

EURIA-GASTRIN

EURO-DIAGNOSTICA



EURIA-GASTRIN

Gastrin radioimmunoassay
(Cat. No. MD 302)
100 tubes
For professional use only

Doc. no. E-23-0026-07
October, 2009



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.

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 antisecretagogues 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 antisecretagogues.

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.

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 standards 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 standards 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 crossreacts with gastrin-34 and the sulphated forms of gastrin-17 and gastrin-34. For professional use within a laboratory.

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

- Radioactive material should be stored in specially designated areas, not normally accessible to unauthorized personnel.
- Handling of radioactive material should be conducted in authorized areas only.
- Care should be exercised to prevent ingestion and contact with the skin and clothing. Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Drinking, eating or smoking should be prohibited where radioactive material is being used.
- Hands should be protected by gloves and washed after using radioactive materials.
- Work should be carried out on a surface covered by disposable absorbing material.
- Spills of radioactive material should be removed immediately, and all contaminated materials disposed as radioactive waste. Contaminated surfaces should be cleaned with a detergent.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead 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.

COMPOSITION OF THE REAGENT KIT

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

1. Anti-gastrin (Reagent A)

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.
For 100 tubes.

2. ¹²⁵I-Gastrin (Reagent B)

Contains 66 KBq or 1.8 μ Ci at reference date. Synthetic human gastrin-17 is iodinated. The monoiodinated form is purified by HPLC.
Specific activity: 1700-2100 μ Ci/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilized in 2.5 mL 0.5M 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. Double antibody-PEG (Reagent C)

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. Assay buffer (Reagent D)

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

5. Gastrin standard (Reagent E)

Lyophilized. 5.00 mL standard after reconstitution. Concentration : 500 pmol/L.
The standard 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. Controls (Reagent F-G)

Lyophilized serum pools with low (normal) and high concentration of gastrin. 1.00 mL of each control after reconstitution.

EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Disposable test tubes 11-13 x 55 mm, polystyrene.

Pipettes with disposable tips, 100, 200 and 500 μ L.

A repeating pipette, e.g. Eppendorf Multipipette, for volumes 200 and 500 μ L will facilitate the dispensing of the reagents.

Vortex mixer.

Centrifuge, capable for min 1700 x g (refrigerated centrifuge is preferred).

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: 125 I-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 standard

Reconstitute with 5.00 mL distilled water. For preparation of working standards, 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.

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.

ASSAY 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 (standards, controls and samples) should be performed in duplicate. A complete assay includes:

Standards (St-tubes): 7 different concentrations, 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 and 500 pmol/L.

Controls (C-tubes): Low and high.

Samples (P-tubes).

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

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

For an overview, see page 12.

PERFORMANCE

- Reconstitute the lyophilized reagents according to the instructions on page 7 and allow the reagents to reach room temperature.
- Prepare the gastrin working standards by dilution of the Gastrin standard 500 pmol/L (Reagen E) with assay buffer (Reagent D) according to the following example:
 - a. Reagent E after reconstitution = 500 pmol/L
 - b. 1.0 mL standard 500 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 250 pmol/L
 - c. 1.0 mL standard 250 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 125 pmol/L
 - d. 1.0 mL standard 125 pmol/L + 1.0 mL assay bufer = 62.5 pmol/L
 - e. 1.0 mL standard 62.5 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 31.2 pmol/L
 - f. 1.0 mL standard 31.2 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 15.6 pmol/L
 - g. Assay buffer = 0 pmol/L(Store the standards at -20° C or lower if reused).
- Pipette 100 µL of standards, controls and samples in their respective tubes. Pipette 300µL assay buffer (Reagent D) into NSB-standard-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 μ L of well mixed double antibody-PEG (Reagent C) into all tubes **except** TOT. Vortex carefully and incubate 30-60 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.

CALCULATIONS

- Subtract the average count rate (CPM) of the NSB-standard from the count rate (CPM) of the replicates of the standards, and NSB-samples from the controls and samples.
- A standard curve is generated by plotting the bound fraction, B/TOT against the concentrations of the gastrin standards. An example of a standard curve is given on page 12.
- Interpolate the gastrin concentrations of the controls and samples from the generated standard curve.
- The standard curve and the calculation of the concentrations in samples can be done by a computer method. A spline method may be used.

ASSAY CHARACTERISTICS

Sensitivity

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

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.

Precision

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

Inter assay variation (total 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

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%

QUALITY CONTROL

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

1. The found concentrations of the control sera

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

2. Total counts

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

3. Maximum binding (Bo/TOT)

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

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

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%.

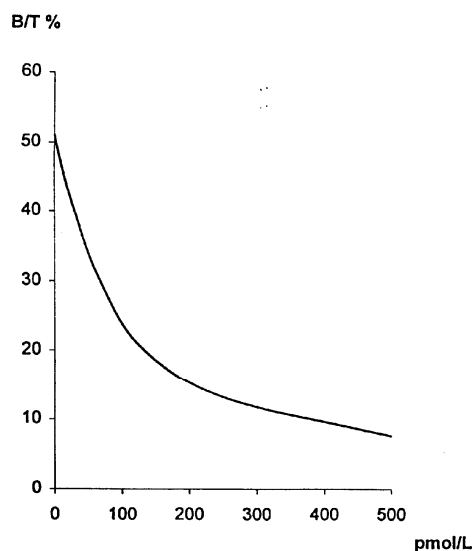
5. Slope of standard curve

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

OUTLINE OF THE RIA PROCEDURE

Type of tubes	Tube no	Standard 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-mix and incubate for 60 min. at room temperature.	-	Vortex-mix and incubate for 30-60 min. at room temperature.
NSB _{st}	3- 4	-	300 μL	200 μL	-		500 μL	
Stand 0	5- 6	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Stand 15.6	7- 8	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Stand 31.3	9-10	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Stand 62.5	11-12	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Stand 125	13-14	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Stand 250	15-16	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Stand 500	17-18	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
NSB _s	19-20	100 μL	200 μL	200 μL	-		500 μL	Centrifuge 15 min. at 1700 x g.
Control low	21-22	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	Decant and count the radioactivity of the precipitates.
Control high	23-24	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	
Sample 1	25-26	100 μL	-	200 μL	200 μL		500 μL	

EXAMPLE OF GASTRIN STANDARD CURVE



REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / 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 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.

