



GASTRIN - RIA

KIPEMD302

History

Summary of change:

Previous Version: 200224-1	Current Version: 200615
No French	French added

Read entire protocol before use.

Gastrin-RIA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Catalog number :** KIPEMD302 : 100 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

1. Biological activities

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

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

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

2. Clinical application

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 antiseoretagogues 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.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

Gastrin in serum is assayed by a competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against a gastrin 17 albumin conjugate. Gastrin in calibrators and samples compete with ^{125}I -labelled gastrin-17 in binding to the antibodies. ^{125}I -gastrin binds in a reverse proportion to the concentration of gastrin in calibrators and samples. Antibody-bound ^{125}I -gastrin is separated from the unbound fraction using the double antibody - polyethylene glycol precipitation technique. The radioactivity of the precipitates is measured. The antiserum used in this assay cross-reacts with gastrin-34 and the sulphated forms of gastrin-17 and gastrin-34. For professional use within a laboratory.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution		
[ANTISERUM] Rabbit antiserum raised against synthetic human gastrin-17 conjugated to bovine serum albumin. Diluent: phosphate buffer, human serum albumin and sodium azide (<0.1%).	1 vial 21mL	Blue	Ready for use		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="padding: 2px;">Ag</td><td style="padding: 2px;">^{125}I</td></tr></table> TRACER: ^{125}I iodine labelled Gastrin in phosphate buffer with human serum albumin and NaN_3 .	Ag	^{125}I	1 vial lyophilised 66 kBq	Red	Add 25 mL distilled water
Ag	^{125}I				
[Ab PEG] Double antibody-PEG: Goat anti-rabbit Ig antiserum in phosphate buffer with human serum albumin and sodium azide. (<0.1%). Contains polyethylene glycol	1 vial 50 mL	Green	Ready for use		
[ASS BUF] Assay buffer : phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide, (<0.1%).	1 vial 40 mL	Black	Ready for use		
[CAL] Gastrin Calibrator in phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide (<0.1%).	1 vial lyophilised	Yellow	Reconstitute with distilled water by the volume stated on the vial label		
[CONTROL N] Control - N = 1 or 2 Lyophilised controls with two different levels of gastrin.	2 vials lyophilised	Silver	Add 1 mL distilled water		

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

- Antiserum** : Ready for use. Store at 2-8° C.
- ^{125}I -gastrin**: Reconstitute with 25 mL distilled water. Store at 2-8° C.
- Double Antibody-PEG**: Ready for use. Mix thoroughly before use. Store at 2-8° C.
- Assay buffer**: Ready for use. Store at 2-8° C.
- Gastrin calibrator**: Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. For preparation of working calibrators, see radioimmunoassay procedure. Store at -18° C or lower if reused.
- Controls**: Reconstitute each vial with 1 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The stability of the reagents is indicated on the labels of the vials. For lyophilised reagents the expiry date is valid for the unreconstituted reagents. The reconstituted reagents are stable for 8 weeks if stored properly.

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

IX. SPECIMEN COLLECTION

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.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Reconstitute the reagents as specified.

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

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

Controls: Low and high.

Samples.

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

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

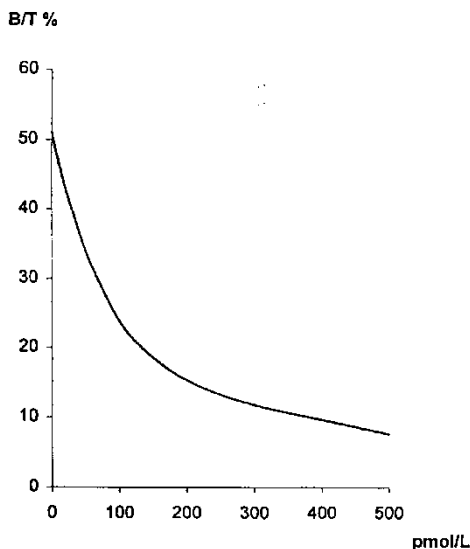
B. Procedure

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. 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 calibrator.

B. Precision

Intra assay variation

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

Inter assay variation (total variation)

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

C. 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.

D. Specificity

The following cross reactions have been found:

Compound	Cross reaction
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%

E. Interference

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

1. Controls

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

2. Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of ¹²⁵I-gastrin in this kit will give 25000 CPM (-5, +20%) at the reference date (counting efficiency = 80%).

3. Maximum binding (Bo/TOT)

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

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

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

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

The non-specific is less than 5%.

5. Slope of calibration curve

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

XV. REFERENCE INTERVALS

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

Mean value: 25 pmol/L ± 10 pmol/L (1SD).

Range: 11-54 pmol/L.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

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

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

XVIII.

SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrators	-	-	100 µL	-	-
Controls	-	-	-	100 µL	-
Samples	-	-	-	-	100 µL
Assay diluent	-	300µL	-	-	-
¹²⁵ I Tracer	200 µL				
Antiserum	-	-	200 µL		
Vortex-mix and incubate for 60 min at 18-25°C					
Double antibody PEG	-	500 µL			
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 18-25°C					
Centrifuge 15 min (1700 g) at 4°C					
Decant and count the radioactivity of the precipitates					

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

DIAsource Catalogue Nr : KIPEMD302	Revision nr : 200615
---------------------------------------	-------------------------

Revision date : 15/06/2020

Lire la totalité du protocole avant utilisation.

