	incubar
Calib 15,6	7- 8	100µl	-	200 µl	200 µl	durante 60	500 µl	durante 30
Calib 31,3	9-10	100µl	-	200 µl	200 µl	minutos a	500 µl	minutos a
Calib 62,5	11-12	100µl	-	200 µl	200 µl	temperatura	500 µl	temperatura
Calib 125	13-14	100µl	-	200 µl	200 µl	ambiente	500 µl	ambiente.
Calib 250	15-16	100µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	
Calib 500	17-18	100µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	
NSB _{Muestra}	19-20	100µl	200 µl	200 µl	-		500 µl	Centrifugar
Control bajo	21-22	100µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	15 minutos a
Control alto	23-24	100µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	1700 x g.
Muestra 1	25-26	100µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	Decantar a 4° C
								y
								contar la
								radiactividad
								de los
								precipitados.

EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACIÓN DE GASTRINA



11 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 Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
En 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 adenyhypophysis.
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.

Fecha de la revisión: 2009-11-24



GASTRIN-RIA

it

KIPEMD302

DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTRODUZIONE

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.

2 CONSIDERAZIONI CLINICHE

La gastrina è uno degli ormoni gastroenterici più studiati; circola in numerose forme diverse, tra le quali gastrina-34 e gastrina-17, che possono essere sia solfatate che non solfatate.

La determinazione dei livelli circolanti di gastrina è utile nella diagnosi dei tumori gastrino-secernti e nell'achilia, accompagnata o meno da anemia perniciosa. In questi casi i livelli sierici di gastrina sono elevati. Il trattamento con farmaci che inibiscono le pompe protoniche possono causare un aumento delle concentrazioni sieriche di gastrina per diminuito feedback negativo alla liberazione di gastrina. La misura della concentrazione sierica di gastrina si è pertanto dimostrata utile per verificare l'efficacia della terapia.

Livelli normali di Gastrina ottenuti con questo metodo in soggetti a digiuno:

≤60 pmol/L

Valore medio: 25 pmol/L ± 10 pmol/L (1 DS)

Range: 11 -54 pmol/L

3 PRINCIPIO DEL METODO

I reattivi contenuti nel kit permettono la determinazione quantitativa della gastrina nel siero umano. Il dosaggio della gastrina è un metodo radioimmunologico competitivo che utilizza un anticorpo di coniglio diretto contro il coniugato gastrina-17 albumina. Una quantità definita di gastrina marcata con ¹²⁵I compete con la gastrina presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo specifico anti gastrina; il marcato viene legato in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di gastrina in campioni e calibratore. Dopo l'incubazione, il marcato legato all'anticorpo viene precipitato con l'aggiunta di un secondo anticorpo - PEG. Le provette vengono quindi centrifugate, decantate e contate con un contatore gamma; la concentrazione di Gastrina nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

L'anticorpo usato nel dosaggio ha una cross-reagisce con la gastrina-34 e con le forme solfatate di gastrina-17 e gastrina-34.

4 PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

I regolamenti che riguardano l'uso e la detenzione di materiale radioattivo possono essere diversi da paese a paese; il responsabile del laboratorio deve conoscere i regolamenti locali per quanto riguarda il tipo e la quantità di radioattivo contenuta in questo kit.

Alcuni reattivi presenti nel kit sono di origine umana e si sono rivelati negativi per HIV1 e HIV2, HBV e HCV. Questi reattivi devono essere manipolati come in grado di trasmettere malattie infettive.

Norme di radioprotezione

- L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.
- Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione.
- Non pipettare materiale radioattivo con pipette a bocca. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo.
- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- I banchi da lavoro devono essere sempre coperti con carta assorbente monouso.
- Il materiale radioattivo eventualmente disperso nell'ambiente di lavoro deve essere immediatamente asportato con carta assorbente che deve poi essere eliminata nei contenitori per rifiuti radioattivi solidi. Le superfici interessate devono essere lavate con un liquido decontaminante adeguato.

Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature eventualmente interessate da questi depositi esplosivi devono essere lavate con una soluzione di idrossido di sodio 10N.

5 CONTENUTO DEL KIT

Il kit contiene reattivi sufficienti per eseguire 100 determinazioni di gastrina.

1.

REAG	A	Ab
------	---	----

 Anticorpo anti gastrina da coniglio preparato usando come immunogeno gastrina-17 coniugata con albumina bovina. L'anticorpo, 21 mL, è pronto per l'uso. Diluente: tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4, albumina umana 0.25%, sodio azide 0.05%.
Colore: giallo.
2.

REAG	B	Ag	¹²⁵ I
------	---	----	------------------

 Il flacone contiene gastrina marcata con ¹²⁵I, con attività totale di 66 kBq (1.8 µCi) alla data di riferimento, prodotto per moniodinazione di gastrina-17 e purificazione con HPLC. Attività specifica 62-77 Mbq/nmol (1700-2100 µCi/nmol). Il marcato è liofilizzato in 2.5 mL di tampone fosfato 0.5 M, pH 7.4, albumina umana 2.5%, sodio azide 0.5%; contiene 0.12 mL di siero normale di coniglio. Colore: blu. Ricostituire con 25 mL di acqua distillata.
3.

REAG	C	Dab
------	---	-----

 Anticorpo anti IgG di coniglio da capra, 50 mL, pronto per l'uso, in tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4, albumina umana 0.25% e sodio azide 0, 05%.
Contiene PEG 6000 al 5% p/v.
Colore: rosso.
4.

REAG	D	ASSAY	BUF
------	---	-------	-----

 Il flacone contiene 40 mL di tampone fosfato 0.05M, pH 7.4, albumina umana 0.25%, sodio azide 0.05%.
5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 Concentrazione dopo ricostituzione : 500pmol/l.
Il flacone contiene 5.00 ml di gastrina-17 umana sintetica, liofilizzata in tampone fosfato 0.05M, pH 7.4, albumina umana 0.25% e sodio azide 0, 05%.
Ricostituire con 5 mL di acqua distillata.
6.

REAG	F-G	Control
------	-----	---------

 I controlli, dopo ricostituzione contengono 1 mL di gastrina a concentrazioni normali ed elevate.

Materiale Richiesto, Ma Non Fornito

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

1. Provette in polistirene o polipropilene 11-13 x 55 mm
2. Micropipette di precisione con puntali monouso (100, 200 e 500 µL)
3. Micropipette a ripetizione da 200 e 500 µL
4. Agitatore tipo Vortex
5. Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)
6. Sistema di aspirazione o decantazione
7. Contatore gamma programmato per leggere ¹²⁵I.

Preparazione E Conservazione Dei Reattivi

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.

Reattivo A: Anticorpo anti gastrina

Pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C.

Reattivo B: gastrina-¹²⁵I

Ricostituire con 25 mL di acqua bidistillata. Conservare a 2-8°C.

Reattivo C: Secondo anticorpo – PEG.

Pronto per l'uso. Agitare con cura prima dell'uso. Conservare a 2-8°C.

Reattivo D: tampone

Pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C.

Reattivi E : Calibratore di gastrina

Ricostituire con 5 mL di acqua bidistillata. Conservare gli calibratore avanzati a -18°C o a temperature inferiori.

Reattivi F-G : Controlli

Ricostituire con 1 mL di acqua distillata. Conservare i controlli avanzati a -18°C o a temperature inferiori.

6 CAMPIONI

I pazienti 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.

7 METODO DEL DOSAGGIO

7.1 Procedura

Per ottenere risultati ottimali è indispensabile una buona riproducibilità del sistema di pipettamento. Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso. Eseguire il dosaggio in duplicato (Calibratore, controlli, campioni, NSB e attività totale).

Un dosaggio completo comprende:

Calibratore : a sette livelli: 0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 e 500 pmol/L.

Controlli : due controlli a concentrazione bassa e elevata di gastrina.

Campioni.

Provette per la determinazione **del legame non specifico (provette NSB)**.

Provette per la determinazione **dell'attività totale (provette Tot)**.

Il metodo è riportato in dettaglio nelle paragrafo 10

Prima dell'uso portare i reattivi a temperatura ambiente.

- Preparare le soluzioni di lavoro degli calibratore a partire dallo calibratore 500 pmol/L reattivo E) con il tampone(reattivo D), secondo il seguente schema:
 - a. Reattivo = 500 pmol/L
 - b. 1.00 mL calibratore 500 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 250 pmol/L
 - c. 1.00 mL calibratore 250 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 125 pmol/L
 - d. 1.00 mL calibratore 125 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 62,5 pmol/L
 - e. 1.00 mL calibratore 62,5 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 31,2 pmol/L
 - f. 1.00 mL calibratore 31,2 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 15,6 pmol/L
 - g. Tampone = 0 pmol/L
- Ricostituire i reattivi secondo le istruzioni.
- Pipettare 100 µL di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette. Pipettare 300 µL di tampone (reattivo D) nelle provette degli NSB degli calibratore e 300 µL di tampone (reattivo D) seguite da 100 µL di un siero qualsiasi nelle provette degli NSB dei campioni.
- Pipettare 200 µL di Gastrina¹²⁵ I (reattivo B) in tutte le provette. Mettere da parte le provette per l'attività totale e tappearle.
- Aggiungere 200 µL di anticorpo anti Gastrina (reattivo A) in tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale e per gli NSB.
- Agitare su vortex e incubare 60 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
- Aggiungere 500 µL di secondo anticorpo – PEG (reattivo C) a tutte le provette tranne quelle per l'attività totale. Agitare su vortex e incubare 30 min. a temperatura ambiente.
- Centrifugare le provette 15 min. a 4°C (1700 x g).
- Eliminare immediatamente il surnatante per decantazione. Misurare la radioattività del precipitato, frazione legata, di tutte le provette per almeno due minuti in un contatore gamma.