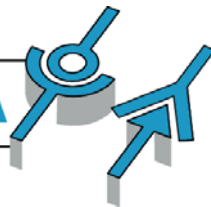
SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use by. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Utgångsdatum.
	Temperature limitation. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Radioactivity reference date. Date de référence de la radioactivité. Fecha de referencia de la radiactividad. Markierungsdatum. Data di riferimento per la radioattività. Referensdatum.
	Radioactive. Radioactif. Radiactivo. Radioaktiv. Radioattivo. Radioaktivt material.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Read instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Usage diagnostic in vitro. Uso en diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Per uso diagnostico in vitro. In vitro diagnostisk användning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
 100	Number of tests. Nombre de tests. Anzahl Tests. Numero di determinazioni. Siffror i symbolen anger antal test.

REAG	A	Ab		Anti-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-GASTRINE

EURO-DIAGNOSTICA



EURIA-GASTRINE

Dosage immunoradiologique de la gastrine
(Réf. cat. MD 302)
100 tubes
À usage professionnel uniquement

INTRODUCTION

La gastrine et les nerfs vagues sont les principaux régulateurs de la sécrétion acide gastrique. Cependant, à part la gastrine, il existe d'autres facteurs contribuant à la sécrétion acide gastrique. Le site principal de production de la gastrine est la muqueuse antropylorique de l'estomac. On trouve également quelques cellules produisant de la gastrine dans le duodénum et le pancréas.

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

La progastrine est clivée à partir de la pré-pro-gastrine. Il a été démontré que la progastrine est partiellement sulfatée dans les résidus de tyrosine. La progastrine est clivée enzymatiquement aux principales formes circulantes de la gastrine biologiquement active : gastrine-34 et gastrine-17, qui se présentent sous forme sulfatée et non-sulfatée. De petites quantités de gastrine-52 (également nommée composant 1), de gastrine-14 (mini-gastrine) et même de plus petits fragments ont été détectés dans le sérum.

CONSIDÉRATIONS CLINIQUES

La gastrine est l'une des hormones intestinales les mieux étudiées. Elle est présente dans la circulation sous différentes formes, dont notamment la gastrine-34 et la gastrine-17, sulfatée et non sulfatée.

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. Dans toutes ces situations cliniques, la concentration de gastrine dans le sérum est élevée. Le traitement aux anti-sécrétagogues puissants est susceptible de produire une hausse de la concentration de gastrine dans le sérum en raison d'un déficit de l'inhibition de la libération de gastrine par rétrocontrôle de l'acide. L'analyse de la gastrine sérique peut donc être utilisée pour surveiller le traitement aux anti-sécrétagogues.

Niveau normal de gastrine dans le sérum humain : ≤ 60 pmol/l (niveau à jeun obtenu avec cette procédure).

Valeur moyenne : 25 pmol/l $\pm$ 10 pmol/l (1S).

Plage : 11-54 pmol/l.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Ces réactifs sont indiqués pour le dosage de la gastrine dans le sérum humain. La gastrine sérique est analysée par un dosage immunoradiologique compétitif intégrant un antisérum de lapin dirigé contre un conjugué de gastrine 17-albumine. La gastrine des standards et échantillons entre en concurrence avec la gastrine-17 marquée à l'iode 125 dans la liaison aux anticorps. La gastrine marquée à l'iode 125 se lie en proportion inverse à la concentration de gastrine des standards et des échantillons. La gastrine 125 I liée à l'anticorps est séparée de la fraction non liée par la technique de précipitation au polyéthylène glycol à double anticorps. La radioactivité des précipités est mesurée. L'antisérum utilisé dans ce dosage produit une réaction croisée avec la gastrine-34 et les formes sulfatées de gastrine-17 et de gastrine-34.

À usage professionnel en laboratoire.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

À usage exclusif en diagnostic in vitro.

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

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

Ce kit contient de l'iode 125 (^{125}I , demi-vie : 60 jours), un émetteur de rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV). Il sera indispensable de prendre des mesures assurant la bonne manipulation de la matière radioactive conformément à la réglementation locale et/ou nationale. L'accès aux réactifs sera exclusivement réservé au personnel autorisé.

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

- Il sera nécessaire d'entreposer la matière radioactive dans des zones spécialement conçues à cet effet, et de manière générale, non accessibles au personnel non-autorisé.
- La manipulation de la matière radioactive sera exclusivement effectuée dans les zones autorisées.
- Prendre soin d'éviter son ingestion et son contact avec la peau et les vêtements. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
- Il sera interdit de boire, manger ou fumer dans les endroits où la matière radioactive est utilisée.
- Les mains devront être protégées à l'aide de gants et lavées après l'utilisation de matières radioactives.
- Le travail devra être effectué sur une surface recouverte d'un tissu absorbant jetable.
- Les déversements de matière radioactive devront être immédiatement essuyés et tous les matériels contaminés éliminés comme étant des déchets radioactifs. Les surfaces contaminées seront nettoyées à l'aide d'un détergent.

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

COMPOSITION DU KIT DE RÉACTIF

Les réactifs fournis dans chaque kit correspondent à des quantités suffisantes pour 100 tubes.

1. Anti-gastrine (Réactif A)

Antisérum de lapin dirigé contre de la gastrine-17 humaine synthétique, conjugué à de l'albumine sérique bovine, 21 ml d'antisérum. Diluant : Tampon de phosphate 0,05 M (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine et 0,05% d'azoture de sodium. Couleur : Jaune. Pour 100 tubes.

2. Gastrine ¹²⁵I (Réactif B)

Contient 66 KBq ou 1.8 µCi à la date de référence. La gastrine-17 humaine synthétique est iodée.

La forme monoiodée est purifiée par CLHP.

Activité spécifique: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilisé dans un tampon de phosphate 0,5 M de 2,5 ml (pH 7,4), avec 2,5% d'albumine sérique humaine, et 0,5% d'azoture de sodium.

