



Somatostatin - RIA

RB306RUO

History

Summary of change:

Previous Version: 191011-1	Current Version: 200224-1
LOT	Version :
	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "

Read entire protocol before use.

Somatostatin RIA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource Somatostatin RIA
- B. Catalog number :** RB306RUO : 100 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

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

IV. REAGENTS PROVIDED

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

V. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VI. REAGENT PREPARATION

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

VII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of the lyophilized reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in a vial by gentle inversion and avoid foaming. The stability of the reagents is found on the label of the vials. For lyophilized reagents the expiry date is valid for the un-reconstituted reagents. Reconstituted reagents are stable for 10 weeks or until the expiry date is reached when stored according to the instructions.

VIII. SPECIMEN COLLECTION

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

IX. PROCEDURE

I. Extraction of plasma samples

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

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

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

RECOVERY CONTROLS

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

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

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

II. Radioimmunoassay of extracts

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

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

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

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

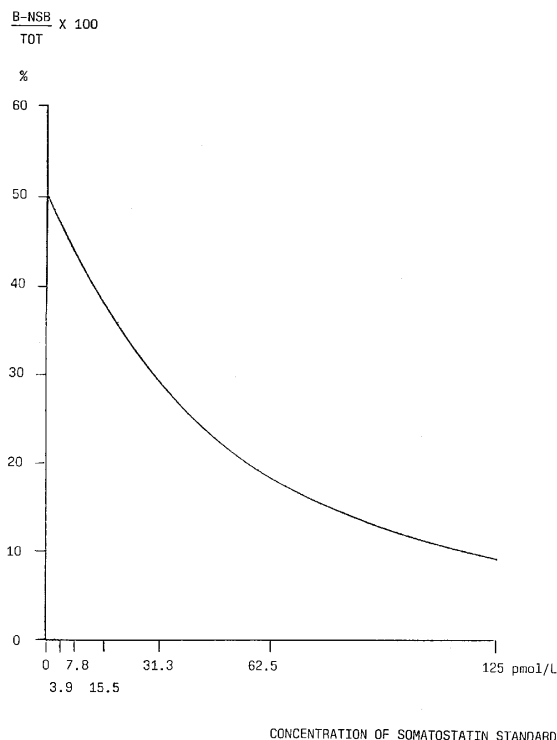
1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding from the count rate (CPM) of the replicates of standards, controls and samples.
2. A standard curve is generated by plotting the precipitated CPM, bound fraction (in CPM or %B/TOT) against the concentrations of the Somatostatin standards.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

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

5. Correct the sample concentrations for the % recovery.
Correct the sample concentrations for the increase of volume when adding 1M HCl. Multiply with a factor of 1.10.
6. The standard curve and the calculation of the concentrations in the samples can also be done by a computer method. A spline method may be used.

XII. TYPICAL DATA

EXAMPLE OF SOMATOSTATIN STANDARD CURVE



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

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

Intra assay variation:

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

Total variation (Inter assay):

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

- D. **Specificity**
The following cross reactions have been found:

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

D. Interference

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

XIV. SOMATOSTATIN CONCENTRATION IN HUMAN PLASMA

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

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

1. Controls

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

2. Recovery control

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

3. Total counts

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

4. Maximum binding (Bo/TOT)

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

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

5. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

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

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

5. Shape of standard curve

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For research use only.

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

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

Steps should be taken to ensure the proper handling of the radioactive material, according to local and/or national regulations. Only authorized personnel should have access to the reagents.

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Peeters, Theo L., Depraetere, Y. and Van Trappen, R. Simple extraction method and radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. Clin Chem 27:888 (1981).
2. Berg, J., Nilsson, K., Ekman, R. and Giovannella, B. Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell carcinomas of the lung. Acta Path Microbiol et Immunologica Scand 93A:133-147, 1985.
3. Widerlöv, E., Walleus, H., Lindström, L.H., Karlsson, I., Nemeroff, C.B., Rehfeld, J.F. and Ekman, R. Neuropeptide alterations in cerebrospinal fluid and plasma from psychiatric patients. Proceedings of the IV world congress of biological psychiatry Philadelphia 1985. Eds.: Shagass et al. Elsevier. New York (1986), pp 856-858.
4. Somatostatin
Wass, J.A.H.
In Endocrinology volume no. 1, pp 152-166.
Editor: De Groot, Leslie J.
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989.
5. Penman, E., Wass, J.A.H., Lund, A. et al. Development and validation of the specific radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. Ann Clin Biochem 16:15-25, 1979.
6. Saito, H., Ogawa, T., Ischmaru, K., et al. Plasma somatostatin in normal and diseased states. Program of the Vth International congress of endocrinology, Melbourne, 1980. Abst. 75.
7. Arimura, A., Lundqvist, G., Rothman, J. et al. Radioimmunoassay of somatostatin. Metabolism 27 (Suppl 1):1139-1144, 1978.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrator	-	-	100 µl	-	-
Controls	-	-	-	100 µl	-
Samples	-	-	-	-	100 µl
Anti-somatostatin	-	-	200 µl		
Assay diluent	-	300 µl	-	-	-
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
^{125}I Tracer	200 µl				
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
Double antibody solid phase	-	100 µl			
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 2-8°C.					
Centrifuge 15 min (1700 g; 4°C)					
Decant and count the radioactivity of the pellets					

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

DIASource Catalogue Nr : RB306RUO	Revision nr : 200224-1
--------------------------------------	---------------------------

Revision date : 24/02/2020

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

Somatostatin RIA

I. DESTINAZIONE D'USO

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

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome brevettato :** DIAsource Somatostatin RIA
- B. Numero di catalogo :** RB306RUO : 100 test
- C. Fabbricato da :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. PRINCIPI DEL METODO

La somatostatina nel plasma viene estratta con cartucce Sep-pak C18. Gli estratti sono analizzati con un dosaggio radioimmunologico competitivo impiegando un antisiero alla somatostatina 14 ciclica sintetica 14. La somatostatina in standard e campioni compete con la somatostatina ¹²⁵I nel legarsi agli anticorpi. ¹²⁵I-Tyr1-somatostatina si lega in proporzione inversa alla concentrazione di somatostatina in standard e campioni. ¹²⁵I-Tyr1-somatostatina è separata dalla frazione non legata con la tecnica della precipitazione doppio anticorpo fase solida. Viene misurata la radioattività della precipitazione. Il risultato non dovrà essere usato a scopo di diagnosi clinica o gestione del paziente.

IV. REAGENTI IN DOTAZIONE

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

V. FORNITURE NON IN DOTAZIONE

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

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

VI. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

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

VII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8° C prima della ricostituzione e dell'uso. L'acqua usata per ricostituire i reagenti liofilizzati deve essere distillata in un apparecchio completamente in vetro oppure deve essere di purezza equivalente. Sciogliere i contenuti in una fiala girandola delicatamente evitando la formazione di schiuma. La stabilità dei reagenti è riportata sull'etichetta delle fiale. Per i reagenti liofilizzati, la data di scadenza è valida per i reagenti non ricostituiti. I reagenti ricostituiti sono stabili per 10 settimane o fino alla data di scadenza se conservati secondo le istruzioni.

VIII. RACCOLTA DI CAMPIONI

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

IX. PROCEDURA

I. Estrazione di campioni di plasma

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

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

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

CONTROLLI DI RECUPERO

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

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

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

II. Dosaggio radioimmunologico degli estratti

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

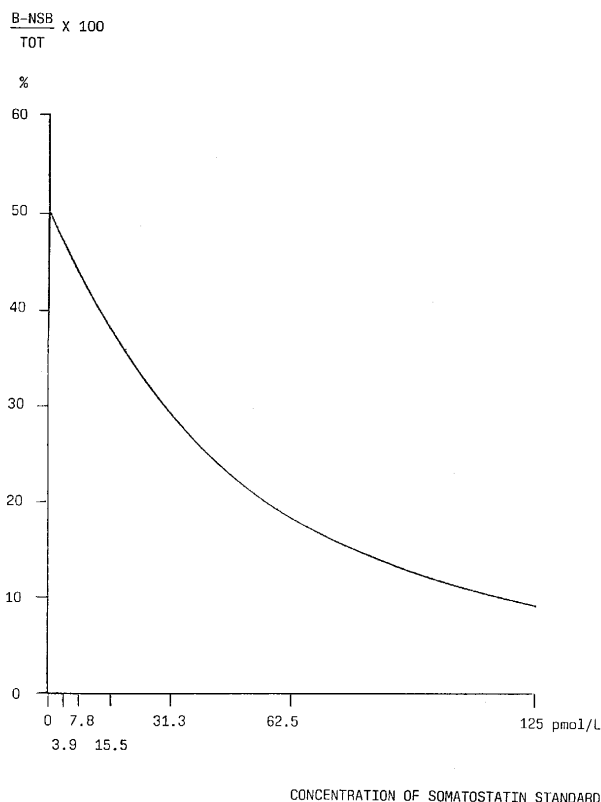
- Sottrarre il conteggio (CPM) medio del legante non specifico dal conteggio (CPM) dei replicati di standard, controlli e campioni.
- Una curva standard viene generata tracciando il CPM precipitato, la frazione legata (in CPM o %B/TOT) rispetto alla concentrazione di standard somatostatina.
- Interpolare le concentrazioni di somatostatina nei campioni e controlli dalla curva standard generata.
- Calcolare il recupero della somatostatina nei controlli di recupero.
% somatostatina recuperata =

$$\frac{(\text{Media conc. di controllo a} - \text{Media conc. di controllo b}) \times 100}{50 (= \text{concentrazione aggiunta})}$$

- Correggere le concentrazioni del campione per il recupero %.
Correggere le concentrazioni del campione per l'aumento di volume quando si aggiunge 1M HCl. Moltiplicare per un fattore di 1.10.
- La curva standard generata e il calcolo della concentrazione nei campioni possono anche essere effettuati con un metodo computerizzato. Può essere usato il metodo spline.

XII. DATI TIPICI

EXAMPLE OF SOMATOSTATIN STANDARD CURVE



XIII. ESECUZIONE E LIMITI

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

Variatione all'interno del test:

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

Variatione totale (interno test):

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

D. Specificità

Sono state trovate le seguenti reazioni incrociate:

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

D. Interferenza

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

XIV. CONCENTRAZIONE DI SOMATOSTATINA NEL PLASMA UMANO

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

XV. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

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

1. Controlli

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

2. Controllo di recupero

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

3. Conteggi totali

I conteggi ottenuti dovrebbero avvicinarsi al CPM atteso CPM quando vengono regolati per l'efficienza del contatore e il decadimento radioattivo. Il contenuto di ^{125}I -Tyr1-somatostatina in questo kit darà un conteggio totale nel test (TOT) di 10500 CPM (+20%, -5%) alla data di riferimento attività (efficienza contatore = 80%).

4. Legame massimo (Bo/TOT)

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

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

TOT

5. 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 6%.

5. Forma della curva standard

Per esempio, monitorare i punti 80, 50 e 20% della curva standard per una riproducibilità interfase.

XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Solo per uso a scopo di ricerca.

Dato che le norme potrebbero variare da Paese a Paese, è fondamentale che la persona responsabile del laboratorio acquisisca 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, seguire tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

Adottare misure volte a garantire la corretta manipolazione del materiale radioattivo secondo le norme locali e/o regionali. Soltanto il personale autorizzato deve avere accesso ai reagenti.

Rispettare le seguenti precauzioni quando si maneggiano materiali radioattivi:

- Il materiale radioattivo deve essere conservato in aree appositamente designate, non normalmente accessibili a personale non autorizzato.
- La manipolazione del materiale radioattivo deve essere effettuata soltanto nelle aree autorizzate.
- Prestare attenzione a prevenire l'ingestione e il contatto con pelle e abbigliamento.
Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.
- Deve essere vietato bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.
- Le mani vanno protette con guanti e lavate dopo aver utilizzato materiale radioattivo.
- Eseguire il lavoro su una superficie coperta da materiale assorbente usa e getta.
- Eliminare immediatamente eventuali fuoriuscite di materiale radioattivo e gettare tutti i materiali contaminati come rifiuti radioattivi. Le superfici contaminate vanno pulite con detergente.

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

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Peeters, Theo L., Depraetere, Y. and Van Trappen, R. Simple extraction method and radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. Clin Chem 27:888 (1981).
2. Berg, J., Nilsson, K., Ekman, R. and Giovannella, B. Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell carcinomas of the lung. Acta Path Microbiol et Immunologica Scand 93A:133-147, 1985.
3. Widerlöv, E., Walleus, H., Lindström, L.H., Karlsson, I., Nemeroff, C.B., Rehfeld, J.F. and Ekman, R. Neuropeptide alterations in cerebrospinal fluid and plasma from psychiatric patients. Proceedings of the IV world congress of biological psychiatry Philadelphia 1985. Eds.: Shagass et al. Elsevier. New York (1986), pp 856-858.
4. Somatostatin
Wass, J.A.H.
In Endocrinology volume no. 1, pp 152-166.
Editor: De Groot, Leslie J.
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1989.
5. Penman, E., Wass, J.A.H., Lund, A. et al. Development and validation of the specific radioimmunoassay for somatostatin in human plasma. Ann Clin Biochem 16:15-25, 1979.
6. Saito, H., Ogawa, T., Ischmaru, K., et al. Plasma somatostatin in normal and diseased states. Program of the Vth International congress of endocrinology, Melbourne, 1980. Abst. 75.
7. Arimura, A., Lundqvist, G., Rothman, J. et al. Radioimmunoassay of somatostatin. Metabolism 27 (Suppl 1):1139-1144, 1978.

XVIII.

RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	Conteggio totale	NSB	Calibratore (0-6)	Controlli	Campioni
Calibratore	-	-	100 µl	-	-
Controlli	-	-	-	100 µl	-
Campioni	-	-	-	-	100 µl
Anti-somatostatina	-	-	200 µl		
Diluyente del test	-	300 µl	-	-	-
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.					
Tracciatore ^{125}I	200 µl				
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.					
Fase solida doppio anticorpo	-	100 µl			
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 30-60 min a 2-8°C.					
Centrifugare 15 min (1700 g; 4°C)					
Decantare e misurare la radioattività dei pellet					

Catalogo DIAsource N°: RB306RUO	Revisione N°: 200224-1
------------------------------------	---------------------------

Data revisione : 24/02/2020