Gastrin-RIA

I. UTILISATION

Dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la gastrine dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du kit:** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Numéro de référence :** KIPEMD302 : 100 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

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

Tél. : +32 (0) 10 84.99.11

Fax : +32 (0) 10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

1. Activités biologiques

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

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

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

2. Applications cliniques

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

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

IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

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

Pour une utilisation professionnelle en laboratoire.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 100 tests	Code couleur	Reconstitution		
[ANTISÉRUM] Antisérum de lapin dirigé contre la gastrine-17 humaine synthétique conjuguée à de l'albumine sérique bovine. Diluant: tampon phosphate, albumine sérique humaine et azoture de sodium (<0,1%).	1 flacon 21 ml	Bleu	Prêt à l'emploi		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="padding: 2px;">Ag</td><td style="padding: 2px;">I¹²⁵</td></tr></table> TRACEUR : Gastrine marquée à l'iode-125 dans un tampon phosphate avec du sérum humain et du NaN ₃ .	Ag	I ¹²⁵	1 flacon lyophilisé 66 kBq	Rouge	Ajouter 25 ml d'eau distillée
Ag	I ¹²⁵				
[Ab PEG] PEG double anticorps : Antisérum de chèvre anti-Ig de lapin dilué dans un tampon de phosphate avec albumine sérique humaine et azoture de sodium. (<0,1%). Contient du polyéthylène glycol	1 flacon 50 ml	Vert	Prêt à l'emploi		
[ASS BUF] Tampon d'analyse : tampon phosphate contenant de l'albumine sérique humaine et de l'azoture de sodium (<0,1 %).	1 flacon 40 ml	Noir	Prêt à l'emploi		
[CAL] Calibrateur de gastrine dans tampon phosphate, albumine sérique humaine et azoture de sodium (<0,1 %).	1 flacon lyophilisé	Jaune	Reconstituer avec de l'eau distillée en ajoutant le volume indiqué sur l'étiquette du flacon.		
[CONTROL N] Contrôle - N = 1 ou 2 Contrôles lyophilisés avec deux niveaux de gastrine différents.	2 flacons lyophilisé	Argent	Ajouter 1 ml d'eau distillée		

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

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

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. Antisérum** : prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8° C.
- B. Gastrine I¹²⁵** : Reconstituer avec 25 ml d'eau distillée. Conserver entre 2 et 8° C.
- C. PEG-double anticorps** : prêt à l'emploi. Mélanger à fond avant utilisation. Conserver entre 2 et 8° C.
- D. Tampon d'analyse** : prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8° C.
- E. Calibrateur de gastrine** : reconstituer avec le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette du flacon. Pour la préparation des calibrateurs de travail, suivre la procédure de dosage radioimmunologique. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- F. Contrôles** : Reconstituer chacun des flacons avec 1 ml d'eau distillée. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

VIII. CONSERVATION ET DATES DE PÉREMPTION DES RÉACTIFS

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

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

IX. RECUEIL DE L'ÉCHANTILLON

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

X. PROCÉDURE

A. Remarques concernant la manipulation

Reconstituer les réactifs de la manière spécifiée.

Laisser les réactifs se stabiliser à température ambiante avant l'emploi. La précision est essentielle sur toutes les étapes du pipetage. Tous les tests (calibrateurs, contrôles et échantillons) doivent être réalisés en double. Un dosage complet comprend :

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

Contrôles : bas et élevé.

Échantillons.

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

Tubes pour la détermination de la réactivité totale (tubes TOT).

B. Procédure

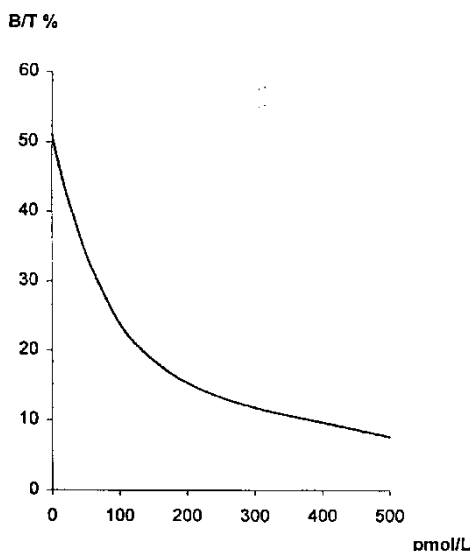
1. Reconstituer les réactifs lyophilisés conformément aux instructions et les laisser se stabiliser à température ambiante.
2. Préparer les calibrateurs de travail de gastrine en diluant le calibrateur de gastrine de 500 pmol/l avec le tampon d'analyse conformément aux indications de l'exemple suivant :
 - a. calibrateur de gastrine après reconstitution = 500 pmol/L
 - b. 1 ml de calibrateur de 500 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 250 pmol/l.
 - c. 1 ml de calibrateur de 250 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 125 pmol/l
 - d. 1 ml de calibrateur de 125 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 62,5 pmol/l
 - e. 1 ml de calibrateur de 62,5 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 31,2 pmol/l.
 - f. 1 ml de calibrateur de 31,2 pmol/l + 1 ml de tampon de dosage = 15,6 pmol/l.
 - g. tampon de dosage = 0 pmol/l
(Entreposer les calibrateurs à une température de -20° C ou inférieure en cas de réutilisation).
3. Pipeter 100 µL de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dans leurs tubes respectifs.
4. Pipeter 300 µL du tampon d'analyse dans les tubes NSB.
5. Pipeter 200 µL de gastrine I¹²⁵ dans tous les tubes. Les tubes TOT sont scellés et gardés à part.
6. Pipeter 200 µL d'anti-gastrine dans tous les tubes à l'exception des tubes NSB et des tubes TOT.