Contient 0,12 ml de sérum de lapin normal. Couleur : Bleu.

Reconstitution dans 25 ml d'eau distillée.

3. PEG double anticorps (Réactif C)

50 ml d'antisérum de chèvre anti-Ig de lapin dilué dans un tampon de phosphate de 0,05 M (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine et 0,05% d'azoture de sodium.

Contient 5,0% (masse pour volume) de polyéthylène glycol 6000. Couleur : Rouge

4. Diluant de dosage (Réactif D)

Tampon de phosphate 0,05 M de 40,0 ml (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine et 0,05% d'azoture de sodium.

5. Standard de gastrine (Réactif E)

Lyophilisé. 5,00 ml de standard après reconstitution. Concentration : 500 pmol/L.

Le standard 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. Témoins (Réactif F-G)

Pools de sérum lyophilisé avec des concentrations basses (normales) et élevées de gastrine. 1,00 ml de chaque témoin après reconstitution.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Tubes à essai jetables 11-13 x 55 mm, polystyrène.

Pipettes à embouts jetables, 100, 200 et 500 µl.

L'utilisation d'une pipette à répétition, comme par exemple la Multipipette Eppendorf, pour des volumes de 200 et 500 µl facilitera le versement des réactifs.

Agitateur vortex.

Centrifugeuse réfrigérée de puissance minimum de 1700 x g (centrifugeuse réfrigérée de préférence).

Compteur de rayons gamma à puits.

PRÉPARATION ET ENTREPOSAGE DES RÉACTIFS

Entreposer tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8° C avant reconstitution et emploi. La stabilité des réactifs figure sur les étiquettes des flacons. Pour ce qui est des réactifs lyophilisés, la date de péremption est valable à l'état non-reconstitué. Les réactifs reconstitués restent stables pendant 8 semaines dans des conditions d'entreposage adéquates.

L'eau utilisée pour la reconstitution des réactifs lyophilisés devra être distillée dans des matériels tout en verre ou être d'une pureté équivalente. Dissoudre le contenu dans un flacon en agitant doucement par renversement et éviter toute formation de mousse.

Réactif A: Anti-gastrine

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

Réactif B: Gastrine ¹²⁵I

Reconstituer avec 25 ml d'eau distillée. Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif C: PEG double anticorps

Prêt à l'emploi. Mélanger soigneusement avant emploi. Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif D: Tampon de dosage

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

Réactif E : Standard de Gastrine

Reconstituer avec 5,00 ml d'eau distillée.

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

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

Réactif F-G : Témoins

Reconstituer chaque flacon avec 1,00 ml d'eau distillée.

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

COLLECTE DE SPECIMENS

Les patients devront rester à jeun pendant 10 heures avant le prélèvement des échantillons. Le sang veineux est recueilli dans des tubes sans additifs. L'échantillon est refroidi dans un bain de glace et on le laisse coaguler. Le sérum est séparé par centrifugation à +4° C.

Le sérum doit être gelé dans les 4 heures qui suivent et entreposé à -18° C ou à une température inférieure jusqu'au dosage. Éviter de congeler et décongeler à répétition.

PROCÉDURE DE DOSAGE

Reconstituer les réactifs selon les indications fournies.

Laisser les réactifs se stabiliser à température ambiante avant l'emploi. La précision est essentielle sur toutes les étapes du pipetage. Tous les tests (standards, témoins et échantillons) devront être effectués en duplicate. Un dosage complet comprend :

Standard (St-tubes) : 7 concentrations différentes ; 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 et 500 pmol/l.

Témoins (C-tubes) : Bas et élevé.

Échantillons (P-tubes).

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

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

Pour un aperçu, voir en page 29.

PERFORMANCE

- Reconstituer les réactifs lyophilisés conformément aux instructions de la page 23 et les laisser se stabiliser à température ambiante.
- Préparer les standards de travail de gastrine en diluant le standard 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 standard de 500 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 250 pmol/l.
 - c. 1,00 ml de standard de 250 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 125 pmol/l
 - d. 1,00 ml de standard de 125 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 62,5 pmol/l
 - e. 1,00 ml de standard de 62,5 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 31,2 pmol/l.
 - f. 1,00 ml de standard 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 standards à une température de -20° C ou inférieure en cas de réutilisation).
- Pipeter 100 µl des standards, témoins et échantillons dans leur tubes respectifs. Pipeter 300 µl du tampon de dosage (Réactif D) dans des tubes NSB à standard et 200 µl de tampon de dosage dans les tubes NSB à échantillon. Ajouter 100 µl d'un échantillon dans les deux tubes NSB à échantillon.
- Pipeter 200 µl de gastrine ¹²⁵I (Réactif B) dans tous les tubes Les TOT-tubes sont bouchés et mis de côté.
- Pipeter 200 µl d'anti-gastrine (Réactif A) dans tous les tubes à **l'exception** des tubes NSB et TOT-tubes.
- Vortexer avec précaution et incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20-25° C).
- Ajouter 500 µl de PEG double anticorps (Réactif C) bien mélangé à tous les tubes à **l'exception** des TOT-tubes. Vortexer avec précaution et incuber pendant 30-60 minutes à température ambiante.
- Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4° C (1700 x g minimum).
- Décanter le surnageant immédiatement après la centrifugation et compter la radioactivité des précipités dans un compteur à rayons gamma.

CALCULS

- Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes NSB standard du taux de comptage (CPM) des réplicats des standards, et soustraire les échantillons NSB des témoins et échantillons.
- Une courbe standard est produite en reportant fraction liée (B/TOT) par rapport aux concentrations des standards de gastrine. Un exemple de courbe standard est donné en page 29.
- Interpoler les concentrations de gastrine des témoins et échantillons à partir de la courbe standard produite.
- La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons peuvent également être effectués par méthode informatique. Un algorithme de spline cubique peut être utilisé.

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Sensibilité

La concentration détectable la plus faible était de 5 pmol/l. Ce chiffre correspond à une baisse de la liaison de 2 x S de la radioactivité liée dans le standard d'étalonnage zéro.

Exactitude

Un rendement moyen de 97,6% a été obtenu lorsque des quantités connues de gastrine situées dans la plage 65-222 pmol/l avaient été ajoutés à des échantillons de sérum.