7.2 Calcolo dei risultati

- Sottrarre la media delle cpm degli NSB degli calibratore dalle cpm dei replicati degli calibratore; sottrarre la media delle cpm degli NSB dei campioni dalle cpm dei replicati dei controlli e dei campioni.
- Generare la curva calibratore riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli calibratore.
- Le concentrazioni di Gastrina in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione delle rispettive cpm della frazione legata B o del rapporto di competizione B/T% sulla curva calibratore.
- Se si usa un sistema di elaborazione computerizzato.

8 CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

8.1 Sensibilità

La sensibilità, calcolata come dose calcolata dalla curva calibratore della media – 2 DS delle cpm dello calibratore zero è risultata essere 5 pmol/L.

8.2 Accuratezza

L'aggiunta di quantità note di Gastrina a campioni con valore compreso tra 65 e 222 pmol/L ha permesso un recupero medio del 97.6%.

8.3 Precisione

8.3.1 Variazione intra saggio

Livello	Coefficiente di variazione	N
41 pmol/L	3.0%	20
135 pmol/L	2.2%	20

8.3.2 Variazione inter saggio

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
47 pmol/L	7.5%	17
165 pmol/L	6.2%	17

8.4 Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

<u>Sostanza</u>	<u>Cross reazione</u>
Gastrina-17	100 %
Gastrina-17, solfatata	83 %
Gastrina-34	61 %
CCK-8	38 %
Gastrina 1-14	< 0.1 %
Gastrin Releasing Peptide	< 0.01%
VIP	< 0.01%
Motilina	< 0.01%
Glucagone	< 0.01%
Somatostatina 14	< 0.01%
C-peptide	< 0.01%

9 CONTROLLO DI QUALITA'

9.1 Concentrazione trovata dei controlli

I controlli (Reattivi F - G) devono essere nei limiti riportati sulle etichette dei flaconi.

9.2 Attività totale

Le cpm ottenute devono essere approssimativamente quelle attese dopo correzione per l'efficienza del contatore e per il decadimento del radioattivo. La radioattività misurata per 500 µL di Gastrina¹²⁵ I deve essere 25000 cpm (-5%, +20%) alla data riportata come riferimento (efficienza del contatore 80%).

9.3 Capacità legante (Bo/T)%

La capacità legante, rapporto tra le cpm dello calibratore zero e le cpm dell'attività totale deve essere compresa tra 45 e 65 % alla data riportata come riferimento.

9.4 Legame non specifico (NSB/T)%

Il legame non specifico, rapporto tra le cpm degli NSB e le cpm dell'attività totale deve essere inferiore al 5%.

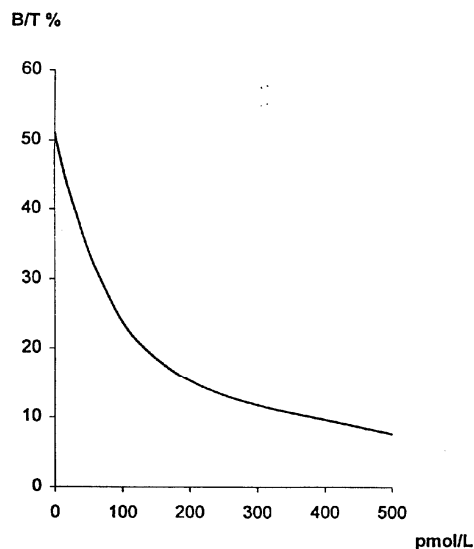
9.5 Pendenza della curva

Calcolare ogni volta le intercette ai rapporti di competizione (B/ Bo) 80, 50, 20% e valutare le caratteristiche della curva.

10 SCHEMA DEL DOSAGGIO RIA

Provetta	Numero	Calibratore, campioni o controlli	Tampone	Marcato gastrina ¹²⁵ I	Anticorpo anti gastrina (Reattivo A)		Secondo anticorpo + PEG	
T	1-2	-	-	200 µL	-	Agitare su vortex e incubare 60 min a temperatura ambiente	-	Agitare su vortex e incubare 30min a temperatura ambiente
NSB _{st}	3-4	-	300 µL	200 µL	-		500 µL	
Calib. zero	5-6	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Calib . 15.6	7-8	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Calib . 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Calib . 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Calib . 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Calib . 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Calib . 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
NSB _{campione}	19-20	100 µL	200 µL	200 µL	200 µL		500 µL	
Contr. (L)	21-22	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	Decantare at 4° C o aspirare il surnatante e contare la radioattività del precipitato
Contr. (M)	23-24	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Campione 1	25-26	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Ecc.								

EXAMPLE OF GASTRIN CALIBRATORE CURVE



11 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.

Data di revisione: 2009-11-24



GASTRIN-RIA



KIPEMD302

IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Βέλγιο - Τηλ: +32 67 88 99 99 - Φαξ : +32 67 88 99 96

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γαστρίνη και τα πνευμονογαστρικά νεύρα αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές έκκρισης του γαστρικού οξέος. Υπάρχουν ωστόσο και άλλοι παράγοντες που συντελούν στην έκκριση του γαστρικού οξέος. Η γαστρίνη παράγεται κυρίως στο βλεννογόνο του άντρου και του πυλωρού του στομάχου. Κάποια λίγα κύτταρα που παράγουν γαστρίνη ανευρίσκονται επίσης στο δωδεκαδάκτυλο και το πάγκρεας.

Η γαστρίνη απαντάται στον ανθρώπινο ορό με διάφορες μορφές. Ένα αμιδούχο C-τελικό άκρο είναι απαραίτητο για τη βιολογική δράση των γαστρινών.

Η προγαστρίνη αποτελεί προϊόν διάσπασης της προ-προγαστρίνης. Έχει φανεί πως η προγαστρίνη είναι μερικώς θειωμένη στα υπολείμματα τυροσίνης. Η προγαστρίνη διασπάται ενζυματικά στις κύριες κυκλοφορούσες μορφές της βιολογικά ενεργής γαστρίνης: γαστρίνη-34 και γαστρίνη-17, ο οποίες απαντώνται σε θειωμένες και μη θειωμένες μορφές. Στον ορό έχει ανιχνευθεί μικρή ποσότητα γαστρίνης-52 (ή αλλιώς συστατικό 1), γαστρίνης-14 (mini-γαστρίνη), αλλά ακόμη και μικρότερα τμήματα.

2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ

Η γαστρίνη είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες γαστρεντερικές ορμόνες. Απαντάται στην κυκλοφορία σε διάφορες μορφές, μεταξύ των οποίων ως γαστρίνη-34 και γαστρίνη-17, σε θειωμένη και μη θειωμένη μορφή.

Ο προσδιορισμός της γαστρίνης είναι χρήσιμος στη διάγνωση όγκων που παράγουν γαστρίνη και αχυλίας με ή χωρίς κακοήγη αναιμία. Όλες αυτές οι κλινικές οντότητες σχετίζονται με υψηλή συγκέντρωση γαστρίνης στον ορό. Η θεραπεία με ισχυρούς παράγοντες αναστολής της έκκρισης ενδέχεται να προκαλέσει αύξηση της συγκέντρωσης γαστρίνης στον ορό, λόγω μειωμένης αναδραστικής (feedback) από το γαστρικό οξύ αναστολής της απελευθέρωσης γαστρίνης. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση της γαστρίνης ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της θεραπείας με αναστολείς της έκκρισης.

Φυσιολογικά επίπεδα γαστρίνης στον ανθρώπινο ορό: ≤ 60 pmol/L (επίπεδο νηστείας που λαμβάνεται με την παρούσα διαδικασία).

Μέση τιμή: $25 \text{ pmol/L} \pm 10 \text{ pmol/L}$ (1SD).

Εύρος: $11-54 \text{ pmol/L}$.

3 ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η χρήση για την οποία προορίζονται τα παρόντα αντιδραστήρια είναι ο προσδιορισμός της γαστρίνης σε ανθρώπινο ορό. Η γαστρίνη ορού προσδιορίζεται μέσω ενός ανταγωνιστικού ραδιοαναστοπροσδιορισμού με χρήση αντιορού κονίκλου έναντι ενός συζεύγματος γαστρίνης 17-λευκωματίνης. Η γαστρίνη σε βαθμονομητές και δείγματα ανταγωνίζεται με τη σημασμένη με ^{125}I γαστρίνη-17 για την πρόσδεση στα αντισώματα. Η 125I-γαστρίνη προσδένεται σε αντίστροφη αναλογία προς τη συγκέντρωση της γαστρίνης σε βαθμονομητές και δείγματα. Η προσδεμένη σε αντίσωμα 125I-γαστρίνη διαχωρίζεται από το ελεύθερο κλάσμα με χρήση της τεχνικής καθίζησης διπλού αντισώματος-πολυαιθυλενογλυκόλης. Μετράται η ραδιενέργεια των ιζημάτων. Ο αντιορός που χρησιμοποιείται σε αυτόν τον προσδιορισμό εμφανίζει διασταυρούμενη αντίδραση με τη γαστρίνη-34 και τις θειωμένες μορφές της γαστρίνης-17 και της γαστρίνης-34.

4 ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Μόνο για in vitro διαγνωστική χρήση. Το παρόν kit περιλαμβάνει ^{125}I (χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), εκπέμπον ιοντίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35,5 keV).