7. Agiter soigneusement les tubes au vortex et incuber pendant 60 minutes à température ambiante (18-25° C).
8. Ajouter 500 µL du double anticorps-PEG bien mélangé à tous les tubes, à l'exception du tube TOT Agiter soigneusement au vortex et incuber 30 minutes à température ambiante.
9. Centrifuger pendant 15 minutes à minimum 1700 x g à une température de 4°C.
10. Décapter le surnageant immédiatement après la centrifugation et compter la radioactivité des précipités dans un compteur gamma.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

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

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



XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

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

B. Précision

Variation intra-essai :

Niveau	Coefficient de variation (% CV)	N
41 pmol/L	3,0 %	20
135 pmol/L	3,0 %	20

Variation inter-essai (variation totale)

Niveau	Coefficient de variation (% CV)	N
47 pmol/L	7,5 %	17
165 pmol/L	6,2 %	17

C. Exactitude

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

D. Spécificité

Les réactions croisées suivantes ont été observées :

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

E. Interférence

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

XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

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

1. Contrôles

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

2. Coups totaux

Les coups obtenus doivent correspondre environ au CPM prévu une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu en gastrine ¹²⁵I de cette trousse donnera 25 000 CPM à la date d'activité de référence (efficacité du comptage = 80 %).

3. Liaison maximale (Bo/TOT)

Calculer pour chaque analyse le pourcentage de radioactivité liée pour le calibrateur zéro :

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

4. Liaison non spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque analyse le pourcentage de liaison non spécifique :

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

La liaison non spécifique est inférieure à 5 %.

5. Pente de la courbe de calibration

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

XV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

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

Valeur moyenne : 25 pmol/L ± 10 pmol/L (1 écart-type).

Fourchette : 11-54 pmol/L.

XVI. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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

Cette trousse contient des composants d'origine humaine. Ils ont été testés par analyse immunologique. Ils sont négatifs pour l'antigène de

surface de l'hépatite B, les anticorps anti-HCV et les anticorps anti-HIV-1 et HIV-2. Il n'en reste pas moins que toutes les précautions recommandées pour la manipulation des dérivés sanguins devront être observées.

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

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

- Il faut stocker le matériel radioactif dans des zones spécialement conçues à cet effet, et de manière générale, non accessibles au personnel non autorisé.
- La manipulation de matériel radioactif sera exclusivement effectuée dans les zones autorisées.
- Prendre soin d'éviter son ingestion et son contact avec la peau et les vêtements. - Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
- Il doit être interdit de boire, manger ou fumer dans les endroits où du matériel radioactif est utilisé.
- Il faut se protéger les mains en portant des gants et il faut les laver après l'utilisation de matériel radioactif.
- Il faut travailler sur une surface recouverte d'un matériau absorbant jetable.
- Les éclaboussures de matériel radioactif doivent être immédiatement éliminées et tout le matériel contaminé jeté dans les déchets radioactifs. Les surfaces contaminées doivent être nettoyées à l'aide d'un détergent.

Les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium. Leur contact avec les canalisations en cuivre ou en plomb est susceptible de provoquer l'accumulation de dépôts d'azoture hautement explosifs. Lors de l'évacuation des réactifs dans les canalisations d'évacuation des eaux usées, toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azotures métalliques. Les canalisations susceptibles d'avoir été contaminées avec ces dépôts explosifs devront être soigneusement rincées à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 %.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.

10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.
11. Rehfeld, J.F.
Localization of gastrin to neuro- and adenohypophysis.
Nature 271:771, 1978.
12. Rehfeld, J.F.
The expression of progastrin, procholecystokinin and their hormonal products in pituitary cells.
J. Mol. Endocrin 1:87, 1988.
13. Rehfeld, J.F., and Larsson, L-I.
Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs.
J. Biol. Chem. 256 (20):10426, 1981.
14. Rehfeld, J.F.
Heterogeneity of gastrointestinal hormones.
in: Gastrointestinal Hormones.
Editor: George B. Jerzy Glass.
Raven Press, New York (1980).
15. Jacobsen, O., Bardram, L. and Rehfeld, J.F.
The requirement for gastrin measurements.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46:423-426, 1986.
16. Andersen, B.N.
Measurement and occurrence of sulfated gastrins.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, suppl. 168, 1984.

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

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

Numéro catalogue DIASource : KIPEMD302	N° de révision : 200615
---	----------------------------

Date de la révision : 15-06-20

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

Gastrin-RIA

I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* della gastrina nel siero umano.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. **Nome brevettato :** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Numero di catalogo :** KIPEMD302 : 100 tests
- C. **Fabbricato da :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. ANTEFATTO

1. Attività biologiche

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.