Précision

Variation intra-dosage :

<u>Niveau</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
41 pmol/l	3.0%	20
135 pmol/l	2.2%	20

Variation inter-dosages (variation totale)

<u>Niveau</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
47 pmol/l	7.5%	17
165 pmol/l	6.2%	17

Spécificité

On a trouvé les réactions croisées suivantes :

<u>Composé</u>	<u>Réaction croisée</u>
Gastrine-17	100.0%
Gastrine-17, sulfatée	83%
Gastrine-34	61%
CCK-8	36%
Gastrine 1-14	<0.1%
Gastrin releasing peptide	<0.01%
Peptide intestinal vasoactif	<0.01%
Motiline	<0.01%
Glucagon	<0.01%
Somatostatine 14	<0.01%
Peptide C	<0.01%

CONTRÔLE QUALITÉ

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

1. Les concentrations trouvées dans les sérums témoins

(Réactif F et Réactif G) sont situés dans les limites indiquées sur les étiquettes des flacons.

2. Coups totaux

Les coups obtenus doivent correspondre environ au CPM prévu une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu de gastrine ^{125}I de ce kit produira 25 000 CPM (-5%, +20%) à la date de référence (efficacité de comptage = 80%).

3. Liaison maximale (Bo/TOT)

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

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

$\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$ est généralement de 45-65% à la date de référence de l'activité

4. Liaison non-spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque dosage le % de liaison non-spécifique $\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$.

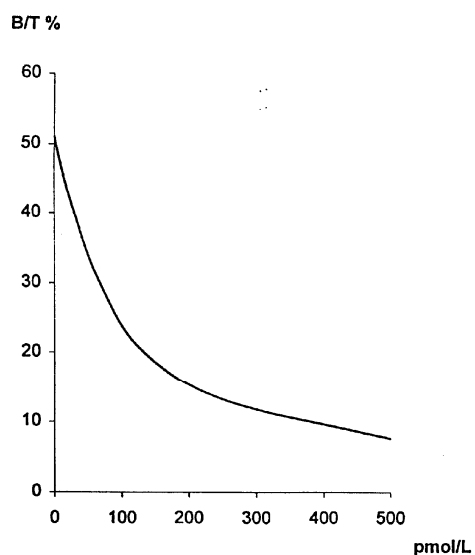
$\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$ est inférieur à 5%.

5. Pente de la courbe standard

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

CADRE DE LA PROCÉDURE RIA

Type de tubes	Tube (n°)	Standard échantillon ou témoin	Tampon de dosage (D)	Gastrine ^{125}I - avec du SLN (B)	Anti-gastrine (A)		Phase solide PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 μl	-	Vortexer et	-	Vortexer et
NSB _{st}	3- 4	-	300 μl	200 μl	-	incuber	500 μl	incuber
Stand 0	5- 6	100 μl	-	200 μl	200 μl	pendant	500 μl	pendant 30-
Stand 15,6	7- 8	100 μl	-	200 μl	200 μl	60	500 μl	60 minutes
Stand 31,3	9-10	100 μl	-	200 μl	200 μl	mn. à	500 μl	à
Stand 62,5	11-12	100 μl	-	200 μl	200 μl	températ	500 μl	température
Stand 125	13-14	100 μl	-	200 μl	200 μl	ure	500 μl	ambiante.
Stand 250	15-16	100 μl	-	200 μl	200 μl	Centrifuger	500 μl	Centrifuger
Stand 500	17-18	100 μl	-	200 μl	200 μl	15 mn. à	500 μl	15 mn. à
NSB	19-20	100 μl	200 μl	200 μl	-	1700 x g.	500 μl	1700 x g.
Témoin bas	21-22	100 μl	-	200 μl	200 μl	Décanter et	500 μl	Décanter et
Témoin élevé	23-24	100 μl	-	200 μl	200 μl	compter la	500 μl	compter la
Échantillon 1	25-26	100 μl	-	200 μl	200 μl	radioactivi- té des précipités.	500 μl	radioactivi- té des précipités.

EXEMPLE DE COURBE STANDARD DE LA GASTRINE

REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / 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 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.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use by. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Utgångsdatum.
	Temperature limitation. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Radioactivity reference date. Date de référence de la radioactivité. Fecha de referencia de la radiactividad. Markierungsdatum. Data di riferimento per la radioattività. Referensdatum.
	Radioactive. Radioactif. Radiactivo. Radioaktiv. Radioattivo. Radioaktivt material.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Read instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Usage diagnostic in vitro. Uso en diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Per uso diagnostico in vitro. In vitro diagnostisk användning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
 100	Number of tests. Nombre de tests. Anzahl Tests. Numero di determinazioni. Siffror i symbolen anger antal test.

REAG	A	Ab		Anti-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-GASTRIN

Radioinmunoensayo para la determinación de la gastrina
(Número de catálogo MD 302)
100 tubos
Sólo para uso profesional

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.

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 aquilia 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 $\pm$ 10 pmol/l (1SD).

Rango: 11-54 pmol/l.

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 estándares y muestras compite 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 estándares 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. Sólo para uso profesional en el laboratorio.

PRECAUCIONES

Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

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.

Este kit contiene I^{125} (vida media: 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes. Se deben seguir los pasos necesarios para garantizar la correcta manipulación del material radiactivo de acuerdo con la normativa local y/o nacional 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.

COMPOSICIÓN DEL KIT

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

1. Anti-gastrina (Reactivo A)

Antisuero 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.
Para 100 tubos.

2. Gastrina I-¹²⁵ (Reactivo B)

Contiene 66KBq o 1,8 μ Ci en la fecha de referencia. La gastrina-17 humana sintética está iodada.

La forma monoiodada está purificada mediante HPLC.

Actividad específica: 1700-2100 μ Ci/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.

3. Doble anticuerpo con PEG (Polietilenglicol) (Reactivo C)

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.

4. Tampón del ensayo (Reactivo D)

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.

5. Estándar de gastrina (Reactivo E)

Liofilizado. 5,00 ml de estándar después de la reconstitución. Concentración: 500 pmol/l.