Καθώς ενδέχεται οι κανονισμοί να διαφέρουν από χώρα σε χώρα, ο υπεύθυνος του εργαστηρίου θα πρέπει να είναι εξοικειωμένος με τις ισχύουσες τοπικές διατάξεις που αφορούν όλες τις πτυχές των ραδιενεργών υλικών του τύπου και της ποσότητας που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εξέταση.

Το παρόν kit περιέχει συστατικά ανθρώπινης προέλευσης. Τα συστατικά αυτά, έχουν ελεγχθεί με ανοσοπροσδιορισμό και διαπιστώθηκε πως είναι αρνητικά ως προς την παρουσία του επιφανειακού αντιγόνου της ηπατίτιδας Β, αντισωμάτων κατά του HCV και αντισωμάτων κατά των HIV-1 και HIV-2. Θα πρέπει, ωστόσο, να ακολουθούνται όλες οι συνιστώμενες προφυλάξεις σχετικά με το χειρισμό παραγώγων αίματος.

Θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για τη διασφάλιση του ορθού χειρισμού του ραδιενεργού υλικού, σύμφωνα με τους τοπικές και/ή εθνικές διατάξεις. Η πρόσβαση στα αντιδραστήρια θα πρέπει να επιτρέπεται μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.

Θα πρέπει να τηρούνται τα εξής μέτρα προφύλαξης κατά το χειρισμό ραδιενεργών υλικών:

- Το ραδιενεργό υλικό θα πρέπει να αποθηκεύεται σε ειδικά καθορισμένους χώρους, στους οποίους δεν έχει πρόσβαση μη εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
- Ο χειρισμός των ραδιενεργών υλικών θα πρέπει να λαμβάνει χώρα μόνο σε ειδικούς για το σκοπό αυτό χώρους.
- Θα πρέπει να ενεργείτε με προσοχή για να αποφύγετε κατάποση και επαφή με το δέρμα ή τα ρούχα. Μη διανέμετε με πιπέτα ραδιενεργά διαλύματα χρησιμοποιώντας το στόμα σας.
- Η λήψη υγρών, τροφών και το κάπνισμα θα πρέπει να απαγορεύονται σε χώρους χρήσης ραδιενεργού υλικού.
- Προστατεύετε τα χέρια σας με γάντια και πλένετέ τα μετά τη χρήση ραδιενεργών υλικών.
- Οι εργασίες θα πρέπει να εκτελούνται σε επιφάνεια καλυμμένη με απορροφητικό υλικό μίας χρήσης.
- Διαρροές ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να απομακρύνονται αμέσως και όλα τα μολυσμένα υλικά να απορρίπτονται ως ραδιενεργά απόβλητα. Οι μολυσμένες επιφάνειες θα πρέπει να καθαρίζονται με απορρυπαντικό.

Τα αντιδραστήρια του παρόντος κιτ περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Τυχόν επαφή με υδραυλικές σωληνώσεις χαλκού ή μόλυβδου μπορεί να οδηγήσει σε σωρευτικό σχηματισμό ιδιαίτερα εκρηκτικών αποθέσεων αζιδίου. Μετά την απόρριψη των αντιδραστηρίων στο αποχετευτικό σύστημα, εκπλύνετε πάντοτε με άφθονες ποσότητες νερού, για την αποφυγή σχηματισμού μεταλλικού αζιδίου. Υδραυλικές εγκαταστάσεις, στις οποίες υπάρχει υποψία πως έχουν σχηματιστεί αυτές οι εκρηκτικές αποθέσεις θα πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά με διάλυμα 10% υδροξειδίου του νατρίου.

5 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Περιεχόμενα του κιτ

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται σε κάθε κιτ επαρκούν για 100 σωληνάρια.

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

Αντιορός κονίκλου έναντι συνθετικής ανθρώπινης γαστρίνης-17 συζευγμένης με βόεια ορολευκωματίνη, 21mL αντιορός. Διάλυμα αραιώσης: 0,05 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4, 0,25 % ανθρώπινη ορολευκωματίνη και 0,05 % αζίδιο νατρίου. Χρώμα: κίτρινο.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

Περιέχει 66 KBq ή 1,8 μCi την ημερομηνία αναφοράς δραστηριότητας. Η συνθετική ανθρώπινη γαστρίνη-17 είναι ιωδιωμένη. Η μονοϊωδιωμένη μορφή έχει καθαριστεί με HPLC. Ειδική δραστηριότητα: 1700-2100 μCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Λυοφιλοποιημένο σε 2,5mL, 0,5 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4, με 2,5 % ανθρώπινη ορολευκωματίνη και 0,5 % αζίδιο νατρίου. Περιέχει 0,12mL φυσιολογικού ορού κονίκλου. Χρώμα: μπλε. Ανασύσταση σε 25mL απεσταγμένου νερού.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | C | DAb |
|------|---|-----|

50 mL αραιωμένου Ig αντιορού αντι-κονίκλου αίγας σε 0,05 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4, 0,25 % ανθρώπινη ορολευκωματίνη και 0,05 % αζίδιο του νατρίου. Περιέχει 5,0 % (w/v) πολυαιθυλενογλυκόλη 6000. Χρώμα : κόκκινο.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

40 mL 0,05 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4, με 0,25 % ανθρώπινη ορολευκωματίνη και 0,05 % αζίδιο νατρίου.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

Λυοφιλοποιημένο. Συγκέντρωση μετά την ανασύσταση : 500pmol/L . Ο βαθμονομητής έχει παραχθεί από συνθετική ανθρώπινη γαστρίνη-17. Αραιωμένος σε 0.05 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4, 0,25 % ανθρώπινη ορολευκωματίνη, 0.05 % αζίδιο νατρίου. Ανασύσταση σε 5,00 mL απεσταγμένου νερού.
- | | | |
|------|-----|---------|
| REAG | F-G | Control |
|------|-----|---------|

Μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools) λυοφιλοποιημένου ορού με χαμηλή (κανονική) και υψηλή συγκέντρωση γαστρίνης. 1,00 mL κάθε ορού ελέγχου μετά την ανασύσταση. Βλ. ακριβείς τιμές στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Απαιτούμενος εξοπλισμός που δεν παρέχεται

- Δοκιμαστικά σωληνάρια 11-13 x 55 mm, πολυστυρενίου, μίας χρήσης.
- Πιπέτες με αναλώσιμα ρύγχη, 100, 200 και 500 μl.
- Μία επαναληπτική πιπέτα, π.χ. Eppendorf Multipette, για όγκους 200 και 500 μL θα διευκολύνει τη διανομή των αντιδραστηρίων.
- Αναμεικτήρας στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Φυγόκεντρος, με δυνατότητα τουλάχιστον 1700 x g (προτιμάται ψυχόμενη φυγόκεντρος).
- Μετρητής γ ακτινοβολίας τύπου πηγαδιού (well-type).

Προετοιμασία και φύλαξη των αντιδραστηρίων

Φυλάσσετε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8° C πριν από την ανασύσταση και τη χρήση. Η σταθερότητα των αντιδραστηρίων επισημαίνεται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Για τα λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια η ημερομηνία λήξης ισχύει για τα μη ανασυσταθέντα αντιδραστήρια. Τα ανασυσταθέντα αντιδραστήρια είναι σταθερά επί 8 εβδομάδες, αν φυλαχθούν σωστά.

Το νερό που θα χρησιμοποιηθεί για την ανασύσταση των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων θα πρέπει να έχει αποσταχθεί σε εξ ολοκλήρου γυάλινη συσκευή ή να είναι ανάλογης καθαρότητας. Διαλύστε το περιεχόμενο σε ένα φιαλίδιο με ήπια ανάδευση και αποφύγετε το σχηματισμό αφρού.

Αντιδραστήριο A: Αντι-γαστρίνη

Έτοιμο για χρήση. Φυλάσσεται στους 2-8° C.

Αντιδραστήριο B: ¹²⁵I-γαστρίνη

Ανασυστήστε με 25 mL απεσταγμένου νερού. Φυλάσσεται στους 2-8° C.

Αντιδραστήριο C: PEG διπλού αντισώματος

Έτοιμο για χρήση. Αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση. Φυλάσσεται στους 2-8° C.

Αντιδραστήριο D: Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού

Έτοιμο για χρήση. Φυλάσσεται στους 2-8° C.

Αντιδραστήριο Ε: Βαθμονομητές γαστρίνης

Ανασύσταση σε 5,00 mL απεσταγμένου νερού.

Για την προετοιμασία των προτύπων εργασίας, βλ. διαδικασία ραδιοανοσοπροσδιορισμού

Αποθηκεύστε στους -18° C ή χαμηλότερα αν επαναχρησιμοποιηθεί.

Αντιδραστήριο F-G: Οροί ελέγχου

Ανασυστήστε κάθε φιαλίδιο με 1,00 mL απεσταγμένου νερού.

Αποθηκεύστε στους -18° C ή χαμηλότερα αν επαναχρησιμοποιηθεί.

6 ΔΕΙΓΜΑ

Συλλογή δείγματος

Οι ασθενείς δεν θα πρέπει να λάβουν τροφή για τουλάχιστον δέκα ώρες πριν από τη συλλογή του δείγματος. Το φλεβικό αίμα συλλέγεται σε σωληνάρια χωρίς πρόσθετα. Το δείγμα ψύχεται σε λουτρό πάγου και αφήνεται να πήξει. Ο ορός διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση στους +4° C.

Ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί εντός 4 ωρών και να φυλαχθεί στους -18° C ή χαμηλότερα, έως την εκτέλεση του προσδιορισμού. Αποφύγετε επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη.

7 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

7.1 Διαδικασία

- Ανασυστήστε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με τις οδηγίες.
- Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Η ακρίβεια σε όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα είναι σημαντική. Όλες οι δοκιμασίες (βαθμονομητές, οροί ελέγχου και δείγματα) θα πρέπει να εκτελούνται εις διπλούν. Ένας πλήρης προσδιορισμός περιλαμβάνει:

Βαθμονομητές : 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 και 500 pmol/L.

Ορούς ελέγχου : Υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης.

Δείγματα.

Σωληνάρια για τον προσδιορισμό της **μη ειδικής δέσμευσης (σωληνάρια NSB).**

Σωληνάρια για τον προσδιορισμό της **ολικής ραδιενέργειας (σωληνάρια TOT).**

Μία επισκόπηση θα βρείτε στην ενότητα 10.

- Ανασυστήστε τα λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια σύμφωνα με τις οδηγίες της σελίδας 7 και αφήστε τα αντιδραστήρια να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.
- Προετοιμάστε τα πρότυπα εργασίας γαστρίνης αραιώνοντας το βαθμονομητή Γαστρίνης 500pmol/L

(Αντιδραστήριο Ε) με ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού (Αντιδραστήριο D) σύμφωνα με το ακόλουθο παράδειγμα:

- Αντιδραστήριο Ε μετά την ανασύσταση = 500 pmol/L
 - 1,0 mL βαθμονομητή 500 pmol/L + 1,0 mL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού = 250 pmol/L
 - 1,0 mL βαθμονομητή 250 pmol/L + 1,0 mL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού = 125 pmol/L
 - 1,0 mL βαθμονομητή 125 pmol/L + 1,0 mL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού = 62.5 pmol/L
 - 1,0 mL βαθμονομητή 62.5 pmol/L + 1,0 mL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού = 31.2 pmol/L
 - 1,0 mL βαθμονομητή 31.2 pmol/L + 1,0 mL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού = 15.6 pmol/L
 - Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού = 0 pmol/L
- (Φυλάξτε τα πρότυπα στους -20° C ή χαμηλότερα εάν επαναχρησιμοποιηθούν).

- Διανείμετε με πιπέτα 100 μL βαθμονομητών, ορών ελέγχου και δειγμάτων στα αντίστοιχα σωληνάρια. Διανείμετε με πιπέτα 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού (Αντιδραστήριο D) σε σωληνάρια βαθμονομητών NSB και 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού σε σωληνάρια δειγμάτων NSB. Προσθέστε 100 μL οποιουδήποτε δείγματος στα δύο σωληνάρια δειγμάτων NSB.
- Διανείμετε με πιπέτα 200 μL ¹²⁵I-γαστρίνης (Αντιδραστήριο Β) σε όλα τα σωληνάρια. Κλείστε τα σωληνάρια TOT και αφήστε τα κατά μέρος.
- Διανείμετε με πιπέτα 200 μL αντι-γαστρίνης (Αντιδραστήριο Α) σε όλα τα σωληνάρια **εκτός** από τα NSB και TOT.
- Αναμίξτε (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) προσεκτικά τα σωληνάρια και επωάστε επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25° C).
- Προσθέστε 500 μL καλά αναμεμιγμένου PEG διπλού αντισώματος (Αντιδραστήριο C) σε όλα τα σωληνάρια **εκτός** από τα TOT. Αναμίξτε (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) προσεκτικά και επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρίστε επί 15 λεπτά σε τουλάχιστον 1700 x g, θερμοκρασία 4° C.
- Μεταγγίστε το υπερκείμενο αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση και μετρήστε τη ραδιενέργεια των ιζημάτων σε μετρητή γ ακτινοβολίας.

7.2 Υπολογισμοί

- Αφαιρέστε το μέσο αριθμό κρούσεων (CPM) του βαθμονομητή NSB από τον αριθμό κρούσεων (CPM) των αντιγράφων των βαθμονομητών, και τα δείγματα NSB από τους ορούς ελέγχου και τα δείγματα.
- Δημιουργείται μία καμπύλη βαθμονόμησης μέσω αποτύπωσης του δεσμευμένου κλάσματος, B/TOT έναντι των συγκεντρώσεων των βαθμονομητών γαστρίνης. Ένα παράδειγμα καμπύλης βαθμονόμησης παρατίθεται στην ενότητα 10.
- Υπολογίστε με παρεμβολή τις συγκεντρώσεις γαστρίνης των ορών ελέγχων και των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργήθηκε.
- Η καμπύλη βαθμονόμησης και ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων σε δείγματα μπορεί να εκτελεστεί με μέθοδο υπολογιστή.

8 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

8.1 Ευαισθησία

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση είναι 5 pmol/L. Ο αριθμός αντιστοιχεί σε μείωση της δέσμευσης δύο x SD της δεσμευμένης ραδιενέργειας στο βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης.

8.2 Ορθότητα

Μία μέση ανάκτηση 97,6% επιτεύχθηκε όταν γνωστές ποσότητες γαστρίνης στο εύρος 65-222 pmol/L προστέθηκαν στα δείγματα ορού.

8.3 Ακρίβεια

8.3.1 Διακύμανση εντός του ίδιου προσδιορισμού

Επίπεδο	Συντελεστής διακύμανσης (%CV)	N
41 pmol/L	3,0%	20
135 pmol/L	2,2%	20

8.3.2 Διακύμανση μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών

Επίπεδο	Συντελεστής διακύμανσης (%CV)	N
47 pmol/L	7,5%	17
165 pmol/L	6,2%	17

8.4 Ειδικότητα

Βρέθηκαν οι εξής διασταυρούμενες αντιδράσεις:

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση
Γαστρίνη-17	100,0%
Γαστρίνη-17, θειωμένη	83 %
Γαστρίνη-34	61 %
CCK-8	36 %
Γαστρίνη 1-14	<0,1 %
Απελευθερωτικό πεπτιδίο γαστρίνης	<0,01%
Αγγειοδραστικό εντερικό πεπτιδίο	<0,01%
Μοτιλίνη	<0,01%
Γλυκαγόνο	<0,01%
Σωματοστατίνη 14	<0,01%
C-πεπτιδίο	<0,01%

9 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

9.1 Οι ευρεθείσες συγκεντρώσεις των ορών ελέγχου

(Αντιδραστήριο F και G) βρίσκονται εντός των ορίων που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων.

9.2 Συνολικές μετρήσεις

Οι μετρήσεις που λάβατε θα πρέπει να προσεγγίζουν το αναμενόμενο ρυθμό κρούσεων CPM όταν προσαρμόζονται για την αποτελεσματικότητα του μετρητή και την εξασθένηση της ραδιενέργειας. Το περιεχόμενο ¹²⁵I-γαστρίνης σε αυτό το κιτ θα δώσει 25 000 CPM (-5%, +20%) την ημερομηνία αναφοράς δραστηριότητας (αποτελεσματικότητα μετρητή = 80%).

9.3 Μέγιστη δέσμευση (Bo/TOT)

Υπολογίστε για κάθε προσδιορισμό το ποσοστό % της δεσμευμένης ραδιενέργειας στο μηδενικό βαθμονομητή. $\frac{Bo}{TOT} \times 100$.

$\frac{Bo}{TOT} \times 100$ είναι γενικά 45-65%, όταν ελέγχεται την ημερομηνία αναφοράς δραστηριότητας.

9.4 Μη ειδική δέσμευση (NSB/TOT)

Υπολογίστε για κάθε προσδιορισμό το ποσοστό % μη ειδικής δέσμευσης $\frac{NSB}{TOT} \times 100$.

$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ είναι μικρότερο από 5%.

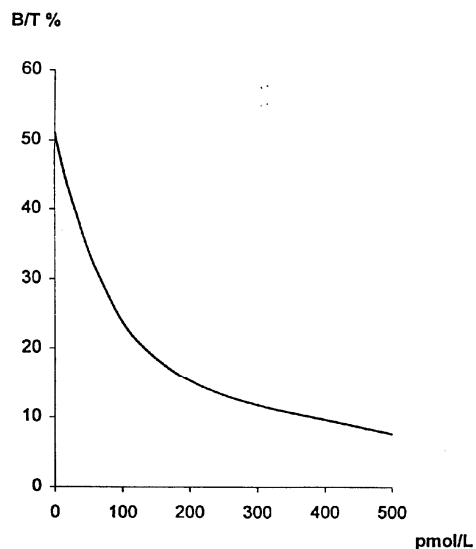
9.5 Κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

Για παράδειγμα, παρακολουθήστε τα σημεία 80, 50 και 20% της γραμμής βαθμονόμησης για την αναπαραγωγιμότητα από εκτέλεση σε εκτέλεση.