2. Applicazione clinica

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.

IV. PRINCIPI 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 contaminate 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 solfate di gastrina-17 e gastrina-34.

Per uso professionale in laboratorio.

V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	Kit per 100 test	Codice Colore	Ricostruzione		
[ANTISERUM] Anticorpo anti gastrina da coniglio preparato usando come immunogeno gastrina-17 coniugata con albumina bovina. Diluente: tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala 21 mL	Blu	Pronto all'uso		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="padding: 2px;">Ag</td><td style="padding: 2px;">¹²⁵I</td></tr></table> TRACCIANTE : Gastrina ¹²⁵ Iodo in tampone fosfato con albumina di siero umano e NaN3.	Ag	¹²⁵ I	1 fiala liofilizzato 66 kBq	Rosso	Aggiungere 25 mL di acqua distillata
Ag	¹²⁵ I				
[Ab PEG] PEG doppio anticorpo : Anticorpo anti IgG di coniglio da capra in tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%). Contiene glicole polietilenico	1 fiala 50 mL	Verde	Pronto all'uso		
[ASS BUF] Tampone del test : tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala 40 mL	Nero	Pronto all'uso		
[CAL] Calibratore Gastrina in tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala liofilizzato	Giallo	Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala		
[CONTROL N] Controllo - N = 1 o 2 Controlli liofilizzati con due diversi livelli di Gastrina.	2 fiale liofilizzato	Argento	Aggiungere 1 mL di acqua distillata		

VI. NON IN DOTAZIONE

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

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

VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

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

VIII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

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

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

IX. RACCOLTA DI CAMPIONI

I 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.

X. PROCEDURA

A. Note sulla manipolazione

Ricostituire i reagenti come specificato. I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. È essenziale eseguire il pipettaggio con precisione. Tutti i test (calibratori, controlli e campioni) devono essere eseguiti in duplicati.

Un test completo comprende:

Calibratori: 7 diverse concentrazioni; 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 pmol/L.

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

Campioni.

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

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

B. Procedura

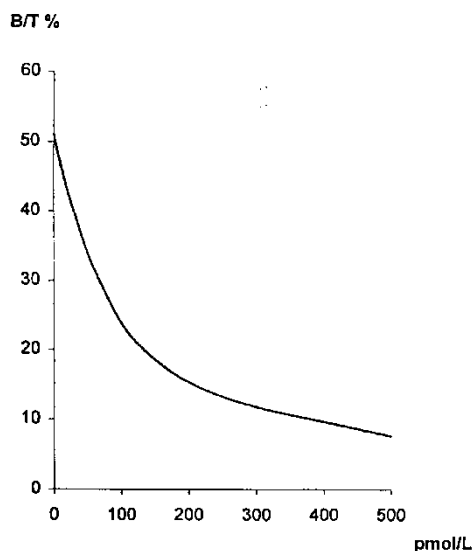
1. Ricostituire i reagenti come specificato. Prima dell'uso portare i reattivi a temperatura ambiente
2. Preparare i calibratori di lavoro Gastrina diluendo 500 pmol/L i calibratore Gastrina con il diluente del calibratore secondo la seguente tabella
 - a. Calibratore gastrina dopo ricostituzione = 500 pmol/L
 - b. 1.0 mL calibratore 500 pmol/L + 1.0 mL tampone = 250 pmol/L
 - c. 1.0 mL calibratore 250 pmol/L + 1.0 mL tampone = 125 pmol/L
 - d. 1.0 mL calibratore 125 pmol/L + 1.0 mL tampone = 62.5 pmol/L
 - e. 1.0 mL calibratore 62.5 pmol/L + 1.0 mL tampone = 31.2 pmol/L
 - f. 1.0 mL calibratore 31.2 pmol/L + 1.0 mL tampone = 15.6 pmol/L
 - g. Tampone = 0 pmol/L

(Conservare i calibratori a -20 ° C o inferiori se riutilizzati)
3. Pipettare 100 µL di calibratore, controlli e campioni nei tubi rispettivi.
4. Pipettare 300 µL di tampone nelle tubi NSB.
5. Pipettare 200 µL di Gastrina¹²⁵I in tutti i tubi. i tubi TOT sono sigillati e tenuti da parte..
6. Aggiungere 200 µL di anticorpo anti Gastrina in tutti i tubi eccetto i tubi NSB e TOT.
7. Agitare su vortex e incubare 60 minuti a temperatura ambiente (18-25°C).
8. Aggiungere 500 µL di PEG doppio anticorpo a tutti i tubi eccetto i tubi TOT. Agitare su vortex e incubare 30-60 min. a temperatura ambiente
9. Centrifugare i tubi per 15 min. a 4°C (1700 x g).
10. Eliminare immediatamente il surmatante per decantazione. Misurare la radioattività del precipitato, frazione legata, di tutti i tubi per almeno due minuti in un contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

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



XII. ESECUZIONE E LIMITI

A. Sensibilità

La concentrazione minima riscontrabile è 5 pmol/L. La cifra corrisponde ad una diminuzione nel legame di due x SD della radioattività legata nel calibratore a concentrazione zero.