El estándar 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.

6. Controles (Reactivos F-G)

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

Tubos de ensayo de poliestireno desechables de 11/13 x 55 mm.

Pipetas con puntas desechables: 100, 200 y 500 µl.

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.

Agitador.

Centrífuga, con un mínimo de 1700 x g (preferentemente refrigerada).

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: Estándar 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.

RECOGIDA DE 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.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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 (estándares, controles y muestras) deben hacerse por duplicado. Un ensayo completo incluye:

Estándares (tubos St): 7 concentraciones diferentes: 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 pmol/l.

Controles (tubos C): Bajo y alto.

Muestras (tubos P).

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 la página 44.

REALIZACIÓN

- 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.
- Preparar los estándares de trabajo de la gastrina diluyendo el estándar 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 estándar de 500 pmol/l + 1 ml de tampón = 250 pmol/l
 - c. 1 ml de estándar de 250 pmol/l + 1 ml de tampón = 125 pmol/l
 - d. 1 ml de estándar de 125 pmol/l + 1 ml de tampón = 62,5 pmol/l
 - e. 1 ml de estándar de 62,5 pmol/l + 1 ml de tampón = 31,2 pmol/l
 - f. 1 ml de estándar de 31,2 pmol/l + 1 ml de tampón = 15,6 pmol/l
 Tampón de ensayo = 0 pmol/l
 Conservar los estándares a -20° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
- Pipetear 100 µl de estándares, controles y muestras en sus tubos respectivos. Pipetear 300 µl de tampón de ensayo (Reactivo D) en los tubos NSB estándar 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 30-60 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.

CÁLCULOS

- Restar la media de CPM del estándar de NSB de la media de CPM de los duplicados de los estándares, 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 estándares de gastrina, se genera una curva estándar. Se muestra un ejemplo de la curva estándar en la página 44.
- Interpolan las concentraciones de gastrina de los controles y las muestras de la curva estándar generada.
- La curva estándar y el cálculo de las concentraciones de las muestras también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos. También puede utilizarse un algoritmo spline.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad

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

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%.

Precisión

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

Variación inter-ensayo (variación total)

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

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%

CONTROL DE CALIDAD

Para que el laboratorio pueda monitorizar completamente el rendimiento consistente del radioinmunoensayo, hay algunos factores importantes que se deben comprobar.

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.

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%).

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

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

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

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

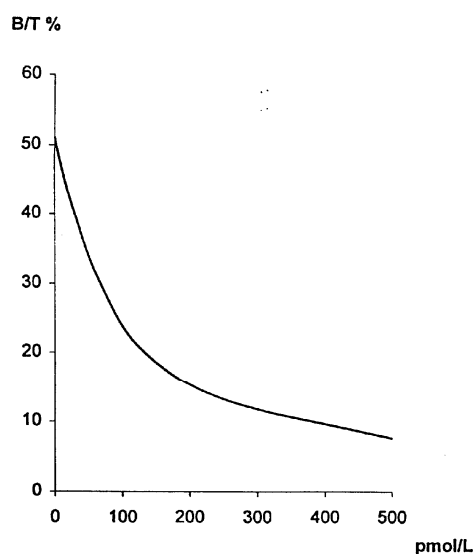
$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ es inferior al 5%.

5. Forma de la curva estándar

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

TABLA RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO RIA

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

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR DE GASTRINA

REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / 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 adenhypophysis.
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.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use by. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Utgångsdatum.
	Temperature limitation. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Radioactivity reference date. Date de référence de la radioactivité. Fecha de referencia de la radiactividad. Markierungsdatum. Data di riferimento per la radioattività. Referensdatum.
	Radioactive. Radioactif. Radiactivo. Radioaktiv. Radioattivo. Radioaktivt material.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Read instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Usage diagnostic in vitro. Uso en diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Per uso diagnostico in vitro. In vitro diagnostisk användning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
 100	Number of tests. Nombre de tests. Anzahl Tests. Numero di determinazioni. Siffror i symbolen anger antal test.

REAG	A	Ab		Anti-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-GASTRIN

Gastrin Radioimmunoassay
(Kat. Nr. MD 302)
100 Bestimmungen
Nur für den professionellen Gebrauch

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.

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.

TESTPRINZIP

Gastrin im Serum wird durch einen kompetitiven Radioimmunoassay unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen ein Gastrin-17 Albuminkonjugat gemessen. Das Gastrin der Standards 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 Standards 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.

Für den professionellen Gebrauch im medizinisch-diagnostischen Labor.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in vitro Gebrauch.

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.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert. 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.

KOMPONENTEN DES KITS

Die Reagenzien dieses Testkits sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

1. Anti-Gastrin (Reagenz A)

Kaninchen-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. Für 100 Röhrchen.

2. ¹²⁵I-Gastrin(Reagenz B)

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. Doppel-Antikörper-PEG (Reagenz C)

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. Assaypuffer (Reagenz D)

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

5. Gastrin-Standard (Reagenz E)

Lyophilisiert. 5,00 ml Standard nach Rekonstitution. Konzentration: 500 pmol/l.

Der Standard 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. Kontrollen (Reagenz F-G)

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)

Einmal-Teströhrchen 11-13 x 55 mm, Polystyrol

Pipetten mit Einmalspitzen, 100, 200 und 500 µl

Eppendorf-Multipipette für Volumina 200 und 500 µl

Vortexmixer

Zentrifuge, geeignet für mindestes 1.700xg (vorzugsweise Kälzentrifuge)

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-Standard

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.

PROBENGEWINNUNG

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.

TESTDURCHFÜHRUNG

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):

Standards (St-Röhrchen) 7 Konzentrationen (0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 und 500 pmol/l)

Kontrollen (C-Röhrchen) niedrig und hoch

Proben (P-Röhrchen)

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

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

Siehe Übersicht Seite 58.