10 ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ RIA

Τύπος σωληναρίων	Αριθμός σωληναρίων	Δείγμα βαθμονόμησης ή ορός ελέγχου	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού (D)	¹²⁵ I-γαστρίνη με NRS (B)	Αντι-γαστρίνη (A)		PEG διπλού αντισώματος (C)	
TOT NSB _{st}	1- 2	-	-	200 μL	-	Αναμείξτε σε	-	Αναμείξτε σε
Βαθμον 0	3- 4	-	300 μL	200 μL	-	συσκευή	500 μL	συσκευή
Βαθμον 15,6	5- 6	100 μL	-	200 μL	200 μL	τύπου	500 μL	τύπου vortex
Βαθμον 31,3	7- 8	100 μL	-	200 μL	200 μL	vortex	500 μL	και επωάστε
Βαθμον 62,5	9-10	100 μL	-	200 μL	200 μL	και	500 μL	επί 30 λεπτά
Βαθμον 125	11-12	100 μL	-	200 μL	200 μL	επωάστε	500 μL	σε
Βαθμον 250	13-14	100 μL	-	200 μL	200 μL	επί 60	500 μL	θερμοκρασία
Βαθμον 500	15-16	100 μL	-	200 μL	200 μL	λεπτά σε	500 μL	δωματίου
NSB Δείγμα	17-18	100 μL	-	200 μL	200 μL	θερμοκρασία	500 μL	Φυγοκεντρίστε
Ορός ελέγχου χαμηλής συγκ.	19-20	100 μL	200 μL	200 μL	-	δωματίου	500 μL	επί
Ορός ελέγχου υψηλής συγκ.	21-22	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	15 λεπτά σε
Δείγμα 1	23-24	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	1700 x g.
	25-26	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	Μεταγγίστε στους 4°C και μετρήστε τη ραδιενέργεια των ιζημάτων.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΑΣΤΡΙΝΗΣ



11 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Ημερομηνία αναθεώρησης : 2009-11-24



GASTRIN-RIA

SV**KIPEMD302****IN VITRO DIAGNOSTISK ANVÄNDNING**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTRODUKTION

Gastrin och vagalnerverna är de viktigaste regulatorerna av magsyrasekretionen, men även andra faktorer än gastrin bidrar till magsyrasekretion. Gastrinproduktionen sker huvudsakligen i den antropylora mucosan i magsäcken. Ett fåtal gastrinproducerande celler kan också finnas i tolvfingertarmen och pankreas.

Gastrin förekommer i många olika former i human serum. En amiderad C-terminal är essentiell för den biologiska aktiviteten av gastrinerna.

Progastrin klyvs från preprogastrin. Det har visats att progastrin är delvis sulfaterat i tyrosinresterna. Progastrinet klyvs enzymatiskt till de viktigaste cirkulerande formerna av biologiskt aktivt gastrin: Gastrin-34 och gastrin-17, vilka båda förekommer i sulfaterade och icke-sulfaterade former. Små mängder av gastrin-52 (även benämnd komponent 1), gastrin-14 (mini-gastrin) och ännu mindre fragment har detekterats i serum.

2 KLINISKA ÖVERVÄGANDEN

Gastrin är en av de mest studerade hormonerna i matsmältningskanalen. Det förekommer i cirkulationen i flera olika former, bland andra gastrin-34 och gastrin-17, sulfaterat och icke-sulfaterat.

Bestämning av gastrin är användbar i diagnosen av gastrinproducerande tumörer och achylia med eller utan pernicios anemi. I alla dessa kliniska situationer är serumgastrinkoncentrationen förhöjd. Behandling med kraftfulla syrasekretionshämmare kan förorsaka en förhöjning i serumgastrinkoncentrationen beroende på en försämrad syra-feedback i inhibitionen av gastrinfrisättning. Mätning av serumgastrin kan sålunda användas för att följa behandling med syrasekretionshämmare.

Normal nivå av gastrin i humant serum: ≤ 60 pmol/L (fastenivå erhållen med denna metod).

Medelvärde: 25 pmol/L $\pm$ 10 pmol/L (1 SD).

Intervall: 11-54 pmol/L.

3 PRINCIPERNA BAKOM METODEN

Dessa reagens är avsedda för bestämning av gastrin i serum hos människa. Gastrin i serum bestäms genom kompetitiv radioimmunoanalys med ett antiserum från kanin som framtagits mot ett gastrin-17-albuminkonjugat. Gastrin i kalibrator och analysprov konkurrerar med.

125 I-märkt gastrin-17 om bindning till antikropparna. 125 I-gastrin binder till antikropparna i omvänd proportion till mängden av gastrin i kalibrator och analysprov. Antikroppsbundet.

125 I-gastrin separeras från den obundna fraktionen med hjälp av dubbel antikropp-polyetylen glykolt teknik. Radioaktiviteten i fällningen mäts. Antiserum som används vid denna analys korsreagerar med gastrin-34 och de sulfaterade formerna av gastrin-17 och gastrin-34.

4 VARNING

Endast för in vitro diagnostik. Detta kit innehåller 125 I (halveringstid: 60 dagar), avger röntgen (X: 28 keV) och gamma (γ : 35.5 keV) strålar.

Eftersom föreskrifter varierar från land till land, är det av vikt att den person som är ansvarig för laboratoriet känner till gällande föreskrifter avseende radioaktivt material av den typ och mängd som används i denna analys.

Kitet innehåller komponenter med humant ursprung. Dessa har testats för hepatit B antigen samt antikroppar mot HCV, HIV-1 och HIV-2 och befunnits negativa. Komponenterna ska trots detta hanteras som möjlig smittrisk.

Vidta åtgärder enligt lokala och/eller landets föreskrifter avseende handhavande av radioaktivt material. Endast bemyndigad personal ska ha tillgång till reagenserna.

Följande säkerhetsåtgärder ska iaktas vid handhavande av radioaktivt material:

- Radioaktivt material ska förvaras i härför avsedda utrymmen, normalt ej tillgängliga för ej bemyndigad personal.
- Hantering av radioaktivt material ska ske i för ändamålet avsedda utrymmen.
- Försiktighet ska iaktas för att förhindra intag och kontakt med huden och kläderna. Pipettera inte radioaktivt material med munnen.
- Att äta, dricka eller röka ska vara förbjudet i utrymmen där radioaktivt material hanteras.
- Handskar ska användas och händerna ska tvättas efter hantering av radioaktivt material.
- Hantering ska ske på yta täckt med absorberande material.
- Utspillt radioaktivt material ska torkas upp omedelbart och allt kontaminerat material ska kasseras som radioaktivt avfall. Kontaminerade ytor ska torkas av med rengöringsmedel.

Reagensen i kitet innehåller natriumazid. Kontakt med avloppsrör av koppar eller bly kan resultera i ackumulerad bildning av mycket explosiva azidavlagringar.

Vid utspolning av reagens i avloppet ska rikliga mängder vatten spolas med för att undvika uppkomst av metallisk azid. Rör som misstänks vara kontaminerade av explosiva avlagringar ska spolas/sköljas noggrant med 10% natriumhydroxidlösning.

5 REAGENSATSSENS INNEHÅLL

De reagens som medföljer varje sats räcker till 100 rör.

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

Antiserum från kanin framtaget mot syntetiskt humant gastrin-17, konjugerat med bovin serumalbumin. 21 mL antiserum. Spädningsmedel: 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid.
Färg: Gult.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

Innehåller per referensdatum 66 KBq eller 1.8 µCi. Syntetiskt humant gastrin-17 är joderat.
Den monojoderade formen renas med HPLC.
Specifik aktivitet: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Frystorkat i 2.5 mL 0.5 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 2.5% humant serumalbumin och 0.5% natriumazid.
Innehåller 0.12 mL normalt kaninserum.
Färg: Blått. Rekonstitueras med 25 mL destillerat vatten.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | C | Dab |
|------|---|-----|

50 mL utspätt getantiserum mot antikanin-Ig i 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid.
Innehåller 5.0% (m/v) polyetenglykol 6000.
Färg: Rött.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

40 mL 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

Frystorkat. Koncentration efter rekonstituering : 500 pmol/L.
Kalibratoren framställs av syntetiskt humant gastrin-17. Den har späts med 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid.
Rekonstitueras med 5 mL destillerat vatten.
- | | | |
|------|-----|---------|
| REAG | F-G | Control |
|------|-----|---------|

Frystorkat humant serum med låg (normal) och hög koncentration av gastrin. 1.00 mL av respektive kontrollprov efter rekonstituering.

Utrustning Som Behövs Men Inte Medföljer

Engångsprovör 11-13 x 55 mm, polystyren.

Pipetter med engångsspetsar, 100, 200 och 500 µL.

Tillsatsen av reagens underlättas av tillgång till en repeterande pipett, t ex Eppendorf Multipipette, för volymerna 200 och 500 µL.

Vortexblandare.

Centrifug som klarar minst 1700 x g (helst en kyld centrifug).

Gammarräknare.

Beredning Och Förvaring Av Reagens

Alla reagens ska förvaras vid 2-8° C fram till rekonstituering och användning. Reagensens stabilitet indikeras på ampullernas etiketter. För frystorkade reagens gäller utgångsdatum fram till rekonstituering. Rekonstituerade reagens är stabila i 8 veckor om de lagras på rätt sätt.

Det vatten som används för rekonstituering av frystorkade reagens ska vara destillerat i en glasapparat eller ha motsvarande renhet. Lös innehållet i ampullen genom att försiktigt vända på ampullen. Undvik skumbildning.

Reagens A : Anti-gastrin

Klart för användning. Förvaras vid 2-8° C.

Reagens B : ¹²⁵I-gastrin

Rekonstitueras med 25 mL destillerat vatten. Förvaras vid 2-8° C.

Reagens C : Dubbel antikropp-PEG

Klart för användning. Blandas väl före användning. Förvaras vid 2-8° C.

Reagens D : Analysbuffert

Klart för användning. Förvaras vid 2-8° C.

Reagens E : Gastrinkalibrator

Rekonstitueras med 5.00 mL destillerat vatten.

Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

För beredning av gastrin-kalibratorpunkterna se analysprocedur.

Reagens F-G : Kontrollprov

Varje ampull rekonstitueras med 1.00 mL destillerat vatten.

Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

6 PROV

Patienterna ska ha fastat minst tio timmar före provtagningen. Venöst blod uppsamlas i rör utan tillsatser. Provet kyls i isbad och får koagulera. Serum separeras genom centrifugering vid +4° C.

Serum bör frysas inom 4 timmar och förvaras vid -18° C eller lägre fram till analystillfället. Upprepad frysning-upptining bör undvikas.

7 ANALYSPROCEDUR

7.1 Procedur

Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna.

Reagensen bör få anta rumstemperatur innan de används. Noggrannhet vid all pipettering har avgörande betydelse. Alla analyser (kalibratoren, kontrollprover, analysprover) ska dubbleras. En fullständig analys omfattar:

Kalibratoren : 7 olika koncentrationer: 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 samt 500 pmol/L.

Kontrollprov : Låg och hög.

Analysprov.

Rör för bestämning av **icke-specifik bindning (NSB-rör)**.

Rör för bestämning av **total radioaktivitet (TOT-rör)**.

En översikt återfinns under punkt 10.

- Späd de frystorkade reagenserna enligt instruktionen på sidan 81. Reagensen ska vara rumstempererade vid användning.
- Bered gastrinkalibratorpunkterna genom spädning av gastrinkalibratoren med koncentrationen 500 pmol/l (reagens e) i analysbuffert (reagens d) enligt följande exempel:
 - a. Reagens E = 500pmol/L
 - b. 1.00 mL kalibrator 500 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 250 pmol/L
 - c. 1.00 mL kalibrator 250 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 125 pmol/L
 - d. 1.00 mL kalibrator 125 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 62,5 pmol/L
 - e. 1.00 mL kalibrator 62,5 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 31,2 pmol/L
 - f. 1.00 mL kalibrator 31,2 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 15,6 pmol/L
 - g. Spädningsbuffert = 0 pmol/L
- Förvara kalibratorpunkterna i -20° C eller lägre vid återanvändning.
- Pipettera 100 µL av kalibrator, kontrollprov och analysprov i respektive provrör. Pipettera 300 µL analysbuffert (reagens D) i NSB- kalibrator provrör och 200 µL analysbuffert i NSB-analysprovrör. Tillsätt 100 µL av eventuellt prov i de båda NSB-analysprovrören.
- Pipettera 200 µL av ¹²⁵I-gastrin (reagens B) i samtliga rör. Sätt lock på TOT-rören och ta undan dem.
- Pipettera 200 µL av anti-gastrin (reagens A) i samtliga rör **utom** NSB- och TOT-rören.
- Blanda innehållet i rören noggrant med vortexblandare och inkubera sedan i 60 minuter vid rumstemperatur (20-25° C).
- Tillsätt 500 µL väl blandat dubbel antikropp-PEG (reagens C) i samtliga rör **utom** TOT. Blanda noggrant med vortexblandare och inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur.
- Centrifugera i 15 minuter vid minst 1700 x g och 4° C.
- Dekantera supernatanten omedelbart efter centrifugering och mät radioaktiviteten i fällningen med gammareäknare.

7.2 Beräkningar

- Subtrahera medelvärdet av NSB- kalibrator rörens CPM från kalibrator ernas CPM och medelvärdet av NSB-analysprovrörens CPM från kontrollprovets och analysprovets CPM.
- Skapa en kalibreringskurva genom att avsätta bunden fraktion, B/TOT, mot koncentrationen i gastrin kalibrator erna. På sidan 11 avbildas ett exempel på en kalibreringskurva.
- Interpolera fram gastrinkoncentrationerna i kontrollproven och analysproven utgående från kalibreringskurvan.
- Bildandet av kalibreringskurvan och beräkningen av koncentrationer i analysproven kan göras med datorstöd.

8 PRESTANDA

8.1 Känslighet

Den lägsta mätbara koncentrationen är 5 pmol/L. Denna siffra motsvarar en minskning i bindningen med dubbla kalibratoravvikelsen (2xSD) av radioaktiviteten i kalibrator med koncentrationen noll.

8.2 Noggrannhet

När kända mängder gastrin sattes till serumprov uppnåddes ett medelvärde av 97.6% i återvinningsgrad i koncentrationsintervallet 65-222 pmol/L.

8.3 Precision

8.3.1 Variationer inom analyser

Nivå	Variationskoefficient (%VK)	N
41 pmol/L	3.0%	20
135 pmol/L	2.2%	20

8.3.2 Variationer mellan analyser

Nivå	Variationskoefficient (%VK)	N
47 pmol/L	7.5%	17
165 pmol/L	6.2%	17

8.4 Specificitet

Följande korsreaktioner har uppmätts:

Substans	Korsreaktion
Gastrin-17	100.0%
Gastrin-17, sulfaterat	83 %
Gastrin-34	61 %
CCK-8	36 %
Gastrin 1-14	<0.1 %
Gastrin releasing peptid	<0.01%
Vasoaktiv intestinal peptid	<0.01%
Motilin	<0.01%
Glukagon	<0.01%
Somatostatin 14	<0.01%
C-peptid	<0.01%

9 KVALITETSKONTROLL

9.1 Uppmätt koncentration i kontrollproven

(reagens F och G) ska ligga inom de gränser som anges på ampullerna.

9.2 Total counts

De erhållna värdena bör ligga nära förväntade CPM efter korrigering för räknarens verkningsgrad och isotopens sönderfall. Innehållet av ¹²⁵I-gastrin i detta kit ger 25000 CPM (-5%, +20%) vid referensdatum (räknarens verkningsgrad = 80%).

9.3 Maximal bindning (B₀/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av bunden radioaktivitet i noll kalibratoren: (B₀/TOT) x 100
(B₀/TOT) x 100 är normalt 45-65% vid referensdatum.

9.4 Icke-specifik bindning (NSB/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av icke-specifik bindning: (NSB/TOT) x 100.
(NSB/TOT) x 100 är mindre än 5%.

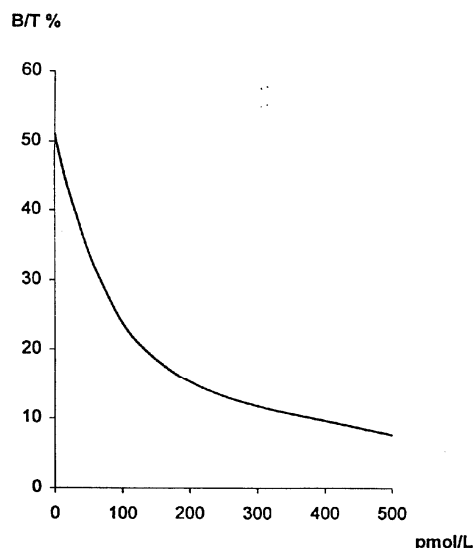
9.5 Lutningen på kalibreringskurvan

Kontrollera exempelvis 80, 50 och 20% punkterna på kalibreringskurvan för kontroll av reproducerbarhet från analystillfälle till analystillfälle.

10 SCHEMA ÖVER UTFÖRANDET

Typ av rör	Rör nr	Kalibrator-prov eller kontroll	Spädnings-buffert (D)	¹²⁵ I-gastrin med NRS (B)	Anti-Gastrin (A)		Dubbel antikropp PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 µL	-	Vortexa	-	Vortexa och
NSB _{st}	3- 4	-	300 µL	200 µL	-	och	500 µL	inkubera
Kalib 0	5- 6	100 µL	-	200 µL	200 µL	inkubera	500 µL	30 min. i rums-
Kalib 15.6	7- 8	100 µL	-	200 µL	200 µL	60 min. i	500 µL	temperatur.
Kalib 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL	rums-	500 µL	Centrifugera
Kalib 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL	tempera-	500 µL	15 min.
Kalib 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL	tur.	500 µL	1700 x g.
Kalib 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	Dekantera vid 4°
Kalib 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	C och
NSB _{prov}	19-20	100 µL	200 µL	200 µL	-		500 µL	avläs
Kontroll låg	21-22	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	precipitatens
Kontroll hög	23-24	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	radioaktivitet.
Prov 1	25-26	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	

EXEMPEL PÅ GASTRIN KALIBRERINGSKURVA



11 REFERENSER

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.

Utfärdat: 2009-11-24



GASTRIN-RIA

hu

KIPEMD302

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 BEVEZETÉS

A gyomorsav termelődésének szabályozása főleg a gasztrín segítségével, illetve a bolygóidegen keresztül történik, bár a gasztrínon kívül más faktorok is szerepet játszanak ebben a folyamatban. A gasztrín legfontosabb termelődési helye a gyomor antrum pyloricumának nyálkahártyája. Találhatók továbbá gasztrint termelő sejtek a nyombélben és a hasnyálmirigyben is.

Az emberi vérsavó sokféle formában tartalmazhat gasztrint. A gasztrínok biológiai aktivitásához elengedhetetlen egy amidált C-terminális szakasz. A progasztrín előállítás a preprogasztrín hasításával történik. Ismert, hogy a progasztrín a tirozin csoportokon részben szulfatált. A progasztrín enzimatis hasítása során keletkeznek a keringésben részt vevő biológiailag aktív gasztrín legfontosabb formái: a gasztrín-34 és a gasztrín-17. Ezek lehetnek szulfatált, vagy nem szulfatált formában is. A szérumban tartalmazhat még kis mennyiségben gasztrín-52-est (más néven 1-es komponens), gasztrín-14-est (mini-gasztrín), illetve más, kisebb fragmentumokat is.