B. Precisione

Variatione intra-test

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
41 pmol/L	3.0%	20
135 pmol/L	3.0%	20

Variatione inter-test (totale)

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
47 pmol/L	7.5%	17
165 pmol/L	6.2%	17

C. 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%.

D. Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

Compound	Cross reaction
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%

E. Interferenza

I campioni che presentano un disturbo, un'emolisi, un'iperlipemia o che contengono fibrina possono fornire risultati inesatti.

XIII. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Per monitorare completamente la prestazione coerente del dosaggio radioimmunologico, occorre verificare i seguenti importanti fattori.

1. Controlli

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

2. Conteggi totali

I conteggi ottenuti dovrebbero avvicinarsi al CPM atteso CPM quando vengono regolati per l'efficienza del contatore e il decadimento radioattivo. Il contenuto di Gastrina ¹²⁵I in questo kit darà 25000 CPM (-5, +20%) alla data di riferimento dell'attività (efficienza del conteggio = 80%).

3. Legame massimo (Bo/TOT)

Calcolare per ogni test la % di radioattività legata nel calibratore zero:

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

TOT

4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:

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

TOT

Il legame non specifico deve essere inferiore a 5%.

5. Discesa della curva di calibrazione

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

XIV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Livello normale di PP nel siero umano: ≤60 pmol/L (livello a digiuno ottenuto con questa procedura).

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

Gamma: 11-54 pmol/L.

XV. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Esclusivamente per la diagnostica in vitro.

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

Questo kit contiene componenti di origine umana. Sono stati testati con il dosaggio immunologico per l'antigene superficiale dell'epatite B, anticorpi di HCV e anticorpi di HIV-1 e HIV-2 e trovati negativi. Ciononostante, vanno osservate tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

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

Rispettare le seguenti precauzioni quando si maneggiano materiali radioattivi:

- Il materiale radioattivo deve essere conservato in aree appositamente designate, non normalmente accessibili a personale non autorizzato.
- La manipolazione del materiale radioattivo deve essere effettuata soltanto nelle aree autorizzate.
- Prestare attenzione a prevenire l'ingestione e il contatto con pelle e abbigliamento. Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.

- Deve essere vietato bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.
- Le mani vanno protette con guanti e lavate dopo aver utilizzato materiale radioattivo.
- Eseguire il lavoro su una superficie coperta da materiale assorbente usa e getta.
- Eliminare immediatamente eventuali fuoriuscite di materiale radioattivo e gettare tutti i materiali contaminati come rifiuti radioattivi. Le superfici contaminate vanno pulite con detergente.

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

XVI. BIBLIOGRAFIA

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

XVII. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

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

Catalogo DIASource N°: KIPEMD302	Revisione N° : 200615
-------------------------------------	--------------------------

Data di revisione: 15/06/2020

Lea todo el protocolo antes del uso.

Gastrin-RIA

I. INDICACIONES

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** DIAsource Gastrin-RIA
- B. **Número de catálogo:** KIPEMD302 : 100 pruebas
- C. **Fabricado por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

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

Tel.: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

1. Actividades biológicas

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

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

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

2. Aplicación clínica

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 de la inhibición de retroalimentación ácida que regula la liberación de gastrina. Por tanto, la medición de la concentración de gastrina en suero se puede utilizar para monitorizar el tratamiento con antiseoretos.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La gastrina en suero se evalúa mediante un radioinmunoensayo competitivo en el que se utiliza un antisuero de conejo que se enfrenta a una gastrina-17 conjugada con albúmina. La gastrina de los calibradores y muestras compete con la gastrina-17 marcada con I^{125} en la fijación a los anticuerpos. La gastrina I^{125} se fija en proporción inversa a la concentración de gastrina de los calibradores y muestras. La gastrina I^{125} fijada a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada mediante una técnica de precipitación de doble anticuerpo con glicol polietilénico. A continuación se mide la reactividad de los precipitados. El antisuero utilizado en este ensayo presenta reacciones cruzadas con la gastrina-34 y las formas sulfatadas de la gastrina-17 y la gastrina-34. Para uso profesional dentro del laboratorio.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 100 pruebas	Código de color	Reconstitución		
[ANTISERUM] Antisuero de conejo enfrentado a gastrina 17 humana sintética, conjugado con albúmina de suero bovino. Diluyente: tampón fosfato, albúmina de suero humano y azida sódica (<0,1%).	1 vial 21 ml	Azul	Listo para usar		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>Ag</td><td>I^{125}</td></tr></table> TRAZADOR: Gastrina marcada con yodo I^{125} en tampón fosfato con albúmina de suero humano y NaN ₃ .	Ag	I^{125}	1 vial liofilizado 66 kBq	Rojo	Añadir 25 ml de agua destilada
Ag	I^{125}				
[Ab PEG] Doble anticuerpo con PEG: Antisuero Ig de cabra anticonejo tampón fosfato con albúmina de suero humano y azida sódica. (<0,1%). Contiene glicol polietilénico	1 vial 50 ml	Verde	Listo para usar		
[ASS BUF] Tampón del ensayo: tampón fosfato que contiene albúmina de suero humano y azida sódica (<0,1%).	1 vial 40 ml	Negro	Listo para usar		
[CAL] Calibrador de gastrina en tampón de fosfato que contiene albúmina de suero humano y azida sódica (<0,1%).	1 vial liofilizado	Amarillo	Reconstituir con agua destilada según el volumen indicado en la etiqueta del vial		
[CONTROL N] Control - N = 1 o 2 Controles liofilizados con dos niveles diferentes de gastrina.	2 viales liofilizado	Plateado	Añadir 1 ml de agua destilada		

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

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

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. Antisuero:** Listo para usar. Conservar a 2-8 °C.
- B. Gastrina I^{125} :** Reconstituir con 25 ml de agua destilada. Conservar a 2-8 °C.
- C. Doble anticuerpo-PEG:** Listo para usar. Mezclar bien antes de utilizarlo. Conservar a 2-8 °C.
- D. Tampón del ensayo:** Listo para usar. Conservar a 2-8 °C.
- E. Calibrador de gastrina:** Reconstituir con agua destilada según el volumen indicado en la etiqueta del vial. Para la preparación de los

calibradores de trabajo, consultar el procedimiento del radioinmunoensayo.

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

F. Controles:

Reconstituir todos los viales con 1 ml de agua destilada.

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

VIII. ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

IX. RECOGIDA DE MUESTRAS

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

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

X. PROCEDIMIENTO

A. Manipulación

Reconstituir los reactivos tal como se especifica.

Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos. La precisión es fundamental en todos los pasos que implican pipetear. Todas las pruebas (calibradores, controles y muestras) deben hacerse por duplicado. Un ensayo completo incluye:

Calibradores: 7 concentraciones, 0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 y 500 pmol/l

Controles: Bajo y alto.

Muestras.

Tubos para la determinación de la fijación no específica (tubos NSB).

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

B. Procedimiento

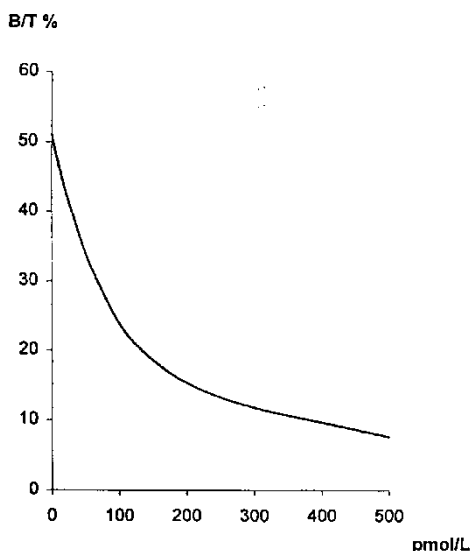
1. Reconstituir los reactivos liofilizados de acuerdo con las instrucciones y esperar a que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Preparar los calibradores de trabajo de gastrina diluyendo el calibrador de Gastrina de 500 pmol/l con el tampón del ensayo de acuerdo con el siguiente ejemplo:
 - a. Calibrador de gastrina después de la reconstitución = 500 pmol/l
 - b. 1,0 ml calibrador 500 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 250 pmol/l
 - c. 1,00 ml calibrador 250 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 125 pmol/l
 - d. 1,00 ml calibrador 125 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 62,5 pmol/l
 - e. 1,00 ml calibrador 62,5 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 31,2 pmol/l
 - f. 1,00 ml calibrador 31,2 pmol/l + 1,00 ml tampón del ensayo = 15,6 pmol/l
 - g. Tampón del ensayo = 0 pmol/l

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

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

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

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



XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Sensibilidad

La concentración mínima detectable fue de 5 pmol/l. Esta cifra corresponde a una reducción de la fijación de 2 x DE de la radiactividad ligada al calibrador de concentración cero.

B. Precisión

Variación intraensayo

Nivel	Coefficiente de variación (%CV)	N
41 pmol/l	3,0%	20
135 pmol/l	3,0%	20

Variación interensayo (variación total)

Nivel	Coefficiente de variación (%CV)	N
47 pmol/l	7,5%	17
165 pmol/l	6,2%	17

C. Precisión

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%.

D. Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

Compuesto	Reacción cruzada
Gastrina-17	100,0%
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%

E. Interferencia

Las muestras que presentan enturbiamiento, una hemólisis, una hiperlipemia o que contienen fibrina pueden dar resultados inexactos.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

1. Controles

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

2. Recuentos totales

Los recuentos totales obtenidos deben aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficiencia del recuento y el deterioro radiactivo. El contenido de gastrina I^{125} de este kit dará un recuento total de 25 000 CPM (-5 , +20%) en la fecha de referencia (eficacia de recuento = 80%).

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

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

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

Calcular para cada ensayo el porcentaje de fijación no específica:

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

La fijación no específica es menos del 5%.

5. Pendiente de la curva de calibración

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

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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 (1DE).

Intervalo: 11-54 pmol/l.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para 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 VHC y los anticuerpos del VIH-1 y VIH-2, dando todos ellos negativo. No obstante, se deben respetar todas las precauciones recomendadas para manipular cualquier derivado de la sangre.

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

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

- El material radiactivo debe almacenarse en zonas especialmente designadas para tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en zonas autorizadas.

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

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

XVII. REFERENCIAS

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

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

N.º catálogo DIASource: KIPEMD302	Número de revisión : 200615
--------------------------------------	--------------------------------

Fecha de revisión : 15/06/2020

Pročitati ceo protokol pre upotrebe

Gastrin-RIA

I. NAMENA

Radioimunološki test za *in vitro* kvantitativno merenje gastrina u humanom serumu.

II. OPŠTE INFORMACIJE

- A. **Zaštićeni naziv :** DIASource Gastrin-RIA
- B. **Kataloški broj :** KIPEMD302 : 100 testsova
- C. **Proizvođač :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgija.

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

III. KLINIČKA SLIKA

1. Biološka aktivnost

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

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

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

2. Klinička primena

Gastrin je jedan od najbolje proučenih hormona gastrointestinalnog trakta. U krvotoku se javlja u nekoliko različitih oblika, među kojima su gastrin-34 i gastrin-17, sulfatirani i nesulfatirani.

Određivanje gastrina je korisno u dijagnostikovanju tumora koji proizvode gastrin i ahilije sa ili bez perniciozne anemije. U svim ovim kliničkim slučajevima koncentracija gastrina u serumu je visoka. Lečenje jakim antisekretagogima može prouzrokovati porast koncentracije gastrina u serumu, zbog poremećene inhibicije kiseline povratnom spregom oslobađanja gastrina. Određivanje gastrina u serumu se dakle može koristiti za praćenje lečenja antisekretagogima.

IV. PRINCIPI METAODA

Gastrin u serumu se određuje kompetitivnim radioimunološkim testom koristeći zečji antiserum u odnosu na konjugat gastrina 17 albumin. Gastrin u kalibratorima i uzorcima se takmiče sa gastrinom-17 označenim sa ¹²⁵I u vezivanju sa antitelima. ¹²⁵I-gastrin se veže u obrnutoj proporciji koncentracije gastrina u kalibratorima i uzorcima. ¹²⁵I-gastrin vezan antitelima je odvojen od nevezanog dela pomoću dvostrukog antitela - tehnike taloženja polietilen glikolom. Meri se radioaktivnost taloga. Antiserum korišćen u ovom određivanju unakrsno reaguje sa gastrinom-34 i sulfatiranim oblicima gastrina-17 i gastrina-34.

Za profesionalnu upotrebu u laboratoriji.

V. OBEZBEĐENI REAGENSI

Reagensi	100 paketa za testiranje	Boja šifra	Rastvaranje		
[ANTISERUM] Zečji antiserum upotrebljen u odnosu na sintetički humani gastrin-17 konjugovan sa goveđim serumskim albuminom. Razblaživač: fosfatni pufer, humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).	1 bočica 21mL	Plava	Spremno za upotrebu		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Ag</td> <td style="padding: 2px;">¹²⁵I</td> </tr> </table> INDIKATOR: ¹²⁵ Jod-Gastrin u fosfatnom puferu sa humanim serumskim albuminom i NaN ₃ (natrijum azid).	Ag	¹²⁵ I	1 bočica liofilizovan 66 kBq	Crvena	Dodati 25 ml destilovane vode
Ag	¹²⁵ I				
[Ab PEG] Dvostruko antitelo-PEG: Protiv zečji Ig antiserum kože u fosfatnom puferu sa humanim serumskim albuminom i natrijum azidom. (<0.1%). Sadrži polietilen glikol	1 bočica 50 mL	Zelena	Spremno za upotrebu		
[ASS BUF] Određivanje pufera: fosfatni pufer koji sadrži humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).	1 bočica 40 mL	Crna	Spremno za upotrebu		
[CAL] Kalibrator gastrina u fosfatnom puferu koji sadrži humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).	1 bočica liofiliziran	Žuta	Rekonstituirajte destiliranom vodom prema zapremini navedenoj na etiketi bočice		
[KONTROLA N] Kontrola - N = 1 ili 2 Kontrolni materijal za liofiliziranje sa dva različita nivoa gastrina.	2 bočice liofiliziran	Srebrna	Dodati 1 ml destilovane vode		

VI. NISU OBEZBEĐENE ZALIHE

Dole navedeni materijal je potreban ali nije obezbeđen u pakovanju:

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

VII. PRIPREMA REAGENSA

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

VIII. ČUVANJE I ROK UPOTREBE REAGENASA

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

IX. UZIMANJE UZORAKA

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

X. POSTUPAK

Rastorite naznačene reagense.

Reagensi treba da budu dovedeni do sobne temperature pre upotrebe. Tačnost u svim koracima pipetiranja je od suštinskog značaja. Svi testovi (kalibratori, kontrolni materijali i uzorci) treba da se vrše duplo. Kompletno određivanje uključuje:

Kalibratori: 7 različitih koncentracija, 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 i 500 pmol/L.

Kontrolni materijal: Nizak i visok.

Uzorci.

Epruvete za određivanje nespecifičnog vezivanja (NSB epruvete).

Epruvete za određivanje ukupne radioaktivnosti (TOT epruvete).

B. Postupak

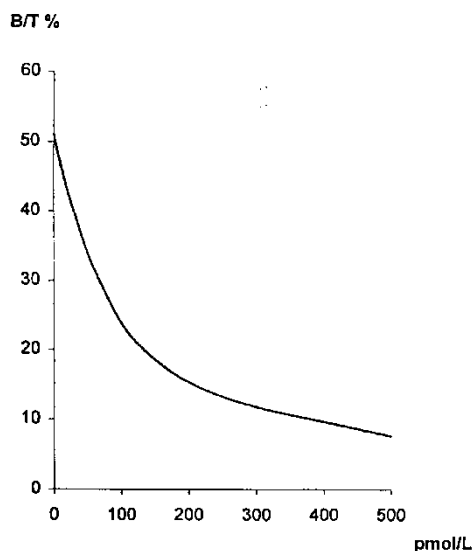
- Rastvorite liofilizirane reagense prema uputstvima i pustite da reagensi dostignu sobnu temperaturu.
- Pripremite kalibratore gastrina rastvaranjem kalibratora gastrina 500 pmol/L sa testnim puferom prema sledećem primeru:
 - Kalibrator gastrina nakon rastvaranja = 500 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 500 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 250 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 250 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 125 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 125 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 62,5 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 62.5 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 31,2 pmol/L
 - 1.0 mL kalibratora 31.2 pmol/L + 1.0 mL testnog pufera = 15,6 pmol/L
 - testni pufer = 0 pmol/L

(Čuvati kalibratore na temperaturi od -20° C ili nižoj u slučaju ponovne upotrebe).
- Pipetirajte 100 µL kalibratora, kontrolnog materijala i uzorak u njihove odgovarajuće epruvete.
- Pipetirajte 300 µL testnog pufera u NSB-epruvete.
- Pipetirajte 200 µL ¹²⁵I-Gastrina u sve epruvete. TOT epruvete imaju zatvorene poklopce i drže se po strani.
- Pipetirajte 200 µL anti-Gastrina u sve epruvete osim NSB i TOT epruveta.
- Epruvete pažljivo zavrteti i inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi (18-25° C).
- Dodati 500 µL dobro promešang duplog antitela-PEG u sve epruvete osim TOT epruvete. Pažljivo zavrteti i inkubirati najmanje 30-60 minuta na sobnoj temperaturi.
- Centrifugirati 15 minuta na najmanje 1700 x g, na temperaturi od 4° C.
- Dekantovati supernatant odmah nakon centrifugiranja i zabeležiti radioaktivnost taloga u gama brojaču.

XI. IZRAČUNAVANJE REZULTATA

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

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



XIII. DEJSTVO I OGRANIČENJA

A. Osetljivost

Najniža zabeležena koncentracija je bila 5 pmol/L. Ova cifra odgovara smanjenju u vezivanju dva x SD vezane radioaktivnosti u kalibratoru sa nultom koncentracijom.

B. Preciznost

Varijacije između testova

Nivo	Koeficijent varijacije (%CV)	N
41 pmol/L	3,0%	20
135 pmol/L	3,0%	20

Varijacije unutar testa (ukupne varijacije)

Nivo	Koeficijent varijacije (%CV)	N
47 pmol/L	7,5%	17
165 pmol/L	6,2%	17

C. Tačnost

Srednji oporavak od 97.6% je postignut kada su poznate količine gastrina u rasponu od 65-222 pmol/L bile dodate uzorcima seruma.

D. Specifičnost

Ustanovljene su sledeće unakrsne reakcije:

Smeša	Unakrsna reakcija
Gastrin-17	100.0%
Gastrin-17, sulfatiran	83%
Gastrin-34	61%
CCK-8	36%
Gastrin 1-14	<0.1%
Peptid oslobađanja gastrina	<0.01%
Vazoaktivni intestinalni peptid	<0.01%
Motilin	<0.01%
Glukagon	<0.01%
Somatostatin 14	<0.01%
C-peptid	<0.01%

E. Mešanje

Uzorci koji su zamućeni, hemolitični, hiperlipemični ili koji sadrže fibrin mogu dati netačne rezultate.

XIV. INTERNA KONTROLA KVALITETA

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

1. Kontrolni materijal:

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

2. Ukupni rezultati

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

3. Maksimalno vezivanje (Bo/TOT)

Izračunati sa svaki test procenat vezivanja radioaktivnosti u nultom kalibratoru:

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

TOT

4. Nespecifično vezivanje (NSB/TOT)

Izračunati sa svaki test procenat nespecifičnog vezivanja:

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

TOT

Nespecifično je manje od 5%.

5. Nagib kalibracione krive

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

XV. REFERENTNI INTERVALI

Normalan nivo gastrina u humanom serumu: ≤60 pmol/L (nivo posta postignut ovom metodom).

Srednja vrednost: 25 pmol/L ± 10 pmol/L (1SD).

Raspon: 11-54 pmol/L.

XVI. PREDOSTROŽNOST I UPOZORENJA

Bezbednost

Samo za *in vitro* dijagnostiku.

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

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

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

Treba poštovati sledeće mere predostrožnosti kada se rukuje radioaktivnim materijalima:

- radioaktivni materijal treba da se čuva u posebno predviđenom prostorijama koje nisu dostupne neovlašćenom osoblju,
- rukovanje radioaktivnim materijalom treba da se obavlja samo u za to predviđenim prostorijama,

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

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

XVII. BIBLIOGRAFIJA

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

XVIII.

SADRŽAJ PROTOKOLA

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

DIAsource Katalog br: KIPEMD302	Broj revizije: 200615
------------------------------------	--------------------------

Datum revizije: 15/06/2020