ARBEITSSCHRITTE

- Die lyophilisierten Reagenzien wie beschrieben rekonstituieren. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
Herstellen der Gastrin Arbeitsstandards durch Verdünnung des Gastrin Standards 500pmol/L (Reagenz E) mit Assaypuffer (Reagenz D) nach dem folgenden Schema:
 - Reagenz E = 500pmol/l
 - 1.00 mL Standard 500 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 250 pmol/L
 - 1.00 mL Standard 250 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 125 pmol/L
 - 1.00 mL Standard 125 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 62,5 pmol/L
 - 1.00 mL Standard 62,5 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 31,2 pmol/L
 - 1.00 mL Standard 31,3 pmol/L + 1.00 mL Assaypuffer = 15,6 pmol/L
 - Assaypuffer = 0 pmol/L
 Die Standards bei -20°C oder tiefer lagern.
- 100 µl der Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. **300 µl Assaypuffer** (Reagenz D) nur in die **NSB-Röhrchen der Standards** 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 – 60 Minuten bei Raumtemperatur** inkubieren.

7. Röhrchen bei **4 °C 15 Minuten bei 1.700xg zentrifugieren**.
8. Überstand unmittelbar nach Zentrifugation **dekantieren**, und die Radioaktivität des Präzipitates in einem Gamma-Counter messen.

TESTAUSWERTUNG

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

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

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

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

Steht ein entsprechendes Computerprogramm zur Verfügung, so können die Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen der Proben durch ein entsprechendes Computerprogramm durchgeführt werden, z.B. unter Anwendung einer Spline-Methode.

TESTCHARAKTERISTIKA**Sensitivität**

Die untere Nachweisgrenze, definiert als die zweifache Standardabweichung des Nullstandards, beträgt ca. 5 pmol/l (bezogen auf die Standardkurve).

Richtigkeit

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

Präzision**Intra assay**

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

Inter assay

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

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

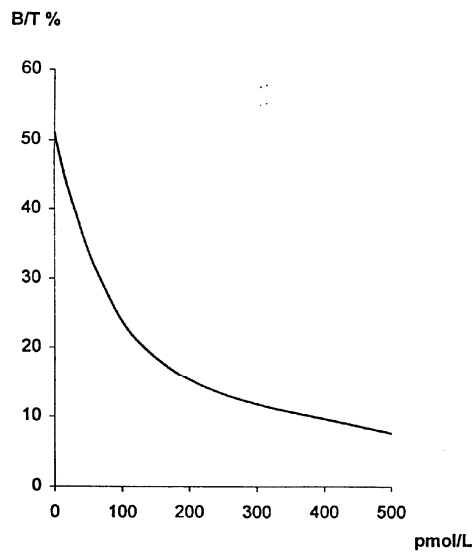
QUALITÄTSKONTROLLE

Um eine gleichbleibende Testqualität sicherzustellen, sollte jedes Labor die folgenden Punkte beachten:

- a. Die wiedergefundenen Konzentrationen der Kontrollseren (Reagenz F und G) sollten innerhalb der auf den Etiketten angegebenen Werten liegen.
- b. Total Counts
Der Gehalt an ^{125}I -Gastrin dieses Kits beträgt ca. 25.000 CPM (-5 %, +20 %) am Tag der Markierung (Wirkungsgrad des Counters = 80 %).
- c. Maximale Bindung (Bo/TOT)
Für jeden Assay wird die gebundene Radioaktivität des Nullstandards (Bo/TOTx100) berechnet. Bo/TOTx100 beträgt normalerweise 45 - 65 % am Tag der Markierung. Gegen Ende der Laufzeit kann der Wert um einige Prozent absinken.
- d. 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.
- e. Form der Standardkurve
Als Marker für die Reproduzierbarkeit können die Punkte bei 80, 50 und 20 % der Standardkurve von Testlauf zu Testlauf verwendet werden.

ASSAY SCHEMA

Röhrchen	Röhr- chen Nr.	Standard Probe oder Kontrolle	Assay- Puffer (D)	¹²⁵ I- Gastrin mit NRS (B)	Anti- Gastrin (A)		Doppel- Antikör- per- PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 µL	-	Vortexen	-	Vortexen
NSB _{st}	3- 4	-	300 µL	200 µL	-	und für	500 µL	und für
Stand 0	5- 6	100 µL	-	200 µL	200 µL	60 min	500 µL	30-60 min
Stand 15.6	7- 8	100 µL	-	200 µL	200 µL	bei	500 µL	bei Raum-
Stand 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL	Raum-	500 µL	tempera-
Stand 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL	tempera-	500 µL	tur
Stand 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL	inku-	500 µL	inkuieren.
Stand 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL	bieren.	500 µL	Zentrifugier
Stand 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	en für 15
NSB _s	19-20	100 µL	200 µL	200 µL	-		500 µL	min bei
Kontrolle low	21-22	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	1700 x g.
Kontrolle high	23-24	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	Dekantieren
Probe 1	25-26	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	und Radio-
								aktivität des
								Präzipitats
								messen.

BEISPIEL GASTRIN STANDARDKURVE

REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / 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 adenhypophysis.
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.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use by. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Utgångsdatum.
	Temperature limitation. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Radioactivity reference date. Date de référence de la radioactivité. Fecha de referencia de la radiactividad. Markierungsdatum. Data di riferimento per la radioattività. Referensdatum.
	Radioactive. Radioactif. Radiactivo. Radioaktiv. Radioattivo. Radioaktivt material.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Read instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Usage diagnostic in vitro. Uso en diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Per uso diagnostico in vitro. In vitro diagnostisk användning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
 100	Number of tests. Nombre de tests. Anzahl Tests. Numero di determinazioni. Siffror i symbolen anger antal test.

REAG	A	Ab		Anti-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	. Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-GASTRIN

Gastrin radioimmunoassay
(Cat. No. MD 302)
100 determinazioni
Solo per uso professionale

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'antro 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.

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-secernenti e nell'achilia, accompagnata o meno da anemia perniziosa. 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

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 standard 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 standard. 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 standard.

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

Per uso professionale in laboratorio.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro

Il kit contiene ^{125}I (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 esplosive. 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.

CONTENUTO DEL KIT

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

1. Anti gastrina (Reattivo A)

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. Per 100 determinazioni.

2. Gastrina - ¹²⁵I (Reattivo B)

Il flacone contiene gastrina marcata con ¹²⁵I, con attività totale di 66 kBq (1.8 µCi) alla data riportata sul flacone, prodotto per monoiodinazione 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. Secondo anticorpo-PEG (Reattivo C)

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. Tampone (Reattivo D)

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

5. Standard di gastrina (Reattivo E)

Concentrazione: 500pmol/l.

Volume: 5mL di standard dopo ricostituzione.

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. Controlli (Reattivi F-G)

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:

Provette in polistirene o polipropilene 11-13 x 55 mm
Micropipette di precisione con puntali monouso (100, 200 e 500 µL)
Micropipette a ripetizione da 200 e 500 µL
Agitatore tipo Vortex
Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)
Sistema di aspirazione o decantazione
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: Standard di gastrina

Ricostituire con 5 mL di acqua bidistillata. Conservare gli standard 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.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI 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.

METODO DEL DOSAGGIO

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 (Standard, controlli, campioni, NSB e attività totale).

Un dosaggio completo comprende:

Standard (provette St): a sette livelli: 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 pmol/L.

Controlli (provette C): due controlli a concentrazione bassa e elevata di gastrina.

Campioni (provette S)

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 pagine seguenti

Prima dell'uso portare i reattivi a temperatura ambiente.

- Preparare le soluzioni di lavoro degli standard a partire dallo standard 500 pmol/L reattivo E) con il tampone (reattivo D), secondo il seguente schema:
 - a. Reattivo = 500 pmol/L
 - b. 1.00 mL standard 500 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 250 pmol/L
 - c. 1.00 mL standard 250 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 125 pmol/L
 - d. 1.00 mL standard 125 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 62,5 pmol/L
 - e. 1.00 mL standard 62,5 pmol/L + 1.00 mL di tampone = 31,2 pmol/L
 - f. 1.00 mL standard 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 standard, campioni e controlli nelle rispettive provette. Pipettare 300 µL di tampone (reattivo D) nelle provette degli NSB degli standard 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 Gastrina¹²⁵I (reattivo B) in tutte le provette. Mettere da parte le provette per l'attività totale e tapparle.
- 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 30-60 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.

CALCOLO DEI RISULTATI

- Sottrarre la media delle cpm degli NSB degli standard dalle cpm dei replicati degli standard; sottrarre la media delle cpm degli NSB dei campioni dalle cpm dei replicati dei controlli e dei campioni.
- Generare la curva standard riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli standard.
- 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 standard.
- Se si usa un sistema di elaborazione computerizzato, usare il metodo di interpolazione Spline.

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO**Sensibilità**

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

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%.

Precisione

Variazione intra saggio

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

Variazione inter saggio (variazione totale)

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

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%

CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio deve controllare la qualità dei risultati ottenuti con questo metodo radioimmunologico considerando i seguenti parametri

1. Concentrazione trovata dei controlli

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

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 μ L di Gastrina¹²⁵ I deve essere 25000 cpm (-5%, +20%) alla data riportata come riferimento (efficienza del contatore 80%).

3. Capacità legante (Bo/T)%

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

4. Legame non specifico (NSB/T)%

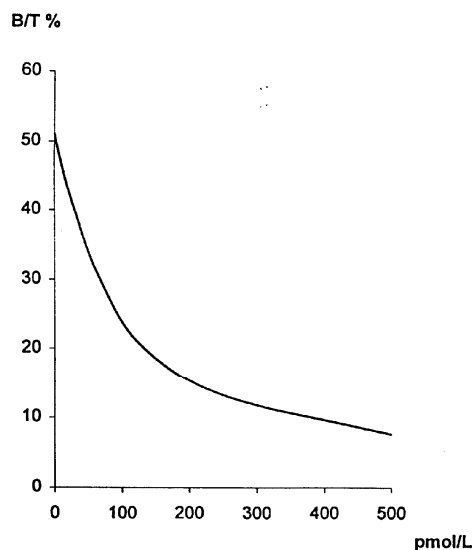
Il legame non specifico, rapporto tra le cpm degli NSB e le cpm dell'attività totale deve essere inferiore al 5%.

5. Pendenza della curva

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

SCHEMA DEL DOSAGGIO RIA

Provetta	Numero	Standard, 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 30-60 min a temperatura ambiente
NSB _{st}	3-4	-	300 µL	200 µL	-		500 µL	
St. zero	5-6	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 15.6	7-8	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 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	
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.								Decantare o aspirare il surnatante e contare la radioattività del precipitato

EXAMPLE OF GASTRIN STANDARD CURVE

REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / 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 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.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use by. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Utgångsdatum.
	Temperature limitation. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Radioactivity reference date. Date de référence de la radioactivité. Fecha de referencia de la radiactividad. Markierungsdatum. Data di riferimento per la radioattività. Referensdatum.
	Radioactive. Radioactif. Radiactivo. Radioaktiv. Radioattivo. Radioaktivt material.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Read instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Usage diagnostic in vitro. Uso en diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Per uso diagnostico in vitro. In vitro diagnostisk användning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
 100	Number of tests. Nombre de tests. Anzahl Tests. Numero di determinazioni. Siffror i symbolen anger antal test.

REAG	A	Ab		Anti-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-GASTRIN

Gastrin radioimmunoassay
(Katalognummer MD 302)

100 rör

Endast för professionell användning

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 amidrerad 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.

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.

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 standarder 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 standarder och analysprov. Antikroppsbundet ^{125}I -gastrin separeras från den obundna fraktionen med hjälp av dubbel antikropps-polyetylenglykolteknik. Radioaktiviteten i fällningen mäts. Antiserum som används vid denna analys korsreagerar med gastrin-34 och de sulfaterade formerna av gastrin-17 och gastrin-34.

Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

VARNING

Endast för in vitro diagnostik

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.

Detta kit innehåller ^{125}I (halveringstid: 60 dagar), avger röntgen (X: 28 keV) och gamma (γ : 35.5 keV) strålar. Vidta åtgärder enligt lokala och/eller landets föreskrifter avseende handhavande av radioaktivt material. Endast bemyndigad personal ska ha tillgång till reagenserna.

Följande säkerhetsåtgärder ska iakttas 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 iakttas 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.

REAGENSATSSENS INNEHÅLL

De reagens som medföljer varje sats räcker till 100 rör.

1. Anti-gastrin (reagens A)

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.
Till 100 rör.

2. ¹²⁵I-gastrin (reagens B)

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.

3. Dubbel antikropp-PEG (reagens C)

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.

4. Analysbuffert (reagens D)

40 mL 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid.

5. Gastrinstandard (reagens E)

Frystorkat. 5.00 mL standard efter rekonstituering. Koncentration: 500 pmol/L.
Standarden 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.

6. Kontrollprov (reagens F-G)

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

Engångsprovror 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: Gastrinstandard

Rekonstitueras med 5.00 mL destillerat vatten.

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

För beredning av gastrin-standardpunkterna 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.

PROVTAGNING

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.

ANALYSPROCEDUR

Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna.

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

Standarder (St-rör): 7 olika koncentrationer: 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 samt 500 pmol/L.

Kontrollprov (C-rör): Låg och hög.

Analysprov (P-rör):

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

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

En översikt återfinns på sidan 86.

GENOMFÖRANDE

- Späd de frystorkade reagenserna enligt instruktionen på sidan 81. Reagensen ska vara rumstempererade vid användning.
- Bered Gastrinstandardpunkterna genom spädning av Gastrinstandarden med koncentrationen 500 pmol/L (Reagens E) i analysbuffert (Reagens D) enligt följande exempel:
 - a. Reagens E = 500pmol/L
 - b. 1.00 mL standard 500 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 250 pmol/L
 - c. 1.00 mL standard 2.50 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 125 pmol/L
 - d. 1.00 mL standard 125 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 62,5 pmol/L
 - e. 1.00 mL standard 62,5 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 31,2 pmol/L
 - f. 1.00 mL standard 31,2 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 15,6 pmol/L
 - g. Spädningsbuffert = 0 pmol/L

Förvara standardpunkterna i -20° C eller lägre vid återanvändning.
- Pipettera 100 µL av standarder, kontrollprov och analysprov i respektive provrör. Pipettera 300 µL analysbuffert (reagens D) i NSB-standardprovrör 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 30-60 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 gammaraäknare.

BERÄKNINGAR

- Subtrahera medelvärdet av NSB-standardrörens CPM från standardernas CPM och medelvärdet av NSB-analysprovrörens CPM från kontrollprovets och analysprovets CPM.
- Skapa en standardkurva genom att avsätta bunden fraktion, B/TOT, mot koncentrationen i gastrinstandarderna. På sidan 53 avbildas ett exempel på en standardkurva.
- Interpolera fram gastrinkoncentrationerna i kontrollprovet och analysprovet utgående från standardkurvan.
- Bildandet av standardkurvan och beräkningen av koncentrationer i analysprovet kan göras med datorstöd. En spline-anpassning kan användas.

PRESTANDA**Känslighet**

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

Noggrannhet

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

Precision

Variationer inom analyser

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

Variationer mellan analyser (totalt)

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

SPECIFICITET

Följande korsreaktioner har uppmätts:

<u>Substans</u>	<u>Korsreaktion</u>
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%

KVALITETSKONTROLL

För att laboratoriet ska kunna övervaka att radioimmunoanalysen ger pålitliga resultat måste vissa viktiga faktorer kontrolleras.

1. Uppmätt koncentration i kontrollproven

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

2. Total counts

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

3. Maximal bindning (B_0/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av bunden radioaktivitet i nollstandard: $(B_0/\text{TOT}) \times 100$

$(B_0/\text{TOT}) \times 100$ är normalt 45-65% vid referensdatum.

4. Icke-specifik bindning (NSB/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av icke-specifik bindning: $(\text{NSB}/\text{TOT}) \times 100$.

$(\text{NSB}/\text{TOT}) \times 100$ är mindre än 5%.

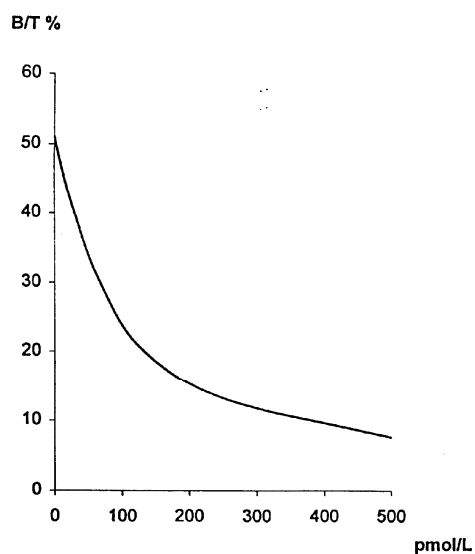
5. Lutningen på standardkurvan

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

SCHEMA ÖVER UTFÖRANDET

Typ av rör	Rör nr	Standard-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
Stand 0	5- 6	100 µL	-	200 µL	200 µL	inkubera	500 µL	30-60 min. i
Stand 15.6	7- 8	100 µL	-	200 µL	200 µL	60 min. i	500 µL	rums-
Stand 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL	rums-	500 µL	temperatur.
Stand 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL	tempera-	500 µL	Centrifugera
Stand 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL	tur.	500 µL	15 min.
Stand 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	1700 x g.
Stand 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	Dekantera och
NSB _p	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 STANDARDKURVA



REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / 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 adenhypophysis.
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.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Lot number. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use by. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Utgångsdatum.
	Temperature limitation. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Radioactivity reference date. Date de référence de la radioactivité. Fecha de referencia de la radiactividad. Markierungsdatum. Data di riferimento per la radioattività. Referensdatum.
	Radioactive. Radioactif. Radiactivo. Radioaktiv. Radioattivo. Radioaktivt material.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Read instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic use. Usage diagnostic in vitro. Uso en diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Per uso diagnostico in vitro. In vitro diagnostisk användning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
 100	Number of tests. Nombre de tests. Anzahl Tests. Numero di determinazioni. Siffror i symbolen anger antal test.

REAG	A	Ab		Anti-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURO-DIAGNOSTICA AB
P.O. Box 50117, SE-202 11 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
E-mail: info@eurodiagnostica.se
www.eurodiagnostica.com