2 KLINIKAI JELENTŐSÉG

A gasztrín az egyik legtöbbet tanulmányozott emésztőszervi hormon. A keringésben több formában is előfordul, köztük gasztrín-34 és gasztrín-17 formájában, szulfatált, illetve nem szulfatált alakban.

A gasztrín meghatározása fontos lehet a gasztrín-termelő daganatok és az achylia diagnosztizálásánál, amely előfordulhat vészes vérszegénységgel, vagy anélkül. Ezekben a betegségekben a vér gasztrín-koncentrációja magas. Gyomorsav-termelést csökkentő szerekkel történő kezelés esetén is előfordulhat a gasztrín-szint emelkedése, aminek oka az, hogy csökken a gyomorsav negatív visszacsatoló hatása a gasztrín termelésére. Tehát a szérumban gasztrín szintjének mérésével figyelemmel lehet követni a gyomorsav termelődését gátló gyógyszerekkel történő kezeléseket.

Az emberi vérsavó normál gasztrín szintje: ≤ 60 pmol/l (éhgymorra mérhető érték).

Átlagérték: $25 \text{ pmol/l} \pm 10 \text{ pmol/l}$ (1SD).

Normális tartomány: 11-54 pmol/l.

3 A MÓDSZER ELVE

A vizsgálat célja emberi vérsavó gasztrín-szintjének meghatározása. A gasztrín kimutatása egy kompetitív radioimmun vizsgálattal történik, amely során a gasztrín-17-albumin konjugátum ellen nyúlban termelt ellenanyagot használnak. A kalibrátorokban és a mintákban található gasztrín a ^{125}I -dal jelölt gasztrín-17-tel verseng az ellenanyagok kötőhelyeiért. A kötődött ^{125}I -gasztrín mennyisége fordítottan arányos a kalibrátorokban és a mintákban található gasztrín mennyiségével. Az ellenanyaghoz kötött, illetve a nem kötődött ^{125}I -gasztrínfrakciók elválasztása kettős ellenanyag-polietilénlikol precipitációs technikával történik. A precipitátum radioaktivitását ezután meg kell mérni. A módszerrel használt ellenanyag keresztreakciót ad a gasztrín-34-gyel, illetve a gasztrín-17 és gasztrín-34 szulfatált formáival.

4 MUNKAVÉDELMI SZABÁLYOK

Csak *in vitro* használatra. A reagenskészlet ^{125}I izotópot tartalmaz (felezési idő: 60 nap), ami ionizáló Röntgen (28 keV) és γ (35,5 keV) sugarakat bocsát ki.

Mivel a szabályozás országonként változik, fontos, hogy a laboratórium felelős szakembere tisztában legyen a reagenskészletben található típusú és mennyiségű radioaktív anyagokra vonatkozó helyi szabályozással.

A reagenskészlet emberi eredetű anyagokat tartalmaz. Ezeket szerológiai eljárásokkal megvizsgálták, és negatívnak bizonyultak a hepatitis B felszíni fehérjéjére, HCV elleni ellenanyagokra, illetve HIV-1 és HIV-2 elleni ellenanyagokra. Ennek ellenére kezelje őket a vérkészítményekre vonatkozó előírások szerint.

Mindent el kell követni azért, hogy a radioaktív anyagok kezelése megfeleljen a helyi és/vagy országos szabályozásnak. Ügyeljen arra, hogy a reagenshez csak arra jogosult személyzet férhessen hozzá.

A radioaktív anyagok kezelése során a következő szabályokat kell betartani:

- A radioaktív anyagokat erre a célra kijelölt, speciális területen kell tárolni, ami el van zárva az illetéktelen személyektől.
- A radioaktív anyagok kezelése csak a kijelölt területeken történhet.
- Vigyázzon, hogy a reagens ne kerülhessenek szájon át a szervezetbe, és ne érintkezzenek se bőrrel, se ruházattal. A radioaktív oldatokat ne pipettázza szájával.
- A vizsgálat helyszínén tilos enni, inni és dohányozni.
- A radioaktív anyagokkal végzett munka során kesztyűt kell viselni, a vizsgálat után pedig kezet kell mosni.
- A vizsgálatot egyszerhasználatos nedvszívó anyaggal fedett munkaasztalon kell végezni.
- A kiömlött radioaktív anyagokat azonnal el kell távolítani, és az összes fertőzött anyagot radioaktív hulladékként kell eldobni. A szennyeződött munkaasztalt detergenssel kell megtisztítani.

A készlet reagensei Na-azidot tartalmaznak. A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. Ha a reagenset a lefolyóba önti, mindig bőséges mennyiségű vízzel öblítse le, hogy megelőzze az azid felgyülemelését. Ha a vízvezeték rendszerbe ilyen anyagok kerültek, alaposan mossa ki ezeket 10 %-os Na-hidroxid oldattal.

5 A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

A készlet reagentsei

A készlet reagentsei 100 vizsgálathoz elegendőek.

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

Szarvasmarha szérumban albuminnal konjugált mesterségesen előállított humán gasztrín-17 ellen termelt nyúl ellenanyag, 21 ml ellenanyag. Hígító: 0,05 M foszfát puffer, pH 7,4, 0,25 % humán szérumban albumin és 0,05 % Na-azid. Színe: sárga.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

A referencia időpontban a reagens 66 KBq-t vagy 1,8 µCi-t tartalmazott. ¹²⁵I-dal jelölt, mesterségesen előállított humán gasztrín-17.
A monojodinált forma, HPLC-vel tisztítva.
Fajlagos aktivitás: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). 2,5 ml, 2,5 % humán szérumban albumint és 0,5 % Na-azidot tartalmazó, 0,5 M-os foszfát pufferben (pH=7,4) liofilizálva. A reagens 0,12 ml normál nyúl savót tartalmaz. Színe: kék. Beoldás: 25 ml desztillált vízben.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | C | DAb |
|------|---|-----|

50 ml hígított kecske anti-nyúl Ig ellenanyag 0,05 M foszfát pufferben, pH 7,4, 0,25 % humán szérumban albumint és 0,05 % Na-azidot tartalmaz. Ezen kívül 5,0 % (w/v) polietilén-glikol 6000-t is tartalmaz. Színe: vörös.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

40 ml 0,05 M foszfát puffer, pH 7,4, 0,25 % humán szérumban albuminnal és 0,05 % Na-aziddal.
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

Liofilizált. Koncentráció újraoldás után : 500 pmol/l.
A kalibrátor mesterségesen előállított humán gasztrín-17-et tartalmaznak. A hígítás 0,05 M 7,4-es pH-jú foszfát pufferben történt; 0,25 % humán szérumban albumin, és 0,05 % Na-azid hozzáadásával. Újraoldás 5,00 ml desztillált vízben.
- | | | |
|------|-----|---------|
| REAG | F-G | Control |
|------|-----|---------|

Liofilizált savókeverékek alacsony (normál) és magas gasztrín koncentrációval. Beoldás utáni térfogatuk: 1 ml. A pontos értékeket az ampullák címkéin találja meg.

A vizsgálathoz szükséges további eszközök

- Egyszerhasználatos csövek 11-13 x 55 mm, polisztrén.
- Pipetták eldobható hegyekkel, 100, 200 és 500 µl.
- 200 és 500 µl-es ismétlő pipetták, pl. Eppendorf Multipipette, ezek megkönnyítik a reagentsek bemérését.
- Vortex keverő.
- Centrifuga, amely működtethető 1700 x g-vel (ha lehet, használjon hűthető centrifugát).
- A teszt helyek radioaktivitásának mérésére szolgáló gamma-sugármérő.

A reagentsek előkészítése és tárolása

Feloldás és használat előtt minden reagentst tároljon 2-8° C-on. A reagentsek az üvegen feltüntetett időpontig felhasználhatók. A liofilizált anyagok esetén a lejárati idő a feloldatlan reagentsekre vonatkozik. A beoldott reagentsek megfelelő tárolás esetén 8 hétig tarthatók el.

A liofilizált reagentsek beoldásához olyan desztillált vizet kell használni, aminek előállításához üveg desztillátot használtak, vagy ennek megfelelő tisztaságú. Az ampulla tartalmának feloldódását az ampulla óvatos mozgatásával lehet elősegíteni, de el kell kerülni a buborékok képződését.

A reagent: Anti-gasztrín

Használatra kész. Tárolás 2-8° C-on.

B reagent: ¹²⁵I-gasztrín

Beoldás 25 ml desztillált vízben. Tárolás 2-8° C-on.

C reagent: Kettős Ellenanyag-PEG

Használatra kész. Használat előtt alaposan fel kell keverni. Tárolás 2-8° C-on

D reagent: Puffer

Használatra kész. Tárolás 2-8° C-on.

E reagent: Gasztrín kalibrátorok

Újraoldás 5,00 ml desztillált vízben.

Kalibrátor munkaidőkezelésével kapcsolatban lásd a radioimmun-vizsgálati eljárást.

Tárolás -18° C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten újrafelhasználás esetén.

F-G reagens: Kontrolllok

Minden ampulla tartalmát 1,00 ml desztillált vízben oldja be. Tárolás -18° C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten újrafelhasználás esetén.

6 MINTÁK

Mintavétel

Mintavétel előtt a betegeknek legalább 10 órát koplalniuk kell. A vénás vért véralvadástgátlót nem tartalmazó csőbe kell levenni. A mintát tartsa jégen, és hagyja megalvadni. A savót +4° C-on történő centrifugálással kell leválasztani.

A savót 4 órán belül fagyassza le, majd tárolja -18° C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten a vizsgálat elvégzéséig. A minták ismételt lefagyasztását és felolvasztását el kell kerülni.

7 A VIZSGÁLAT MENETE

7.1 Előkészületek

- Oldja be a reagenseket a leírtak szerint.
- Vizsgálat előtt várja meg, amíg a reagensok szobahőmérsékletűre melegeknek. Minden pipetázásnál ügyeljen a pontosságra. Minden anyaggal (kalibrátorok, kontrolllok és minták) két-két párhuzamos vizsgálatot végezzen. Minden vizsgálat során használja a következőket:

Kalibrátorok : 7 különböző koncentráció, 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 és 500 pmol/l.

Kontrolllok : Alacsony és magas koncentrációjú.

Minták.

Csővek a **nem specifikus kötődés** meghatározására (**NSB-csővek**).

Csővek a **teljes radioaktivitás** meghatározására (**TOT-csővek**).

Az áttekintő táblázatot lásd: 10 pont.

- Oldja újra a liofilizált reagenseket a 7. oldalon szereplő utasítások szerint, majd várjon, amíg a reagensok elérték a szobahőmérsékletet.
- A kalibrátor gasztrin munkaoldatot úgy készítse el, hogy az 500 pmol/l kalibrátor gasztrint

(E. reagens) az alábbi példa szerint hígítja az assay puffer (D. reagens) segítségével:

- Az újraoldás utáni E. reagens = 500 pmol/l
- 1,0 ml 500 pmol/l kalibrátor + 1,0 ml vizsgálati puffer = 250 pmol/l
- 1,0 ml 250 pmol/l kalibrátor + 1,0 ml vizsgálati puffer = 125 pmol/l
- 1,0 ml 125 pmol/l kalibrátor + 1,0 ml vizsgálati puffer = 62.5 pmol/l
- 1,0 ml 62.5 pmol/l kalibrátor + 1,0 ml vizsgálati puffer = 31.2 pmol/l
- 1,0 ml 31.2 pmol/l kalibrátor + 1,0 ml vizsgálati puffer = 15.6 pmol/l
- Vizsgálati puffer = 0 pmol/l

(A kalibrátorokat -20 °C-on vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten tárolja, ha majd később újrafelhasználják).

- Mérjen 100 µl kalibrátort, kontrollt, és mintát a megfelelő csővekbe. Pipetázzon 300 µl puffert (D reagens) az NSB-kalibrátor-csővekbe, és 200 µl puffert az NSB-minta-csővekbe. Mérjen 100 µl-t a mintákból a két NSB-minta-csőbe.
- Pipetázzon 200 µl-t a ¹²⁵I-gasztrintól (B reagens) minden csőbe. A totálokat fedje le és tegye félre.
- Mérjen 200 µl anti-gasztrint (A reagens) minden csőbe kivéve az NSB-t és a TOT-ot.
- Óvatosan vortexelje meg, majd inkubálja a csőveket 60 percig szobahőmérsékleten (20-25° C).
- Mérjen 500 µl alaposan felkevert kettős ellenanyag-PEG-et (C reagens) minden csőbe kivéve a TOT-ot. Óvatosan vortexelje meg és inkubálja a csőveket 30 percig szobahőmérsékleten.
- Centrifugálja őket 15 percig 4° C-on legalább 1700 x g-vel.
- A centrifugálás után azonnal öntse le a felülúszót, és mérje le a radioaktivitást a gamma-sugármérővel.

7.2 Eredmények kiszámítása

1. Vonja le az NSB-kalibrátor átlagos beütésszámát (cpm) a különböző kalibrátorok beütésszámából, illetve az NSB-minta csővek értékét a kontrolllok és minták cpm értékeiből.
2. A kalibrációs görbét úgy rajzolja fel, hogy a kötődött frakció százalékos értékeit (B/TOT) a gasztrin kalibrátorokhoz tartozó koncentrációk függvényében ábrázolja. Kalibrációs görbére példát a 10. pontban találhat.
3. A kontrolllokhoz és a mintákhoz tartozó gasztrin koncentrációk leolvashatók a kalibrációs görbéről.
4. A kalibrációs görbe megrajzolását és a minták koncentrációinak kiszámítását számítógép segítségével is elvégezheti.

8 A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI

8.1 Érzékenység

A legalacsonyabb kimutatható koncentráció 5 pmol/l. Ez a nulla koncentrációjú kalibrátorra kapott radioaktivitás érték 2 kalibrátor deviációval csökkentett értékének felel meg.

8.2 Pontosság

A kísérlet során, amikor vérsavó mintákhoz 65-222 pmol/l-es tartományban ismert mennyiségű gasztrint adtak, az átlagos visszanyerés 97,6%-nak bizonyult.

8.3 Precizitás

8.3.1 Vizsgálaton belüli variabilitás

<u>Mennyiség</u>	<u>Variációs koefficiens (%CV)</u>	<u>N</u>
41 pmol/l	3,0%	20
135 pmol/l	2,2%	20

8.3.2 Vizsgálatok közötti variabilitás

<u>Mennyiség</u>	<u>Variációs koefficiens (%CV)</u>	<u>N</u>
47 pmol/l	7,5%	17
165 pmol/l	6,2%	17

8.4 Specificitás

A vizsgálatok során a következő anyagok adhatnak keresztreakciót:

<u>Vegyület</u>	<u>Keresztreakció</u>
Gasztrin-17	100,0%
Gasztrin-17, szulfatált	83 %
Gasztrin-34	61 %
CCK-8	36 %
Gasztrin 1-14	<0,1 %
Gastrin releasing peptid	<0,01%
Vasoaktív intesztinális peptid	<0,01%
Motilin	<0,01%
Glukagon	<0,01%
Szomatosztatin 14	<0,01%
C-peptid	<0,01%

9 MINŐSÉGELENŐRZÉS

9.1 A kontrollsavókra kapott koncentráció értékek

(F és G reagensek) az ampullák címkéin megadott határok között voltak.

9.2 Teljes radioaktivitás

A megfigyelt beütésszámnak meg kell közelítenie a várt cpm értéket, figyelembe véve a mérőberendezés hatásfokát és a radioaktív bomlás mértékét. A reagenskészletben található ¹²⁵I-gasztrin aktivitása a referencia időpontban 25 000 CPM (-5%, +20%) (a mérőberendezés hatásfoka = 80%).

9.3 Maximális kötődés (Bo/TOT)

Minden vizsgálat elvégzésekor számolja ki a nulla-kalibrátor %-os kötődési értékét: $Bo / TOT \times 100$.

$Bo / TOT \times 100$ általában 45-65% a referencia időpontban.

9.4 Nem specifikus kötődés (NSB/TOT)

Minden vizsgálat elvégzésekor számolja ki a nem specifikus kötődés %-os értékét: $NSB / TOT \times 100$

$NSB / TOT \times 100$ kevesebb, mint 5%.

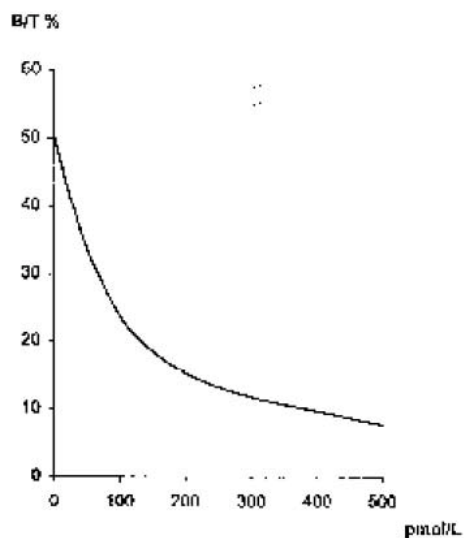
9.5 A kalibrációs görbe meredeksége

A vizsgálatok reprodukálhatóságának ellenőrzése céljából kísérje figyelemmel például a 80, 50 és 20%-hoz tartozó értékeket a kalibrációs görbén.

10 AZ ELJÁRÁS RÖVID LEÍRÁSA

A csövek típusa	A cső száma	Minta és kontroll kalibrátor	Puffer (D)	¹²⁵ I-gasztrín NRS-sel (B)	Anti-gasztrín (A)		Kettős ellenanyag-PEG (C)	
TOT	1-2	-	-	200 µL	-		-	Vortex-keverés
NSBst	3-4	-	300 µL	200 µL	-		500 µL	és inkubálás
Calib 0	5-6	100 µL	-	200 µL	200 µL	Vortex-	500 µL	30 percig
Calib 15.6	7-8	100 µL	-	200 µL	200 µL	Keverés	500 µL	szobahőn.
Calib 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL	és	500 µL	Centrifugálás
Calib 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL	Inkubálás	500 µL	15 percig
Calib 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	1700 x g-vel.
Calib 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	Felülúszó elöntése
Calib 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL	60 percig	500 µL	4°C-on, majd a
NSB _{Minta}	19-20	100 µL	200 µL	200 µL	-	szobahőn.	500 µL	precipitátum
Alacsony kontroll	21-22	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	radioaktivitásának
Magas kontroll	23-24	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	mérése.
Minta 1	25-26	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	

PÉLDA GASZTRIN KALIBRÁCIÓS GÖRBÉRE



11 IRODALOM

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

Felülvizsgálat időpontja: 2009-11-24

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Límitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extracção	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер