

Instruction

EURIA-PP

Pancreatic Polypeptide radioimmunoassay
For in vitro diagnostic use only



Document No.E-23-0023-11

February, 2016

EURIA-PP

English:	page	2
Francais:	page	14
Espanol:	página	26
Deutsch:	Seite	38
Italiano:	pagina	50
Svenska	sida	62

REF RB 316

IVD



INTRODUCTION

Pancreatic polypeptide (PP) is synthesized as an amino-terminal moiety of a precursor peptide. PP isolated from pancreas has 36 amino acid residues with an amidated C-terminal tyrosine. PP is secreted by F-cells of the islets of Langerhans. PP is localized almost entirely in the pancreas although detectable levels throughout gastrointestinal tract have been reported. PP in human plasma is reported to exist in at least four different forms: PP 1-36, PP 3-36 and two unidentified forms.

PP is released into plasma during stimulation of meal. The physiological role of PP includes inhibition of stimulated gastric and pancreatic exocrine secretions and augmentation of insulin inhibited hepatic glucose production. These actions of PP are mediated by specific receptors. Receptor binding studies have shown that the intact C-terminal tyrosine amide is necessary for biological activity.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The intended use of these reagents is for assay of PP in human serum. PP in serum is assayed without extraction by a competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against bovine PP. PP in standards and samples compete with ¹²⁵I-labelled human PP in binding to the antibodies. ¹²⁵I-PP binds in a reverse proportion to the concentration of PP in standards and samples. Antibody-bound ¹²⁵I-PP is separated from the unbound fraction using the double antibody-polyethyleneglycol precipitation technique. The radioactivity of the precipitates is measured. Human, synthetic PP is used for standardization.

For professional use within a laboratory.

CLINICAL CONSIDERATIONS

The secretion of PP is stimulated by meal especially protein and fat. PP is also produced by endocrine active tumours in the pancreas and the gastrointestinal tract. These tumours often produce several peptide hormones in the combinations PP-VIP, PP-glucagon or PP-gastrin. Tumours with only PP-secretion have been reported. These tumours may occur at the WDHA or Verner-Morrison syndrome.

Elevated fasting levels of PP in serum are found at the occurrence of PP-producing tumours and endocrine tumours in the pancreas and in the gastrointestinal tract.

Normal level of PP in human serum: <100 pmol/L (fasting level obtained with this procedure).

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

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

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

COMPOSITION OF THE REAGENT KIT

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

1. Anti-PP (Reagent A)

Rabbit antiserum raised against bovine PP. For 100 tubes. Lyophilized in 5.0 mL 0.5M phosphate buffer, pH 7.4, 2.5% human serum albumin and 0.5% NaN₃.

Reconstitution in 52 mL distilled water.

2. ¹²⁵I-PP (Reagent B)

Contains 28 KBq or 0.75 μCi of ¹²⁵I-hPP at the activity reference date. Produced by iodination of synthetic human PP. HPLC-purified, monoiodinated.

Specific activity: 1700-2100 μCi/nmol (62-77 MBq/nmol).

Lyophilized in 1.25 mL 0.5M phosphate buffer, pH 7.4, 2.5% human serum albumin, 0.5% NaN₃. Contains 0.12 mL normal rabbit serum.

Reconstitution in 12.5 mL distilled water.

3. Double antibody-PEG (Reagent C)

50 mL diluted goat anti-rabbit-Ig antiserum. Diluent: 0.05M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25% human serum albumin and 0.05% NaN₃. Contains 7.5% polyethylene glycol 6000 (w/v).

4. Standard diluent (Reagent D)

10.0 mL PP-free human serum, lyophilized. Contains 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] or equivalent)/mL. Reconstitution in 10.0 mL distilled water. For preparation of PP-working standards.

5. PP-standard, 2 000 pmol/L (8370 pg/mL) (Reagent E)

2.00 mL, 2 000 pmol/L synthetic human PP-standard. Lyophilized in 0.05M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25% human serum albumin, 0.05% NaN₃. Reconstitution in 2.00 mL distilled water.

6. Assay buffer (Reagent F)

5.0 mL 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25% human serum albumin and 0.05% NaN₃.

To be used instead of antiserum in the non-specific binding test tubes.

7. Controls (Reagent G-H)

Lyophilized serum controls with low (G) and high (H) concentration of PP.

1.00 mL of each control after reconstitution. The PP concentrations of the controls are given on the label of the vials. Contains 0.05% NaN₃.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Distilled water

11-13x55 mm disposable tubes, polystyrene

Pipettes with disposable tips: 100 and 500 μl

Pipettes (glass): 1.00, 5.00 and 10.00 mL

Measuring cylinders: 25 mL and 50 mL

Vortex mixer

Centrifuge, refrigerated giving a minimum of 1700 x g

Gamma counter

SPECIMEN COLLECTION

Patients should be fasting 10 hours prior to sample collection.

Vein blood is collected in tubes without additives. The sample is allowed to clot. The 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 thawing and freezing should be avoided.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of 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 labels of the vials. For lyophilized reagents the expiry dates are valid for the unreconstituted reagents. Reconstituted reagents are stable for 10 weeks (no longer than to the expiry date) stored correctly.

Reagent A: Anti-PP

Reconstitute with 52 mL distilled water.
Store at 2-8° C.

Reagent B: ¹²⁵I-PP

Reconstitute with 12.5 mL distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.

Reagent C: Double antibody-PEG

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

Reagent D: Standard diluent

Reconstitute with 10.0 mL distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.

Reagent E: PP-standard, 2 000 pmol/L

Reconstitute with 2.00 mL distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.
For preparation of PP-working standards, see radioimmunoassay procedure.

Reagent F: Assay buffer

Ready to use.
Store at 2-8° C.

Reagent G-H: Controls

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

RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE

Reconstitute the reagents as specified. Reagents should be brought to room temperature prior to use. Accuracy in all pipetting steps is essential. All tests (standards, controls and samples) should be performed in duplicate.

A complete assay includes:

Standards (St-tubes): 7 different concentrations; 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 and 200 pmol/L.

Controls (C-tubes).

Samples (P-tubes).

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

Tubes for determination of the **total radioactivity added (TOT-tubes).**

For an overview see table 1 on page 9.

PERFORMANCE

1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the PP-working standards by dilution of the PP-standard 2000 pmol/L (Reagent E) with the standard diluent (Reagent D) according to the following:

a/ 0.200 mL standard 2000 pmol/L	+ 1.800 mL diluent	= 200 pmol/L
b/ 1.00 mL standard 200 pmol/L	+ 1.00 mL diluent	= 100 pmol/L
c/ 1.00 mL standard 100 pmol/L	+ 1.00 mL diluent	= 50 pmol/L
d/ 1.00 mL standard 50 pmol/L	+ 1.00 mL diluent	= 25 pmol/L
e/ 1.00 mL standard 25 pmol/L	+ 1.00 mL diluent	= 12.5 pmol/L
f/ 1.00 mL standard 12.5 pmol/L	+ 1.00 mL diluent	= 6.25 pmol/L
g/ Standard diluent		= 0 pmol/L.
- Store the standard solutions at -18° C or lower if reused.
3. Pipette 100 µL of the standards (0-200 pmol/L), samples and controls in their respective tubes. Pipette 100 µL of the zero-standard in the NSB-tubes.
4. Pipette 500 µL anti-PP (Reagent A) to all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
5. Add 500 µL assay buffer (Reagent F) to the NSB-tubes.
6. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
7. Pipette 100 µL ¹²⁵I-PP (Reagent B) 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. Pipette 500 µL double antibody-PEG (Reagent C) to all tubes except the TOT-tubes. Mix this reagent before pipetting.
10. Vortex-mix carefully and incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
11. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4° C (minimum 1700 x g).
12. Decant the supernatants immediately after centrifugation.
13. Count the radioactivity of the precipitates in a gamma counter (counting time: 2-4 minutes).

CALCULATION OF RESULTS

1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding tubes from the count rates (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 PP-standards. An example of a standard curve is given on page 10.
3. Interpolate the PP concentrations of the samples and controls from the generated standard curve.
4. The standard curve and the calculations of the concentrations in samples and controls can also be done by a computer method.

QUALITY CONTROL

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

1. The found concentrations of the control sera

PP levels 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-PP in this kit will give 10 500 CPM (-5, +20%) at activity reference date (counter efficiency = 80%).

3. Maximum binding (Bo/TOT)

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-standard: $\frac{B_0}{TOT} \times 100$

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

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

The % non-specific binding should be less than 7%.

5. Slope of standard curve

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

ASSAY CHARACTERISTICS

Sensitivity

The lowest detectable concentration is 3 pmol/L. The figure corresponds to a decrease in binding of two x SD of the bound radioactivity in the zero-concentration standard.

Accuracy

A mean recovery of 104% (95-113%) was achieved when known amounts of hPP were added to human serum.

Precision

Intra assay variation

<u>Level</u>	<u>Coefficient of variation (%CV)</u>	<u>N</u>
28.8 pmol/L	2.6	10
108.5 pmol/L	1.8	10

Inter assay variation (total variation)

<u>Level</u>	<u>Coefficient of variation (%CV)</u>	<u>N</u>
38.8 pmol/L	2.0	10
99.3 pmol/L	3.5	10

Specificity

The following cross-reactions have been found

<u>Peptide</u>	<u>Cross-reaction</u>
Pancreatic polypeptide, human	100.0 %
Pancreatic polypeptide, bovine	120 %
Gastric inhibitory peptide, porcine	0.02 %
Cholecystokinin 39, porcine	0.02 %
Secretin, porcine	0.02 %
Gastrin 34, human	<0.01 %
Gastrin 17, human	<0.01 %
Glucagon, human, porcine	0.03 %
Insulin, porcine	<0.01 %
ACTH 1-39, porcine	<0.003%
Neuropeptide Y, human	<0.8 %
Peptide YY, human	<1.0 %

Interference

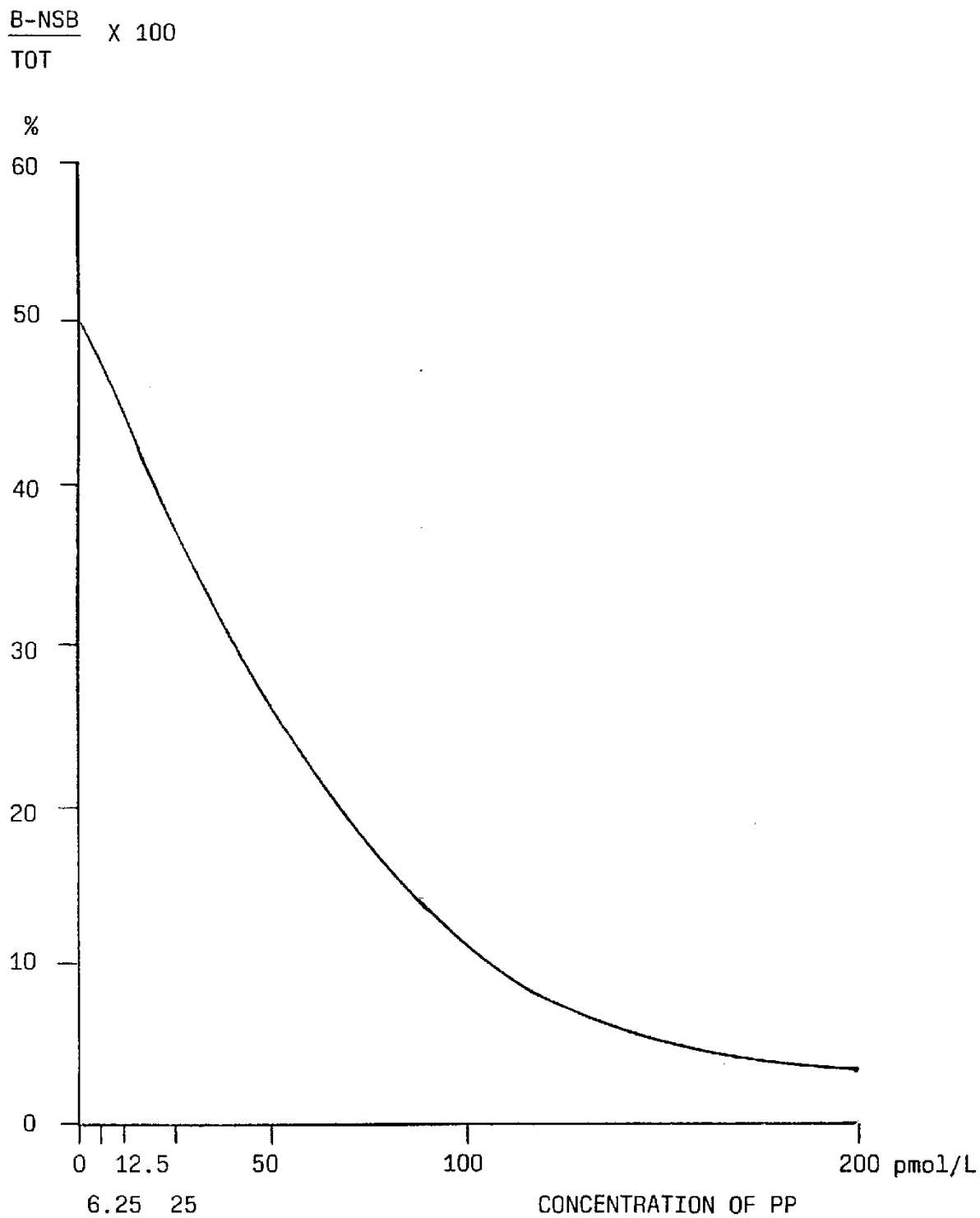
Samples displaying cloudiness, hemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

OUTLINE OF THE RIA PROCEDURE

Type of tubes	Tube no	Standard sample or control	Anti-PP (A)	Assay buffer (F)		¹²⁵ I-PP (B)		Double antibody-PEG (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortex-mix and	100 µL	Vortex-mix and	-	Vortex-mix and
NSB	3-4	100 µL	-	500	incubate	100 µL	incubate	500 µL	and
Stand 0	5-6	100 µL	500 µL	-	for	100 µL	for	500 µL	incubate
Stand 6.25	7-8	100 µL	500 µL	-	20-24	100 µL	20-24	500 µL	for 30-60
Stand 12.5	9-10	100 µL	500 µL	-	hours at	100 µL	hours at	500 µL	min. at
Stand 25	11-12	100 µL	500 µL	-	2-8° C.	100 µL	2-8° C.	500 µL	2-8° C.
Stand 50	13-14	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	Centrifuge
Stand 100	15-16	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	15 min. at
Stand 200	17-18	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	1700 x g at
Control (G)	19-20	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	+4° C.
Control (H)	21-22	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	Decant and
Sample 1	23-24	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	count the
Sample 2	25-26	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	radioactivi-
etc.									ty of the
									precipitates.

Table 1









EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



REFERENCES / REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.
Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L.
Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of
pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic
polypeptide administration in man. Surgery 104:119-129, 1988.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE. SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER SOM BRUKES PÅ ETIKETTER / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-PP. Anti-PP. Anti-PP. Anti PP. Anti PP. Anti-PP.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-PP. PP ¹²⁵ I. PP I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-PP. PP- ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-PP.
REAG	C	DAB		Double antibody-PEG. PEG double anticorps. Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Secondo anticorpo-PEG. Dobbelt antistoff, fast fase. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	DIL	CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente dello standard. Standardspädningsmedel.
REAG	E	CAL	2000	PP standard 2000 pmol/L. Standard de PP, 2000 pmol/L. Estándar PP 2000 pmol/L. PP Standard 2000 pmol/L. PPstandard P 2000pmol/L. PP-standard 2000 pmol/L.
REAG	F	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG	G	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoins, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controllo, livello 1 (normale). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG	H	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoins, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controllo, livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-PP

Dosage radio-immunologique du polypeptide pancréatique
À usage professionnel uniquement

INTRODUCTION

Le polypeptide pancréatique (PP) est synthétisé sous forme de fragment amino-terminal d'un peptide précurseur. Le PP isolé du pancréas a 36 résidus d'acides aminés avec une tyrosine C-terminale amidée. Le PP est sécrété par les cellules F des îlots de Langerhans. Le PP est presque exclusivement localisé dans le pancréas, avec cependant des niveaux détectables dans tout le tractus gastro-intestinal. Le PP du plasma humain est censé exister sous au moins quatre formes différentes : Le PP 1-36, le PP 3-36 et deux formes non-identifiées.

Le PP est libéré dans le plasma durant la stimulation exercée par un repas. Les rôles physiologiques du PP comprennent l'inhibition de sécrétions exocrines gastriques et pancréatiques stimulées et l'augmentation de la production de glucose hépatique inhibé par l'insuline. Ces actions du PP sont facilitées par des récepteurs spécifiques. Les études sur la liaison des récepteurs ont montré que la tyrosine amidée intacte en position C-terminale était nécessaire à l'activité biologique.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Ces réactifs sont indiqués pour le dosage du PP dans le sérum humain. Le PP sérique est dosé sans extraction par un dosage radio-immunologique compétitif avec un antisérum de lapin dirigé contre du PP bovin. Le PP des standards et échantillons entre en concurrence avec le PP marqué ¹²⁵I dans la liaison aux anticorps. Le PP marqué ¹²⁵I se lie en proportion inverse à la concentration de PP des standards et des échantillons. Le PP ¹²⁵I lié à l'anticorps est séparé de la fraction non liée par la technique de précipitation au polyéthylène glycol à double anticorps. La radioactivité des précipités est mesurée. Un PP humain synthétique est utilisé pour la standardisation.
À usage professionnel en laboratoire.

CONSIDÉRATIONS CLINIQUES

La sécrétion de PP est stimulée par les repas, et en particulier les protéines et les lipides. Le PP est également produit par les tumeurs endocrines intra-pancréatiques et le tractus gastro-intestinal. Ces tumeurs produisent souvent plusieurs hormones peptidiques sous forme des combinaisons PP-VIP, PP-glucagon ou PP-gastrine. Des tumeurs ont été rapportées faisant état de sécrétion de PP uniquement. Ces tumeurs peuvent se produire chez les personnes souffrant du syndrome de Verner-Morrison.

On trouve des niveaux de PP élevés dans le sérum à jeun en présence de tumeurs produisant du PP et des tumeurs endocrines intra-pancréatiques et du tractus gastro-intestinal.

Niveau normal de PP dans le sérum humain : <100 pmol/L (niveau à jeun obtenu avec cette procédure).

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

À usage exclusif en diagnostic in vitro.

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

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

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

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

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

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

COMPOSITION DU KIT DE RÉACTIF

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

1. Anti-PP (Réactif A)

Antisérum de lapin dirigé contre du PP bovin. Pour 100 tubes. Lyophilisé dans un tampon de phosphate 0,5 M de 5,0 ml (pH 7,4), 2,5% d'albumine sérique humaine et 0,5% de NaN_3 . Reconstitution dans 52 ml d'eau distillée.

2. PP ^{125}I (Réactif B)

Contient 28 KBq ou 0,75 μCi de hPP ^{125}I à la date de référence de l'activité. Produite par l'iodation du PP synthétique humain. Purifié par HPLC, mono-iodé.

Activité spécifique : 1700-2100 $\mu\text{Ci/nmol}$ (62-77 MBq/nmol).

Lyophilisé dans un tampon de phosphate 0,5 M de 1,25 ml (pH 7,4), 2,5% d'albumine sérique humaine, 0,5% NaN_3 . Contient 0,12 ml de sérum de lapin normal.

Reconstitution dans 12,5 ml d'eau distillée.

3. PEG double anticorps (Réactif C)

50 ml d'antisérum de chèvre anti-Ig de lapin dilué. Diluant : Tampon de phosphate 0,05 M (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine et 0,05% de NaN_3 . Contient 7,5% de polyéthylène glycol 6000 (masse pour volume).

4. Diluant standard (Réactif D)

10,0 ml de sérum humain sans PP, lyophilisé. Contient du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) dosé à 500 KIU/ml. Reconstitution dans 10,00 ml d'eau distillée. Pour la préparation des standards de travail PP.

5. Standard de PP, 2000 pmol/L (8370 pg/ml) (Réactif E)

2,00 ml de standard de PP synthétique humain à 2000 pmol/L. Lyophilisé dans un tampon de phosphate 0,05 M (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine et 0,05% de NaN_3 .

Reconstitution dans 2,00 ml d'eau distillée.

6. Tampon d'immunodosage (Réactif F)

Tampon de phosphate 0,05 M de 5,0 ml (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine et 0,05% de NaN_3 .

À utiliser en substitution à l'antisérum dans des tubes à essai de liaison non-spécifique.

7. Témoins (Réactif G-H)

Témoins de sérum lyophilisé à des concentrations basses (G) et élevées (H) de PP.

1,00 ml de chaque témoin après reconstitution. Les concentrations en PP des témoins en glucagon sont indiquées sur l'étiquette des flacons. Contient 0,05% NaN_3 .

RÉACTIFS ET MATÉRIELS NÉCESSAIRES ET NON FOURNIS

Eau distillée

Tubes de polystyrène jetables de 11-13x55 mm

Pipettes à embouts jetables : 100 et 500 μl

Pipettes (verre) : 1,00; 5,00 et 10,00 ml.

Cylindres de dosage : 25 ml et 50 ml

Agitateur vortex

Centrifugeuse réfrigérée débit minimum 1700 x g.

Compteur de rayons gamma

COLLECTE DE SPECIMENS

Les patients devront rester à jeun pendant 10 heures avant le prélèvement des échantillons. Le sang veineux est recueilli dans des tubes sans additifs. On laisse l'échantillon coaguler. Le sérum est séparé par centrifugation à +4° C. Le sérum doit être congelé dans les 4 heures qui suivent et entreposé à une température de -18° C ou inférieure jusqu'au moment du dosage. Éviter de congeler et décongeler à répétition.

PRÉPARATION ET ENTREPOSAGE DES RÉACTIFS

Entreposer tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8° C avant reconstitution et emploi. L'eau utilisée pour la reconstitution des réactifs lyophilisés devra être distillée dans des matériels tout en verre ou être d'une pureté équivalente. Dissoudre le contenu dans un flacon en agitant doucement par renversement et éviter toute formation de mousse. La stabilité des réactifs figure sur les étiquettes des flacons. Pour ce qui est des réactifs lyophilisés, la date de péremption est valable à l'état non-reconstitué. Les réactifs reconstitués restent stables pendant 10 semaines (avant la date de péremption) dans de bonnes conditions d'entreposage.

Réactif A: Anti-PP

Reconstituer avec 52 ml d'eau distillée.
Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif B: PP^{125I}

Reconstituer avec 12,5 ml d'eau distillée.
Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

Réactif C: PEG double anticorps

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

Réactif D: Diluant standard

Reconstituer avec 10,0 ml d'eau distillée.
Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

Réactif E: Standard de PP, 2000 pmol/L

Reconstituer avec 2,00 ml d'eau distillée.
Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
Pour la préparation des standards de travail de PP, suivre la procédure de dosage radio-immunologique.

Réactif F : Tampon de dosage

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

Réactif G-H : Témoins

Reconstituer avec 1,00 ml d'eau distillée. Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

PROCÉDURE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

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

Un dosage complet comprend :

Standard (St-tubes) : 7 concentrations différentes ; 0; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100 et 200 pmol/L.

Témoins (C-tubes).

Échantillons (P-tubes).

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

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

Voir le tableau 1 en page 21 pour un aperçu.

PERFORMANCE

1. Reconstituer les réactifs conformément aux instructions.
2. Préparer les standards de travail de PP en diluant le standard de 2000 pmol/L (Réactif E) avec le diluant de standard (Réactif D) conformément aux indications suivantes :

a/ 0,200 ml de standard à 2000 pmol/L	+ 1,800 ml de diluant	=	200 pmol/L
b/ 1,00 ml de standard à 200 pmol/L	+ 1,00 ml de diluant	=	100 pmol/L
c/ 1,00 ml de standard à 100 pmol/L	+ 1,00 ml de diluant	=	50 pmol/L
d/ 1,00 ml de standard à 50 pmol/L	+ 1,00 ml de diluant	=	25 pmol/L
e/ 1,00 ml de standard à 25 pmol/L	+ 1,00 ml de diluant	=	12,5 pmol/L
f/ 1,00 ml de standard à 12,5 pmol/L	+ 1,00 ml de diluant	=	6,25 pmol/L
g/ Diluant standard	=		0 pmol/L.

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

3. Pipeter 100 µl des standards (0-200 pmol/L), échantillons et témoins dans leur tubes respectifs. Pipeter 100 µl du standard d'étalonnage zéro dans les NSB-tubes.
4. Pipeter 500 µl d'anti-PP (Réactif A) dans tous les tubes à l'exception des tubes NSB et TOT-tubes.
5. Ajouter 500 µl de tampon de dosage (Réactif F) dans les tubes NSB.
6. Vortexer et incubé pendant 20-24 heures à 2-8° C.
7. Pipeter 100 µl de PP ¹²⁵I (réactif B) dans tous les tubes. Les TOT-tubes sont hermétiquement fermés et mis de côté.
8. Vortexer et incubé pendant 20-24 heures à 2-8° C.
9. Pipeter 500 µl de PEG double anticorps (réactif C) à tous les tubes à l'exception des TOT-tubes. Mélanger ce réactif avant de pipeter.
10. Vortexer en faisant attention et incubé pendant 30-60 minutes à 2-8° C.
11. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4° C (1700 x g minimum).
12. Décanter les surnageants immédiatement après la centrifugation.
13. Compter la radioactivité des précipités dans un compteur de rayons gamma (temps de comptage : 2-4 minutes).

CALCUL DES RÉSULTATS

1. Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes de liaison non-spécifique du taux de comptage (CPM) des réplicats des standards, témoins et échantillons.
2. Une courbe standard est produite en reportant le tracé du CPM précipité, fraction liée (en coups par minute ou % B/TOT) par rapport aux concentrations des standards de PP. Un exemple de courbe standard est donné en page 22.
3. Interpoler les concentrations de PP dans les échantillons et témoins à partir de la courbe standard produite.
4. La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons et témoins peuvent également être effectués par méthode informatique.

CONTRÔLE QUALITÉ

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

1. **Les concentrations trouvées dans les niveaux de PP des sérums témoins**
doivent se situer dans les limites indiquées sur les étiquettes des flacons.
2. **Coups totaux**
Les coups obtenus doivent correspondre environ au CPM prévu une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu de PP¹²⁵I de ce kit produira 10 500 CPM (-5, +20%) à la date de référence (efficacité de comptage = 80%).
3. **Liaison maximale (Bo/TOT)**
Calculer pour chaque dosage le % de radioactivité liée dans le standard d'étalonnage zéro : $\frac{Bo}{TOT} \times 100$
4. **Liaison non-spécifique (NSB/TOT)**
Calculer pour chaque dosage le % de liaison non-spécifique : $\frac{NSB}{TOT} \times 100$
Le % de liaison non-spécifique doit être inférieur à 7%.
5. **Pente de la courbe standard**
Par exemple, surveiller les points 80, 50 et 20% de la ligne standard pour la reproductibilité inter-séries.

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Sensibilité

La concentration détectable la plus faible est de 3 pmol/L. La valeur correspond à une baisse de la liaison de 2 x SD de la radioactivité liée dans le standard d'étalonnage zéro.

Exactitude

Un rendement moyen de 104% (95-113%) a été obtenu lorsque des quantités connues de hPP avaient été ajoutées à du sérum humain.

Précision

Variation intra-dosage :

<u>Niveau</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
28,8 pmol/L	2.6	10
108,5 pmol/L	1.8	10

Variation inter-dosages (variation totale)

<u>Niveau</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
38,8 pmol/L	2.0	10
99,3 pmol/L	3.5	10

Spécificité

On a trouvé les réactions croisées suivantes :

<u>Peptide</u>	<u>Réaction croisée</u>
Polypeptide pancréatique humain	100.0 %
Polypeptide pancréatique bovin	120 %
Peptide inhibiteur gastrique porcine	0.02 %
Cholécystokinine 39 porcine	0.02 %
Sécrétine porcine	0.02 %
Gastrine 34 humaine	<0.01 %
Gastrine 17 humaine	<0.01 %
Glucagon humain et porcine	0.03 %
Insuline porcine	<0.01 %
Corticotrophine 1-39 porcine	<0.003%
Neuropeptide Y humain	<0.8 %
Peptide YY humain	<1.0 %

Interférence

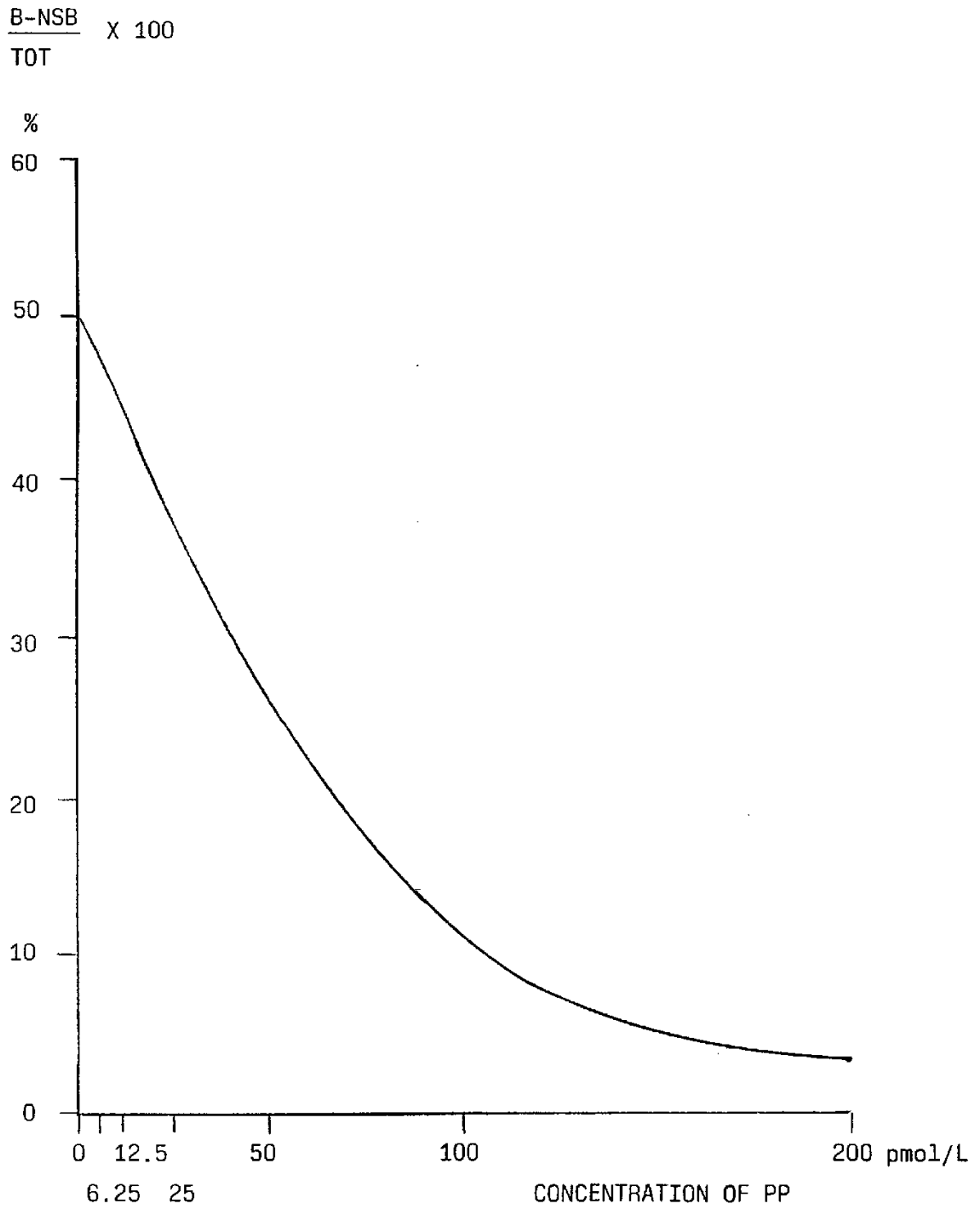
Les échantillons présentant un trouble, une hémolyse, une hyperlipémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.

CADRE DE LA PROCÉDURE RIA

Type de tubes	Tube (n°)	Standard échantillon ou témoin	Anti-PP (A)	Tampon de dosage (F)		PP ¹²⁵ I (B)		PEG double anticorps (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexer	100 µl	Vortexer	-	Vortexer et
NSB	3-4	100 µl	-	500	et	100 µl	et	500 µl	incuber
Stand 0	5-6	100 µl	500 µl	-	incuber	100 µl	incuber	500 µl	pendant 30-
Stand 6,25	7-8	100 µl	500 µl	-	pendant	100 µl	pendant	500 µl	60
Stand 12,5	9-10	100 µl	500 µl	-	20-24	100 µl	20-24	500 µl	mn. à 2-8° C.
Stand 25	11-12	100 µl	500 µl	-	heures à	100 µl	heures à	500 µl	Centrifuger
Stand 50	13-14	100 µl	500 µl	-	2-8° C.	100 µl	2-8° C.	500 µl	15 mn. à
Stand 100	15-16	100 µl	500 µl	-		100 µl		500 µl	1700 x g à
Stand 200	17-18	100 µl	500 µl	-		100 µl		500 µl	+4° C.
Témoin (G)	19-20	100 µl	500 µl	-		100 µl		500 µl	Décanner et
Témoin (H)	21-22	100 µl	500 µl	-		100 µl		500 µl	compter la
Échantillon 1	23-24	100 µl	500 µl	-		100 µl		500 µl	radioactivité
Échantillon 2	25-26	100 µl	500 µl	-		100 µl		500 µl	des
etc.									précipités.

Tableau 1











EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



REFERENCES / REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.
Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L.
Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of
pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic
polypeptide administration in man. Surgery 104:119-129, 1988.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE. SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER SOM BRUKES PÅ ETIKETTER / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG A Ab	Anti-PP. Anti-PP. Anti-PP. Anti PP. Anti PP. Anti-PP.
REAG B Ag ¹²⁵ I	¹²⁵ I-PP. PP ¹²⁵ I. PP I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-PP. PP- ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-PP.
REAG C DAB	Double antibody-PEG. PEG double anticorps. Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Secondo anticorpo-PEG. Dobbelt antistoff, fast fase. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente dello standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 2000	PP standard 2000 pmol/L. Standard de PP, 2000 pmol/L. Estándar PP 2000 pmol/L. PP Standard 2000 pmol/L. PPstandard P 2000pmol/L. PP-standard 2000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoins, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controllo, livello 1 (normale). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H CONTROL	Control, level 2 (high). Témoins, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controllo, livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-PP

Radioinmunoensayo para la determinación del Polipéptido pancreático
Sólo para uso profesional

INTRODUCCIÓN

El polipéptido pancreático (PP) se sintetiza como una mitad aminoterminal de un péptido precursor. El PP aislado en el páncreas tiene 36 residuos de aminoácidos con una tirosina C-terminal amidada. El PP es secretado por las células F de los islotes de Langerhans. El PP se encuentra casi enteramente en el páncreas, aunque existen informes sobre niveles detectables de esta sustancia en todo el tracto gastrointestinal. En el plasma humano, el PP se da en por lo menos cuatro formas diferentes: PP 1-36, PP 3-36 y otras dos formas no identificadas.

El PP se libera en el plasma durante la estimulación provocada por la ingestión de alimentos. El papel fisiológico del PP incluye la inhibición de las secreciones exocrinas gástricas y pancreáticas estimuladas y el incremento de la producción de glucosa hepática inhibida por la insulina. Estas acciones del PP están mediadas por receptores específicos. Los estudios sobre fijación de receptores han mostrado que, para la actividad biológica, es necesario que esté la amida intacta de la tirosina C-terminal .

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aplicación de estos reactivos es la determinación del nivel de PP en suero humano. El PP del suero se analiza sin extracción mediante un radioinmunoensayo competitivo, utilizando un antisuero de conejo enfrenteado a un PP bovino. El PP de los estándares y las muestras compiten con un PP humano marcado con I¹²⁵ por la fijación a los anticuerpos. El PP I¹²⁵ se fija en proporción inversa a la concentración de PP de los estándares y las muestras. El PP I¹²⁵ fijado a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada utilizando la técnica de precipitación de doble anticuerpo con polietilenglicol. Seguidamente se mide la radiactividad de los precipitados. Para la estandarización, se utiliza PP humano sintético.
Sólo para uso profesional en el laboratorio.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La secreción de PP es estimulada por la ingestión, especialmente de proteínas y grasas. El PP también se produce en los tumores endocrinos activos en el páncreas y el tracto gastrointestinal. Estos tumores a menudo producen varias hormonas peptídicas en las combinaciones PP-VIP, PP-glucagón o PP-gastrina. También se han descrito tumores asociados exclusivamente a la secreción de PP. Estos tumores pueden ocurrir en el síndrome de WDHA o Verner-Morrison.

Se han encontrado niveles elevados de PP en suero en condiciones de ayunas asociados a tumores productores de PP y tumores endocrinos del páncreas y el tracto gastrointestinal.

Nivel normal de PP en suero humano: <100 pmol/L (nivel obtenido con este procedimiento en pacientes en ayunas).

PRECAUCIONES

Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

Puesto que la normativa varía de un país a otro, es fundamental que la persona responsable del laboratorio esté familiarizada con la normativa local vigente relativa a todos los aspectos de los materiales radiactivos del tipo y cantidad de los utilizados en esta prueba.

Este kit contiene componentes de origen humano. Todos ellos han sido analizados mediante inmunoensayos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, los anticuerpos del HCV y los anticuerpos del HIV-1 y HIV-2, dando todos ellos negativo. De todos modos, se deben observar todas las precauciones recomendadas para manipular cualquier derivado de la sangre.

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

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

- El material radiactivo debe almacenarse en áreas especialmente diseñadas a tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en áreas autorizadas.
- Debe tenerse mucho cuidado a fin de evitar la 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 lavarse después de utilizar materiales radiactivos.
- El trabajo se debe realizar sobre una superficie cubierta de un material absorbente desechable.
- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente y todos los materiales contaminados deben ser eliminados como residuos radiactivos. Las superficies contaminadas deben limpiarse con detergente.

Los reactivos en este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando depósitos de azidas altamente explosivas. Al eliminar los reactivos en el sistema de cañerías, verter siempre abundante agua a chorro para evitar la formación de azidas metálicas. Las tuberías que se sospeche que se han contaminado con estos depósitos explosivos deben limpiarse a fondo con una solución que contenga un 10% de hidróxido de sodio.

COMPOSICIÓN DEL KIT

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

1. Anti-PP (Reactivo A)

Antisuero de conejo enfrentado a PP bovino. Para 100 tubos. Liofilizado en 5 ml de tampón fosfato 0.5M, pH 7.4, 2.5% de albúmina de suero humano y 0,5% de NaN_3 .

Reconstitución en 52 ml de agua destilada.

2. PP I-¹²⁵ (Reactivo B)

Contiene 28 KBq o 0,75 μCi de hPP I¹²⁵ en la fecha de referencia de la actividad. Producido mediante iodación de PP humano sintético. Purificado mediante HPLC y monoiodado.

Actividad específica: 1700-2100 $\mu\text{Ci/nmol}$ (62-77 MBq/nmol).

Liofilizado en 1,25 ml de tampón fosfato de 0,5 M y pH de 7.4, con 2,5% de albúmina de suero humano, 0.5% de NaN_3 . Contiene 0,12 ml de suero de conejo normal.

Reconstituir en 12,5 ml de agua destilada.

3. Doble anticuerpo con polietilenglicol (Reactivo C)

50 ml de antisuero Ig de cabra anticonejo diluido. Diluyente: tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0.25% de albúmina de suero humano y 0,05% de NaN_3 . Contiene 7,5% de polietilenglicol 6000 (p/v).

4. Diluyente de estándar (Reactivo D)

10 ml de suero humano carente de PP, liofilizado. Contiene 500 KIU de aprotinina (Trasylo[®] o equivalente) /ml. Reconstituir en 10 ml de agua destilada. Para la preparación de los estándares de trabajo del PP.

5. Estándar PP de 2000 pmol/L (8370 pg/ml) (Reactivo E)

2.00 ml de estándar PP humano sintético de 2000 pmol/L. Liofilizado en tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano, 0.05% de NaN_3 . Reconstituir en 2.00 ml de agua destilada.

6. Tampón del ensayo (Reactivo F)

5 ml de tampón fosfato 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de NaN_3 .

Para ser utilizado en vez del antisuero en los tubos de prueba de fijación no específica.

7. Controles (Reactivos G-H)

Controles de suero liofilizado con concentración baja (G) y alta (H) de PP.

1 ml de cada control después de la reconstitución. Las concentraciones de PP de los controles figuran en las etiquetas de los viales. Contiene 0,05% de NaN_3 .

REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

Agua destilada

Tubos desechables de poliestireno de 11-13 x 55

Pipetas con puntas desechables: 100 y 500 μl

Pipetas de vidrio: 1, 5 y 10 ml.

Cilindros medidores: 25 ml y 50 ml.

Agitador

Centrífuga refrigerada, con un mínimo de 1700 x g.

Contador de gamma

RECOGIDA DE LA MUESTRA

Antes de la obtención de la muestra los pacientes deben estar en ayunas por lo menos durante 10 horas.

La sangre venosa se recoge en tubos que no contienen aditivos. Se deja que la muestra coagule. El plasma 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 que sea analizado. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Conservar todos los reactivos a 2-8° C antes de la reconstitución y el uso. El agua utilizada en la reconstitución de los reactivos liofilizados debe destilarse dentro de un aparato que sea enteramente de vidrio o bien ser de la pureza correspondiente. Disolver el contenido de los frascos invirtiéndolos con suavidad y evitando que se forme espuma. La estabilidad de los reactivos figura en las etiquetas de los viales. En lo que se refiere a los reactivos liofilizados, la fecha de caducidad es válida para los reactivos no reconstituidos. Los reactivos reconstituidos son estables durante 10 semanas (sin exceder la fecha de caducidad) si se almacenan correctamente.

Reactivo A: Anti-PP

Reconstituir con 52 ml de agua destilada.
Conservar a 2-8° C.

Reactivo B: PP I¹²⁵

Reconstituir con 12,5 ml de agua destilada.
Conservar a - 18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivo C: Doble anticuerpo con PEG

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

Reactivo D: Diluyente estándar

Reconstituir con 10 ml de agua destilada.
Conservar a - 18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivo E: Estándar PP, 2000 pmol/L

Reconstituir con 2.0 ml de agua destilada.
Conservar a - 18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
Para la preparación de los estándares de trabajo del PP, véase el procedimiento del radioinmunoensayo.

Reactivo F: Tampón de ensayo

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

Reactivos G-H: Controles

Reconstituir con 1 ml de agua destilada. Conservar a - 18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

PROCEDIMIENTO DE RADIOINMUNOENSAYO

Reconstituir los reactivos tal y como se especifica. Esperar a que los reactivos se pongan a temperatura ambiente antes de utilizarlos. La precisión es fundamental en todos los pasos que implican pipetear. Todas las pruebas (estándares, controles y muestras) deben hacerse por duplicado.

Un ensayo completo incluye:

Estándares (Tubos St): 7 concentraciones diferentes; 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 pmol/L.

Controles (tubos C).

Muestras (tubos P).

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

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

Para un resumen del procedimiento, véase la tabla 1 de la página 33.

REALIZACIÓN

1. Reconstituir los reactivos siguiendo las instrucciones.
2. Preparar los estándares de trabajo del PP mediante la dilución del estándar PP 2000 pmol/L (Reactivo E) con el diluyente estándar (Reactivo D) de acuerdo con las siguientes indicaciones:

a/ 0,2 ml de estándar de 2000 pmol/L	+ 1,8 ml de diluyente	= 200 pmol/L
b/ 1 ml de estándar de 200 pmol/L	+ 1 ml de diluyente	= 100 pmol/L
c/ 1 ml de estándar de 100 pmol/L	+ 1 ml de diluyente	= 50 pmol/L
d/ 1 ml de estándar de 50 pmol/L	+ 1 ml de diluyente	= 25 pmol/L
e/ 1 ml de estándar de 25 pmol/L	+ 1 ml de diluyente	= 12,5 pmol/L
f/ 1 ml de estándar de 12,5 pmol/L	+ 1 ml de diluyente	= 6,25 pmol/L
g/ Diluyente estándar	= 0 pmol/L.	

Conservar las soluciones estándar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
3. Pipetear 100 µL de los estándares (0-200 pmol/L), muestras y controles en sus respectivos tubos. Pipetear 100 µL del estándar cero en los tubos NSB.
4. Pipetear 500 µL de anti-PP (Reactivo A) en todos los tubos excepto los tubos NSB y TOT.
5. Añadir 500 µL de tampón de ensayo (Reactivo F) a los tubos NSB.
6. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.
7. Pipetear 100 µL de PP I¹²⁵ (Reactivo B) a todos los tubos. Tapar y guardar aparte los tubos TOT.
8. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.
9. Pipetear 500 µL de doble anticuerpo con PEG (Reactivo C) a todos los tubos exceptuando los tubos TOT.
Mezclar este reactivo antes de pipetear.
10. Agitar e incubar durante 30-60 minutos a 2-8° C.
11. Centrifugar durante 15 minutos a +4° C (a 1700 x g como mínimo)
12. Decantar los sobrenadantes inmediatamente después de la centrifugación.
13. Contar la radiactividad de los precipitados utilizando un contador gamma. (tiempo de contaje: 2-4 minutos).

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Restar la media de CPM de los tubos de fijación no específica de la media de CPM de los duplicados de los estándares, controles y muestras.
2. Representando gráficamente las CPM del precipitado, la fracción fijada en CPM o %B/TOT en función de la concentración de los estándares PP se genera una curva estándar. Se muestra un ejemplo de la curva estándar en la página 34.
3. Interpolar las concentraciones de PP de las muestras y los controles de la curva estándar generada.
4. La curva estándar y el cálculo de las concentraciones de las muestras y los controles también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos.

CONTROL DE CALIDAD

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

1. Las concentraciones detectadas en los sueros de control

Los niveles de PP deben estar dentro de los límites que figuran en las etiquetas de los viales.

2. Cuentas totales

Las cuentas totales obtenidas deberían aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficacia de contaje y el deterioro radiactivo. El contenido de PP I-¹²⁵ de este kit dará unas cuentas totales de 10.500 CPM (-5, a +20%) en la fecha de referencia de la actividad (eficacia de contaje = 80%).

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

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

La fijación no específica debería ser inferior al 7%.

5. Forma de la curva estándar

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

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad

La concentración mínima detectable es 3 pmol/L. Esta cifra corresponde a una reducción de la fijación de 2 x SD de la radiactividad fijada en el estándar de concentración cero.

Recuperación

Se alcanzó una recuperación media del 104% (95-113%) cuando se añadieron cantidades conocidas de hPP a suero humano.

Precisión

Variación intra-ensayo

<u>Nivel</u>	<u>Coefficiente de variación (%CV)</u>	<u>N</u>
28,8 pmol/L	2,6	10
108,5 pmol/L	1,8	10

Variación inter-ensayo (variación total)

<u>Nivel</u>	<u>Coefficiente de variación (%CV)</u>	<u>N</u>
38,8 pmol/L	2	10
99,3 pmol/L	3,5	10

Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Péptido</u>	<u>Reacción cruzada</u>
Polipéptido pancreático humano	100 %
Polipéptido pancreático bovino	120 %
Péptido inhibidor gástrico porcino	0,02 %
Colecistocinina 39 porcina	0,02 %
Secretina porcina	0,02 %
Gastrina 34 humana	<0,01 %
Gastrina 17 humana	<0,01 %
Glucagón, humano porcino	0,03 %
Insulina porcina	<0,01 %
ACTH 1-39 porcina	<0,003%
Neuropéptido Y humano	<0,8 %
Péptido YY humano	<1 %

Interferencia

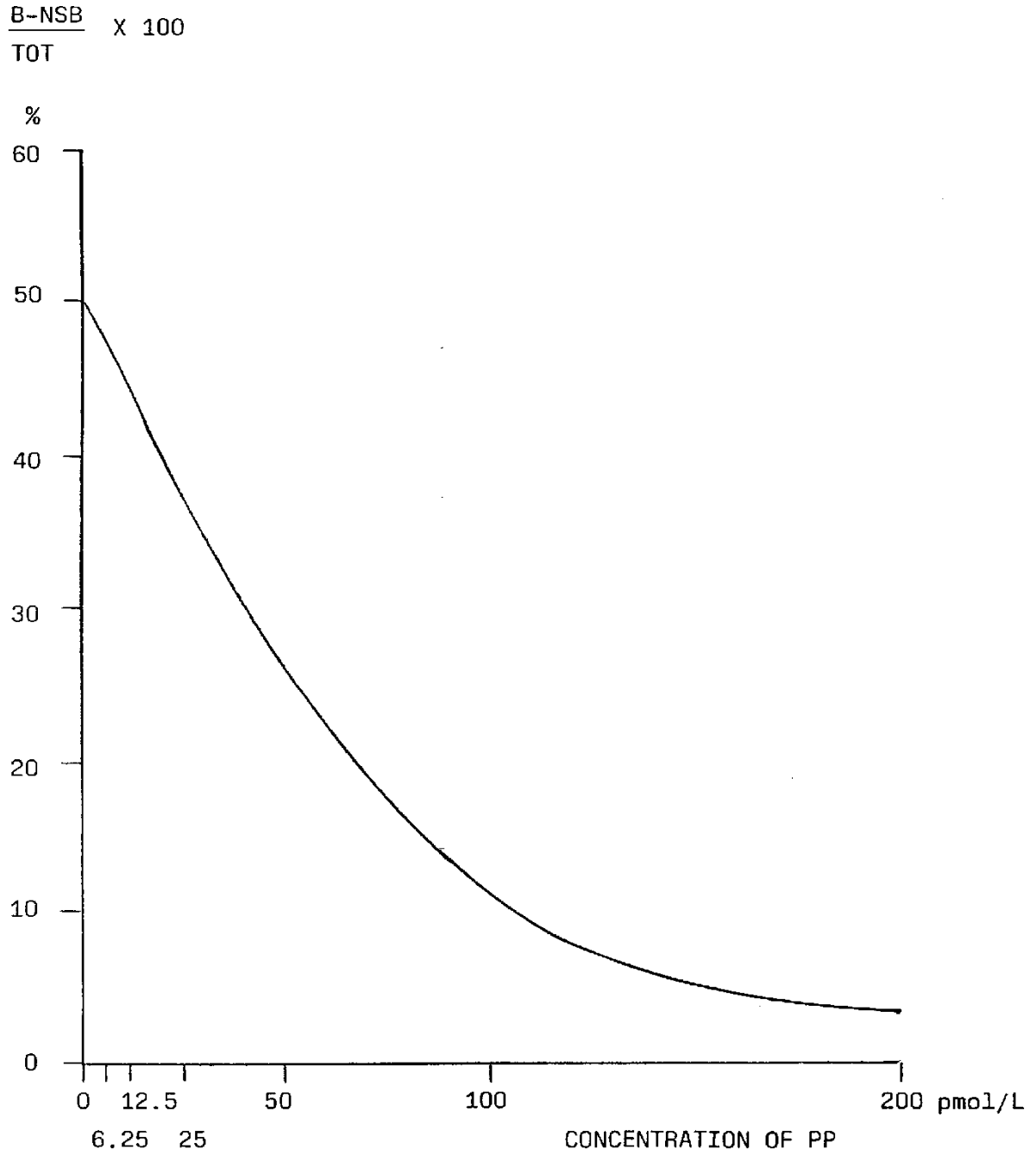
Las muestras que presentan un problema, una hemólisis, una hiperlipemia o que contienen fibrina pueden dar resultados inexactos.

TABLA RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO RIA

Tipo de tubos	No. de tubo	Muestra Estándar o control	Anti-PP (A)	Tampón de Ensayo (F)		PP- ¹²⁵ I (B)		Doble anticuerpo con PEG (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Mezclar	100µL	Mezclar	-	Mezclar con el
NSB	3-4	100µL	-	500	con el	100µL	con el	500 µL	agitador e incubar
Estánd 0	5-6	100µL	500 µL	-	agitador	100µL	agitador	500 µL	durante 30-60
Estánd 6,25	7-8	100µL	500 µL	-	e	100µL	e	500 µL	minutos a
Estánd 12,5	9-10	100µL	500 µL	-	incubar	100µL	incubar	500 µL	2-8° C.
Estánd 25	11-12	100µL	500 µL	-	durante	100µL	durante	500 µL	Centrifugar
Estánd 50	13-14	100µL	500 µL	-	20-24	100µL	20-24	500 µL	durante
Estánd 100	15-16	100µL	500 µL	-	horas a	100µL	horas a	500 µL	15 minutos a
Estánd 200	17-18	100µL	500 µL	-	2-8° C.	100µL	2-8° C.	500 µL	1700 x g a +4° C.
Control (G)	19-20	100µL	500 µL	-		100µL		500 µL	Decantar y
Control (H)	21-22	100µL	500 µL	-		100µL		500 µL	contar la
Muestra 1	23-24	100µL	500 µL	-		100µL		500 µL	radiactividad
Muestra 2	25-26	100µL	500 µL	-		100µL		500 µL	de los
etc.									precipitados.

Tabla 1










EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



REFERENCES / REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.
Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L.
Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of
pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic
polypeptide administration in man. Surgery 104:119-129, 1988.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE. SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER SOM BRUKES PÅ ETIKETTER / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
100	
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-PP. Anti-PP. Anti-PP. Anti PP. Anti PP. Anti-PP.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-PP. PP ¹²⁵ I. PP I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-PP. PP- ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-PP.
REAG	C	DAB		Double antibody-PEG. PEG double anticorps. Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Secondo anticorpo-PEG. Dobbelt antistoff, fast fase. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	DIL	CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente dello standard. Standardspädningsmedel.
REAG	E	CAL	2000	PP standard 2000 pmol/L. Standard de PP, 2000 pmol/L. Estándar PP 2000 pmol/L. PP Standard 2000 pmol/L. PPstandard P 2000pmol/L. PP-standard 2000 pmol/L.
REAG	F	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG	G	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoins, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controllo, livello 1 (normale). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG	H	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoins, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controllo, livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-PP

Pankreatisches Polypeptid Radioimmunoassay
Nur für den professionellen Gebrauch

EINLEITUNG

Pankreatisches Polypeptid (PP) wird als ein amino-terminales Molekül eines Vorläuferpeptids gebildet. Das vom Pankreas sezernierte PP hat 36 Aminosäuren mit einem C-terminalen Tyrosin. PP wird von den F-Zellen der Langerhans' schen Inseln gebildet. Es kommt überwiegend im Pankreas vor, kann aber auch in meßbaren Konzentrationen im ganzen Gastro-Intestinaltrakt auftreten. In Blut existiert PP in mindestens vier verschiedenen Formen: PP 1-36, PP 3-36 und zwei nicht näher charakterisierten Formen.

PP wird während der Nahrungsaufnahme in das Plasma abgegeben. Seine physiologische Rolle besteht in der Hemmung der Magensäure- und Pankreassekretion, sowie eines Einflusses auf die Leber-Glukose-Produktion. Diese Wirkungen von PP werden durch spezielle Rezeptoren ausgelöst. Rezeptor-Bindungsstudien haben gezeigt, daß das C-terminale Tyrosinamid für die biologische Aktivität des Moleküls unbedingt notwendig ist.

TESTPRINZIP

Die Bestimmung von PP erfolgt ohne Extraktion durch einen kompetitiven RIA unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen Rinder-PP. Das in Standards und Proben enthaltene PP konkurriert mit ¹²⁵I-beladenem humanem PP um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am Antikörper. ¹²⁵I-PP bindet sich im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von PP der Standards und Proben an den Antikörper. Das antikörpergebundene ¹²⁵I-PP wird von freiem PP durch Anwendung der Doppel-Antikörper-Technik und Polyethylen-Glykol-Zugabe getrennt. Die Radioaktivität des Präzipitates wird gemessen. Für die Standardisierung wird humanes, synthetisches PP benutzt.

Für den professionellen Gebrauch im medizinisch-diagnostischen Labor.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Die Sekretion von PP wird während der Mahlzeiten insbesondere durch Protein und Fett angeregt. Aber PP wird auch von endokrin aktiven Tumoren des Pankreas' und des Gastro-Intestinal-Traktes produziert. Diese Tumoren bilden oft verschiedene Peptidhormone, z.B. PP-VIP, PP-Glukagon oder PP-Gastrin; es wurden aber auch Tumore beobachtet, die nur PP produzierten. Dies kann beim WDHA- oder beim Verner-Morrison-Syndrom vorkommen.

Erhöhte Serum-PP-Werte nach Nahrungskarenz finden sich bei PP-produzierenden und endokrinen Tumoren des Pankreas und des Gastro-Intestinal-Traktes.

Normalwert von PP in humanem Serum:

<100 pmol/L (nüchtern, bestimmt mit diesem Test).

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in vitro Gebrauch.

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

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

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert. Es sollten geeignete Maßnahmen zum sicheren Umgang mit dem radioaktiven Material ergriffen werden. Nur autorisierte Personen sollten Zugang zu den Reagenzien haben.

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

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

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

KOMPONENTEN DES KITS

Die Reagenzien dieses Testkits sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

1. Anti-PP (Reagenz A)

Kaninchen-Antiserum gegen Rinder-PP. Für 100 Röhrchen. Lyophilisiert in 5,0 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 2,5 % humanes Serumalbumin, 0,5 % Natriumazid. In 52 ml bidest. Wasser rekonstituieren.

2. ¹²⁵I-PP (Reagenz B)

Enthält 0,75 µCi oder 28 KBq ¹²⁵I-hPP am Tag der Markierung. Produziert durch Jodierung von synthetischem, humanem PP. HPLC-gereinigt, monojodiert.

Spezifische Aktivität: 1.700-2.100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol).

Lyophilisiert in 1,25 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 2,5 % humanes Serumalbumin, 0,5 % Natriumazid. Enthält 0,12 ml normales Kaninchenserum.

In 12,5 ml bidest. Wasser rekonstituieren.

3. Doppel-Antikörper-PEG (Reagenz C)

50 ml verdünntes Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig-Antiserum.

Verdünner: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 0,25 % humanem Serumalbumin, und 0,05 % Natriumazid. Enthält 7,5 % w/v Polyethylen-Glykol 6.000.

4. Standard Verdünner (Reagenz D)

10,0 ml PP-freies Humanserum. Lyophilisiert. Enthält 500 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®)/ml. Rekonstitution in 10,0 ml bidest. Wasser. Wird für die Verdünnung des PP-Standards benötigt.

5. PP-Standard, 2 000 pmol/L (8370 pg/mL) (Reagenz E)

2,00 ml, 2000 pmol/L synthetischer, Human-PP-Standard. Lyophilisiert in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,25 % humanes Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid.

Rekonstitution in 2,00 ml bidest. Wasser.

6. Assaypuffer (Reagenz F)

5,0 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,25 % humanes Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid. Zum Gebrauch anstelle von Antiserum in den nicht-spezifischen Teströhrchen (NSB).

7. Kontrollen (Reagenz G-H)

Lyophilisierte Serumkontrollen mit niedriger (G) und hoher (H) PP Konzentration. Jedes Fläschchen mit 1,00 ml bidest. Wasser rekonstituieren. Die genauen PP Konzentrationen sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Enthält 0.05% NaN₃.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Destilliertes Wasser

Einmal-Teströhrchen 11-13 x 55 mm, Polystyrol

Pipetten mit Einmalspitzen, 100 und 500 µl.

Glas-Pipetten, 1,00; 5,00 und 10,00 ml

Meßzylinder: 25 und 50 ml

Vortexmixer

Zentrifuge, geeignet für mindestes 1.700xg (vorzugsweise Kühltzentrifuge)

Gamma-Counter

PROBENGEWINNUNG

Die Patienten sollten 10 Stunden vor Blutentnahme nüchtern sein.

Venenblut wird in Röhrchen ohne Zusätze gesammelt. Die Proben werden bis zur Gerinnung in einem Eisbad gekühlt. Serum wird durch Zentrifugation bei +4° C gewonnen. Das Serum sollte nach der Entnahme innerhalb von 4 Stunden untersucht werden oder bei -18° C bis zur Analyse gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien sollten bei 2 – 8° C gelagert werden. Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen angegeben. Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die ungeöffnete Flasche. Nach Rekonstitution haben die Reagenzien eine Haltbarkeit von 10 Wochen, wenn ordnungsgemäß gelagert.

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

Reagenz A: Anti-PP

Mit 52 ml bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei 2-8° C.

Reagenz B: ¹²⁵I-PP

Mit 12,5 ml bidest. Wasser rekonstituieren, Lagerung bei -18° C oder tiefer.

REAGENZ C: DOPPEL-ANTIKÖRPER-PEG

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

Reagenz D: Standard Verdünner

Mit 10,0 ml bidest. Wasser rekonstituieren, Lagerung aliquotiert bei -18° C oder tiefer.

Reagenz E: PP-Standard, 2 000 pmol/L

Mit 2,0 ml bidest. Wasser rekonstituieren, Lagerung aliquotiert bei -18° C oder tiefer. Die Herstellung der gebrauchsfertigen Standards wird weiter unten beschrieben.

Reagenz F: Assaypuffer

Gebrauchsfertig; bei 2 – 8° C lagern

Reagenz G-H: Kontrollen

Jedes Fläschchen mit 1 ml bidest. Wasser rekonstituieren; Lagerung bei -18° C oder tiefer.

TESTDURCHFÜHRUNG

Rekonstituiere die Reagenzien wie beschrieben. Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Genauigkeit bei allen Pipettierschritten ist wichtig. Alle tests (Standards, Proben und Kontrollen) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Siehe Übersicht Seite 45.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet:

Standards (St-Röhrchen) 7 Konzentrationen (0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 und 200 pmol/L)

Kontrollen (C-Röhrchen)

Proben (P-Röhrchen)

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

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

ARBEITSSCHRITTE

- 1 Die Reagenzien entsprechend der Anweisung rekonstituieren.
- 2 Herstellung der PP-Arbeitsstandards durch Verdünnung des PP-2000 pmol/L-Standards (Reagenz E) mit dem Standard Verdünner (Reagenz D) wie folgt:
 - a) 0,200 ml Standard 2000 pmol/L + 1,800 ml Verdünner = 200 pmol/L
 - b) 1,00 ml Standard 200 pmol/L + 1,00 ml Verdünner = 100 pmol/L
 - c) 1,00 ml Standard 100 pmol/L + 1,00 ml Verdünner = 50 pmol/L
 - d) 1,00 ml Standard 50 pmol/L + 1,00 ml Verdünner = 25 pmol/L
 - e) 1,00 ml Standard 25 pmol/L + 1,00 ml Verdünner = 12,5 pmol/L
 - f) 1,00 ml Standard 12,5 pmol/L + 1,00 ml Verdünner = 6,25 pmol/L
 - g) Standard Verdünner = 0 pmol/L

Die Standardlösungen bei -18 °C lagern, wenn sie wiederverwendet werden sollen.

- 3 100 µl Standards (0 - 200 pmol/L), Proben und Kontrollen in die betreffenden Röhrchen pipettieren und 100 µl des Nullstandards in die NSB-Röhrchen.
- 4 500 µl Anti-PP (Reagenz A) in alle Röhrchen (Ausnahme: NSB- und TOT-Röhrchen) pipettieren.
- 5 500 µl Assaypuffer (Reagenz F) in die NSB-Röhrchen geben.
- 6 Vortexen, und 20-24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
- 7 100 µl ¹²⁵I-PP (Reagenz B) in alle Röhrchen pipettieren; die TOT-Röhrchen verschließen und zur Seite stellen.
- 8 Vortexen, und 20-24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
- 9 500 µl Doppel-Antikörper-PEG (Reagenz C; vor dem Pipettieren gut mischen) in alle Röhrchen (außer TOT) pipettieren.
- 10 Vortexen, und 30-60 Minuten bei 2-8 °C inkubieren.

- 11 Alle Röhrchen 15 Minuten bei +4  C (1.700xg) zentrifugieren.
- 12 Die Überstände sofort nach dem Zentrifugieren dekantieren.
- 13 Messung der Radioaktivität des Präzipitates jedes Röhrchens 2 - 4 Minuten im Gamma-Counter.

TESTAUSWERTUNG

1. Die mittleren Counts/Minute (CPM) der unspezifischen Bindung (NSB) von den mittleren CPMs der Standard-, Kontrollen- und Patientenproben subtrahieren.
2. Die CPMs der Proben, Kontrollen und Standards durch die CPM der Totalaktivität teilen und das Ergebnis mit 100 multiplizieren (= %B/TOT).
3. Erstellen einer Standardkurve durch Auftragen der % B/TOT der Standards (y-Achse, linear) gegen ihre Konzentrationen (x-Achse, logarithmisch) auf semilogarithmischem Papier.
4. Die PP-Konzentrationen der Proben und der Kontrollen können direkt aus dieser Standardkurve abgelesen werden.
5. Steht ein entsprechendes Computerprogramm zur Verfügung, so können die Erstellung der Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen in Proben und Kontrollen durch ein entsprechendes Computerprogramm (logit-log Regression, linear oder cubic spline) durchgeführt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

- a. Die wiedergefundenen Konzentrationen der Kontrollen sollten innerhalb der auf den Etiketten angegebenen Werten liegen.
- b. Total Counts
Die gefundenen Counts sollten anhand der erwarteten CPM aufgrund des Wirkungsgrads des Counters und des radioaktiven Zerfalls abgeschätzt werden. Der Gehalt an ¹²⁵I-PP dieses Kits beträgt ca. 10.500 CPM (-5 %, +20 %) am Tag der Markierung (Wirkungsgrad des Counters = 80 %).
- c. Maximale Bindung (Bo/TOT)
Für jeden Assay wird die gebundene Radioaktivität des Nullstandards (Bo/TOTx100) berechnet.
- d. Unspezifische Bindung (NSB/TOT)
Für jeden Assay wird die unspezifische Bindung in Prozent (NSB/TOTx100) berechnet. Die NSB/TOTx100 beläuft sich auf weniger als 7 %.
- e. Steigung der Standardkurve
Als Marker für die Reproduzierbarkeit können die Punkte bei 80, 50 und 20 % der Standardkurve von Testlauf zu Testlauf verwendet werden.

TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze, definiert als die zweifache Standardabweichung des Nullstandards, beträgt ca. 3 pmol/L (bezogen auf die Standardkurve).

Richtigkeit

Eine mittlere Wiederfindung von 104% (95-113%) wurde erreicht, wenn PP-Konzentrationen zu normalem Serum gespikt wurden.

Präzision

Intra assay

Konzentration	Variationskoeffizient (VK %)	N
28.8 pmol/L	2.6	10
108.5 pmol/L	1.8	10

Inter assay (Gesamt-Variation)

Konzentration	Variationskoeffizient (VK %)	N
38.8 pmol/L	2.0	10
99.3 pmol/L	3.5	10

Spezifität

Folgende Kreuzreaktionen wurden gefunden:

Peptid	Kreuzreaktivität (%)
Pankreas-Polypeptid, human	100
Pankreas-Polypeptid, Rind	120
Peptide YY, human	< 1,0
Neuropeptide Y, human	< 0,8
"Gastric Inhibitory"-Peptid, Schwein	0,02
Cholecystokinin 39, Schwein	0,02
Sekretin, Schwein	0,02
Gastrin 34, human	< 0,01
Gastrin 17, human	< 0,01
Glukagon, human / Schwein	0,03
Insulin, Schwein	< 0,01
ACTH 1-39, Schwein	< 0,003

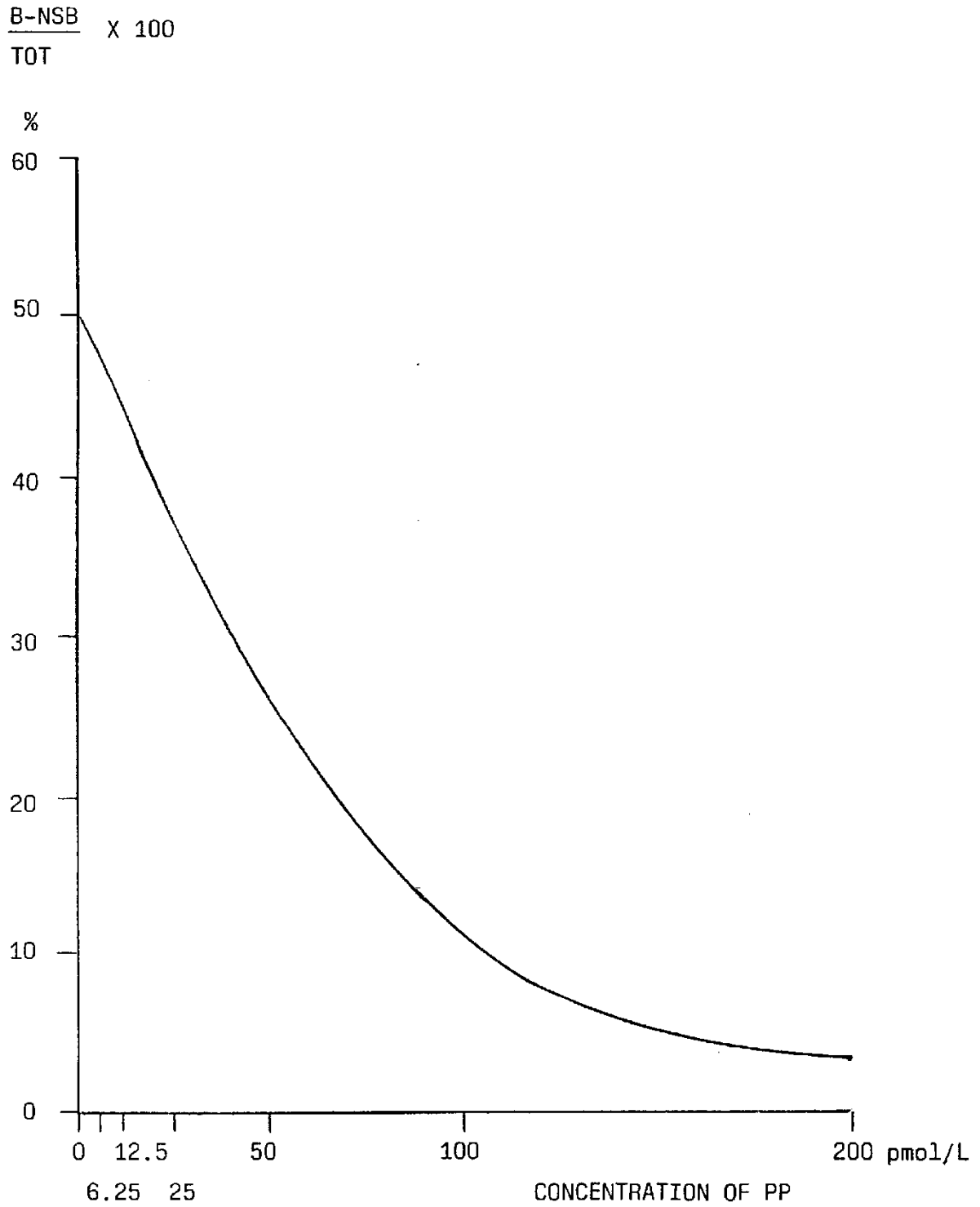
Interferenz

Untersuchungsproben, die getrübt, hämolytisch oder lipämisch sind oder Fibrin enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

ASSAY SCHEMA

Röhrchen	Röhrchen Nr.	Standard Probe oder Kontrolle	Anti-PP (A)	Assay - Puffer (F)		¹²⁵ I-PP (B)		Doppel-Antikörper Fest-phase (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexen und für 20-24 h bei 2-8°C inkubieren	100 µL	Vortexen und für 20-24 h bei 2-8°C inkubieren	-	Vortexen und für 30-60 min bei 2-8°C inkubieren. 15 min bei 1700 x g und +4° C zentrifugieren. Dekantieren und Radioaktivität der Pellets messen.
NSB	3-4	100 µL	-	500		100 µL		500 µL	
Stand 0	5-6	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 6.25	7-8	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 12.5	9-10	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 25	11-12	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 50	13-14	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 100	15-16	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 200	17-18	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Kontrolle (G)	19-20	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Kontrolle (H)	21-22	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Probe 1	23-24	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Probe 2	25-26	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
etc.									










EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



REFERENCES / REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.
Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L.
Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of
pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic
polypeptide administration in man. Surgery 104:119-129, 1988.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE. SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER SOM BRUKES PÅ ETIKETTER / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-PP. Anti-PP. Anti-PP. Anti PP. Anti PP. Anti-PP.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-PP. PP ¹²⁵ I. PP I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-PP. PP- ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-PP.
REAG	C	DAB		Double antibody-PEG. PEG double anticorps. Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Secondo anticorpo-PEG. Dobbelt antistoff, fast fase. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	DIL	CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente dello standard. Standardspädningsmedel.
REAG	E	CAL	2000	PP standard 2000 pmol/L. Standard de PP, 2000 pmol/L. Estándar PP 2000 pmol/L. PP Standard 2000 pmol/L. PPstandard P 2000pmol/L. PP-standard 2000 pmol/L.
REAG	F	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG	G	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoins, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controllo, livello 1 (normale). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG	H	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoins, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controllo, livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-PP

Pancreatic Polypeptide radioimmunoassay
Solo per uso professionale

INTRODUZIONE

Il Polipeptide Pancreatico (PP) è sintetizzato a partire da un peptide precursore del quale è il frammento amino-terminale; il polipeptide isolato dal pancreas è costituito da 36 amino acidi con la tirosina in posizione C-terminale legata ad un gruppo amidico. Il Polipeptide Pancreatico è secreto dalle cellule F delle isole di Langerhans, viene identificato quasi esclusivamente nel pancreas anche se è stato rinvenuto in numerose localizzazioni del tratto gastrointestinale. Il Polipeptide Pancreatico circola nel plasma in almeno 4 forme differenti: PP 1-36, PP 3-36 e in 2 forme non identificate.

Il Polipeptide Pancreatico è liberato nel plasma in seguito allo stimolo del pasto. Il suo ruolo fisiologico comprende l'inibizione dello stimolo della secrezione esocrina di stomaco e pancreas e l'aumento della produzione epatica di glucosio normalmente inibita dall'insulina. Queste azioni sono mediate dal legame di recettori specifici. Studi di binding recettoriale hanno dimostrato che la presenza del gruppo amidico sulla tirosina C-terminale è necessaria perché il Polipeptide Pancreatico eserciti la sua azione biologica.

PRINCIPIO DEL METODO

I reattivi contenuti nel kit permettono la determinazione quantitativa del Polipeptide Pancreatico (PP) nel siero umano.

Il dosaggio del PP è un metodo radioimmunologico competitivo che utilizza un anticorpo diretto contro il PP bovino. Una quantità definita di PP marcato con ¹²⁵I compete con il PP presente in standard e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo specifico; il marcato viene legato in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di PP in campioni e standard. Al termine dell'incubazione, il marcato legato all'anticorpo viene precipitato con l'aggiunta di un secondo anticorpo e glicole polietilenico. Le provette vengono quindi centrifugate, decantate e contate con un contatore gamma; la concentrazione di PP nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva standard. Lo standard utilizzato nel kit è il PP umano sintetico. Per uso professionale in laboratorio.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

La secrezione di Polipeptide Pancreatico è stimolata dal pasto e specialmente dalle proteine e dai lipidi in esso contenuti. Il Polipeptide Pancreatico è anche prodotta da tumori del pancreas e del tratto gastrointestinale. Questi tumori producono numerosi ormoni polipeptidici con le combinazioni PP-VIP, PP-glucagone o PP-gastrina; alcuni tumori secernono solo PP, tumori presenti nella sindrome WDHA o sindrome di Verner-Morrison.

Valori elevati a digiuno di Polipeptide Pancreatico si trovano in tumori PP-secernenti e in tumori endocrini del pancreas e del tratto gastro-intestinale.

Valori normali di PP nel siero umano: <100 pmol/L (livelli a digiuno ottenuti con questo metodo).

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro.

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

Alcuni reattivi presenti nel kit sono di origine umana e si sono rivelati negativi per HIV1 e HIV2, HBV e HCV. Questi reattivi devono essere manipolati come in grado di trasmettere malattie infettive. Manipolare tutti i derivati da sangue umano come potenziali fonti di infezioni.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti. E' importante che il responsabile del laboratorio si prenda carico del controllo delle procedure che riguardano la manipolazione di prodotti radioattivi, secondo le normative vigenti nel paese. Solo il personale autorizzato può avere accesso a questi reattivi.

Nella manipolazione dei prodotti radioattivi devono essere adottate le seguenti precauzioni:

- Il materiale radioattivo deve essere conservato in locali appositamente designati, non accessibili al personale non autorizzato.
- La manipolazione dei prodotti radioattivi deve essere effettuata solo in locali autorizzati allo scopo.
- Prestare la massima attenzione a non contaminare indumenti e a non ingerire o versare sulla cute materiale radioattivo. Non pipettare soluzioni radioattive con pipette a bocca.
- Non bere, mangiare o fumare nei locali destinati alla manipolazione o alla conservazione di sostanze radioattive.
- Usare sempre guanti monouso e lavarsi accuratamente le mani dopo aver manipolato sostanze radioattive.
- Le superfici di lavoro devono essere sempre coperte da materiale assorbente monouso.
- Il materiale radioattivo eventualmente disperso nell'ambiente di lavoro deve essere immediatamente asportato con carta assorbente che deve poi essere eliminata nei contenitori per rifiuti radioattivi solidi. Le superfici interessate devono essere lavate con un liquido decontaminante adeguato.
- Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature eventualmente interessate da questi depositi esplosivi devono essere lavate con una soluzione di idrossido di sodio 10 %.

CONTENUTO DEL KIT

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

1. Anti PP (Reattivo A)

Anticorpo anti PP da coniglio preparato contro PP bovino. Per 100 determinazioni. L'anticorpo è liofilizzato in 5 mL di tampone fosfato 0.5 M, pH 7.4, albumina umana 2.5 %, sodio azide 0.5%. Ricostituire con 52 mL di acqua distillata.

2. PP- ¹²⁵I – (Reattivo B)

Il flacone contiene hPP marcato con ¹²⁵I, con attività totale di 28 kBq (0,75 µCi), prodotta per iodinazione di Polipeptide Pancreatico umano sintetico, purificato con HPLC, monoiodinato. Attività specifica 62-77 Mbq/nmol (1700-2100 µCi/nmol). Il marcato è liofilizzato in 1.25 mL di tampone fosfato 0.5 M, pH 7.4, albumina umana 2.5 % e NaN₃ 0.5%. Contiene 0.12 mL di siero normale di coniglio. Ricostituire con 12.5 mL di acqua distillata.

3. Secondo anticorpo-PEG (Reattivo C)

Anticorpo anti IgG di coniglio da capra, 50 mL, pronto per l'uso, in tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4, albumina umana 0.25% e sodio azide 0, 05%. Contiene PEG 6000 al 7.5% p/v. Colore: rosso.

4. Diluente degli standard (Reattivo D)

Il flacone contiene 10 mL di plasma umano privo di PP, liofilizzato. Contiene 500 KIU/mL di aprotinina (Trasylol® o equivalente) e sodio azide 0, 05%. Ricostituire con 10 mL di acqua distillata. Per la preparazione della curva standard.

5. Standard di PP, 2 000 pmol/L (8370 pg/mL) (Reattivo E)

PP umano sintetico, 2000 pmol/L, liofilizzato in 2.0 mL di tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4, albumina umana 0.25% e sodio azide 0, 05%. plasma umano. Ricostituire con 2.0 mL di acqua distillata.

6. Tampone (Reattivo F)

Il flacone contiene 5 mL di tampone fosfato 0.05M, pH 7.4, albumina umana 0.25% e sodio azide 0.05%. Il diluente va utilizzato al posto dell'anticorpo per la determinazione del legame non specifico.

7. Controlli (Reattivi G-H)

I controlli, 1 mL dopo ricostituzione, contengono concentrazioni normali (G) ed elevate di PP (H) in siero. Le concentrazioni di PP sono riportate sulle etichette dei rispettivi flaconi. Contengono sodio azide 0, 05%.

MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

Acqua distillata.

Provette in polistirene o polipropilene 11-13 x 55 mm

Micropipette di precisione con puntali monouso (100 e 500 µL)

Pipette da 1, 5 e 10 mL

Cilindri da 25 e 50 mL.

Agitatore tipo Vortex

Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)

Sistema di aspirazione o decantazione

Contatore gamma programmato per leggere ¹²⁵I.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I pazienti devono essere a digiuno da 10 ore prima del prelievo. Il campione di sangue deve essere raccolto in provette senza anticoagulante. Lasciare coagulare il campione. 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.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

Conservare i reattivi prima della ricostituzione a 2-8°C. Ricostituire i reattivi con acqua bidistillata. Risospendere i reattivi ricostituiti per inversione evitando la formazione di schiuma. 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 10 settimane, ma non oltre la data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Reattivo A: Anticorpo anti-PP

Ricostituire con 52 mL di acqua bidistillata.
Conservare a 2-8°C.

Reattivo B: PP-¹²⁵I

Ricostituire con 12.5 mL di acqua bidistillata subito prima dell'uso.
Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.

Reattivo C: Secondo anticorpo – PEG.

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

Reattivo D: Diluente degli standard

Ricostituire con 10 mL di acqua bidistillata.
Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.

Reattivo E: Standard PP 2000 pmol/L

Ricostituire con 2.0 mL di acqua bidistillata.
Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.
Per la preparazione della curva standard fare riferimento a quanto riportato nel metodo di dosaggio.

Reattivo F: Tampone

Pronto per l'uso.
Conservare a 2-8°C.

Reattivi G-H: Controlli

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

METODO DEL DOSAGGIO

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

Un dosaggio completo comprende:

Standard (provette St): a sette livelli: 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50, 100 e 200 pmol/L.

Controlli (provette C).

Campioni (provette S)

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

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

Il metodo è riportato in dettaglio nelle pagine successive.

METODO

1. Ricostituire i reattivi secondo le istruzioni.
2. Preparare le soluzioni di lavoro degli standard a partire dallo standard 2000 pmol/L (reattivo E) con il diluente degli standard (reattivo D), secondo il seguente schema:
 - a. 0.200 mL standard 2000 pmol/L + 1.800 mL di diluente = 200 pmol/L
 - b. 1.00 mL standard 200 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 100 pmol/L
 - c. 1.00 mL standard 100 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 50 pmol/L
 - d. 1.00 mL standard 50 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 25 pmol/L
 - e. 1.00 mL standard 25 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 12.5 pmol/L
 - f. 1.00 mL standard 12.5 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 6.25 pmol/L
 - g. Diluente degli standard = 0 pmol/L

Conservare le soluzioni avanzate a -18°C o a temperature inferiori.
3. Pipettare 100 μL di standard (0-200 pmol/L), campioni e controlli nelle rispettive provette. Pipettare 100 μL di standard zero nelle provette degli NSB.
4. Aggiungere 500 μL di anticorpo anti PP (reattivo A) in tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale e per gli NSB.
5. Aggiungere 500 μL di diluente (reattivo F) nelle provette per gli NSB. Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a $2-8^{\circ}\text{C}$.
7. Aggiungere 100 μL di $\text{PP-}^{125}\text{I}$ (reattivo B) in tutte le provette. Mettere da parte le provette per l'attività totale e tapparle.
8. Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a $2-8^{\circ}\text{C}$.
9. Aggiungere 500 μL di secondo anticorpo – PEG (reattivo C) a tutte le provette tranne quelle per l'attività totale (Agitare con cura il reattivo prima di dispensarlo).
10. Agitare su vortex e incubare 30-60 min. a $2-8^{\circ}\text{C}$.
11. Centrifugare le provette 15 min. a 4°C (1700 x g).
12. Eliminare immediatamente il surnatante per decantazione.
13. Misurare la radioattività del precipitato, frazione legata, di tutte le provette per 2-4 minuti in un contatore gamma.

CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre la media delle cpm degli NSB dalle cpm dei replicati di standard, controlli e campioni.
2. Generare la curva standard riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli standard. Un esempio di curva standard è riportato nelle pagine successive.
3. Le concentrazioni di PP in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione delle rispettive cpm della frazione legata B o del rapporto di competizione B/T% sulla curva standard.
4. Se si usa un sistema di elaborazione computerizzato, usare il metodo di interpolazione Spline.

CONTROLLO DI QUALITA'

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

1. Concentrazione trovata dei controlli

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

2. Attività totale

Le cpm ottenute devono essere approssimativamente quelle attese dopo correzione per l'efficienza del contatore e per il decadimento del radioattivo. La radioattività misurata per 500 μL di PP- ^{125}I deve essere compresa tra 10500 cpm (-5%+ 20 %), alla data riportata come riferimento (efficienza del contatore 80%).

3. Capacità legante (Bo/TOT)

Per ogni dosaggio calcolare la % di radioattività legata nello standard zero: $\frac{B_0}{TOT} \times 100\%$.

4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Il legame non specifico, rapporto tra le cpm degli NSB e le cpm dell'attività totale

$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ deve essere inferiore al 7%.

5. Pendenza della curva

Calcolare ogni volta le intercette ai rapporti di competizione (B/ Bo) 80, 50, 20% per valutare la riproducibilità della curva tra i diversi saggi.

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Sensibilità

La sensibilità, calcolata come dose calcolata dalla curva standard della media – 2 DS delle cpm dello standard zero è risultata essere 3 pmol/L.

Precisione

Variazione intra saggio

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
28.8 pmol/L	2.6%	10
108.5 pmol/L	1.8%	10

Variazione inter saggio (variazione totale)

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
33.8 pmol/L	2.0%	10
99.3 pmol/L	3.5%	10

Accuratezza

Aggiungendo quantità note di hPP ad un siero umano è stato trovato un recupero medio del 104% (95-113%).

Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

<u>Peptide</u>	<u>Cross-reazione</u>
Polipeptide Pancreatico, umano	100.0 %
Polipeptide Pancreatico, bovino	120.0 %
Gastric inhibitory peptide, porcino	0.02 %
Colecostokinina 39, porcina	0.02 %
Secretina, porcina	0.02 %
Gastrina 34, umana	<0.01 %
Gastrina 17, umana	<0.01 %
Glucagone, umano, porcino	0.03 %
Insulina, porcine	<0.01 %
ACTH 1-39, porcina	<0.003%
Neuropeptide Y, umano	<0.8 %
Peptide YY, umano	<1.0 %

Interferenza

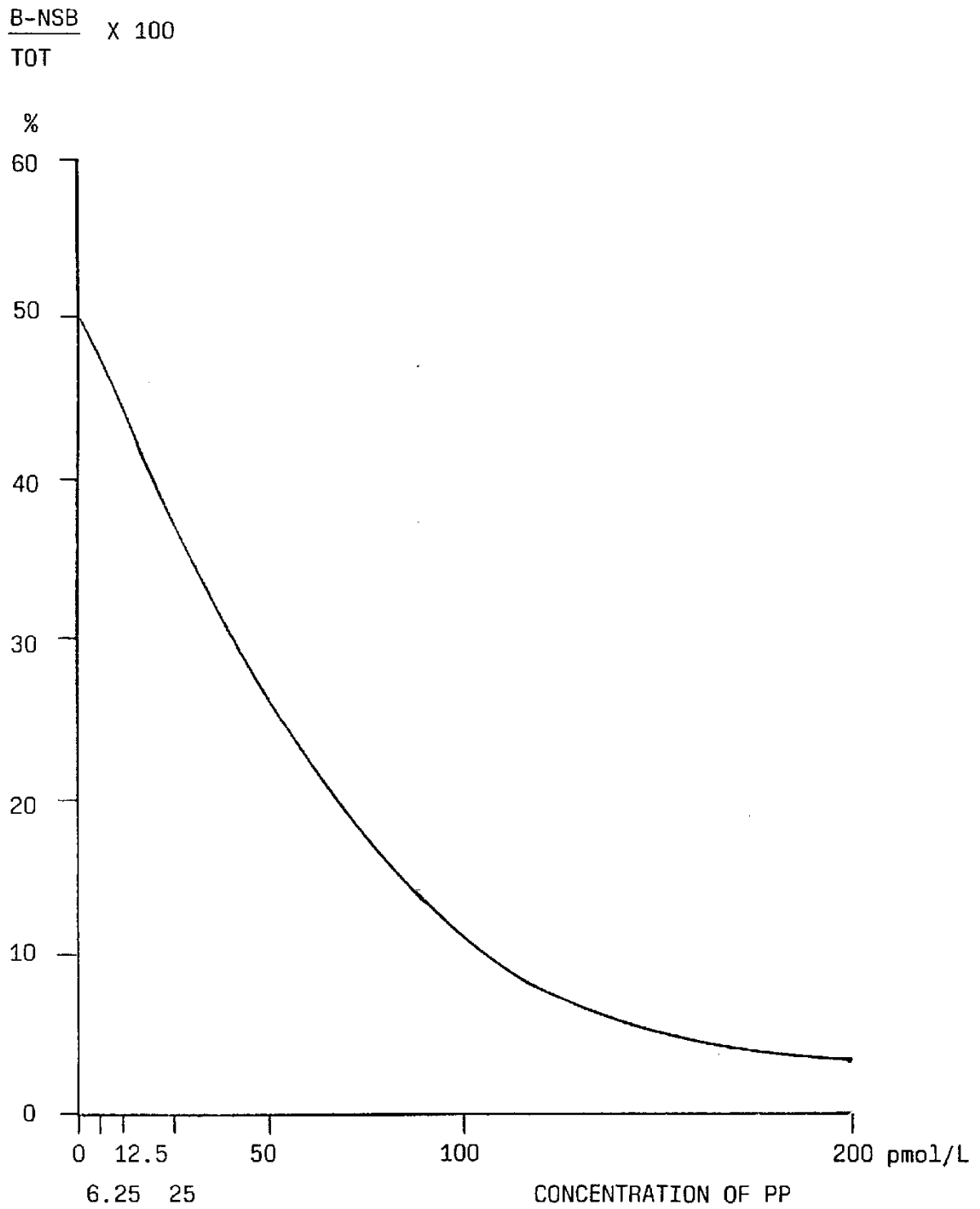
I campioni che presentano un disturbo, un' emolisi, un'iperlipemia o che contengono fibrina possono fornire risultati inesatti.

SCHEMA DEL DOSAGGIO RIA

Provetta	Numero	Standard campioni o controlli	Anticorpo anti PP	Tampone		Marcato ^{125}I PP I		Secondo anticorpo + PEG	
TOT	1-2	-	-	-	Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a 2-8°C.	100 µL	Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a 2-8°C.	-	Agitare su vortex e incubare 30-60 min a 2-8°C. Centrifugare 15 min a 1700 xg a 4°C. Decantare o aspirare il surnatante e contare la radioattività del precipitato
NSB	3-4	100 µL	-	500		100 µL		500 µL	
Stand 0	5-6	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 6.25	7-8	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 12.5	9-10	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 25	11-12	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 50	13-14	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 100	15-16	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Stand 200	17-18	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Controllo (G)	19-20	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Controllo (H)	21-22	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Campione 1	23-24	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
Campione 2 etc.	25-26	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	

Tabella 1










EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



REFERENCES / REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.
Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L.
Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunnicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of
pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunnicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic
polypeptide administration in man. Surgery 104:119-129, 1988.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE. SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER SOM BRUKES PÅ ETIKETTER / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
100	
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-PP. Anti-PP. Anti-PP. Anti PP. Anti PP. Anti-PP.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-PP. PP ¹²⁵ I. PP I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-PP. PP- ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-PP.
REAG	C	DAB		Double antibody-PEG. PEG double anticorps. Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Secondo anticorpo-PEG. Dobbelt antistoff, fast fase. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	DIL	CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente dello standard. Standardspädningsmedel.
REAG	E	CAL	2000	PP standard 2000 pmol/L. Standard de PP, 2000 pmol/L. Estándar PP 2000 pmol/L. PP Standard 2000 pmol/L. PPstandard P 2000pmol/L. PP-standard 2000 pmol/L.
REAG	F	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG	G	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoins, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controllo, livello 1 (normale). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG	H	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoins, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controllo, livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-PP

Pancreatic Polypeptide radioimmunoassay
Endast för professionell användning

INTRODUKTION

Pankreatisk polypeptid (PP) syntetiseras som en aminoterminal del av en prekursorpeptid. PP isolerad från pankreas har 36 aminosyrarester med en amidrad C-terminal tyrosin. PP utsöndras av F-celler i de Langerhanska öarna. PP är nästan enbart lokaliserat i pankreas även om detekterbara nivåer i matsmältningskanalen har rapporterats. PP i human plasma har rapporterats att förekomma i minst fyra olika former: PP1-36, PP3-36 och två oidentifierade former.

PP frisätts i plasma genom stimulation av måltid. PPs fysiologiska roll inkluderar inhibition av stimulerad mag- och pankreatisk exokrin sekretion samt förstärkning av insulininhibitionen av glukosproduktion i levern. Dessa funktioner hos PP förmedlas genom specifika receptorer. Receptorbindningsstudier har visat att den intakta C-terminala tyrosinamiden är nödvändig för den biologiska aktiviteten.

KLINISKA ÖVERVÄGANDEN

Sekretionen av PP stimuleras av måltid och speciellt av protein och fett. PP produceras också av endokrina aktiva tumörer i pankreas och mag-tarmkanalen. Dessa tumörer producerar ofta flera peptidhormoner i kombinationen PP-VIP, PP-glukagon eller PP-gastrin. Tumörer med enbart PP-sekretion har rapporterats. Dessa tumörer kan förekomma vid WDHA eller Verner-Morrisonsyndrom.

Förhöjda fastenivåer av PP i serum har detekterats vid förekomst av PP-producerande tumörer och endokrina tumörer i pankreas och i mag-tarmkanalen.

Normala nivåer av PP i humant serum: <100 pmol/L (fastenivå erhållen med denna metod).

PRINCIPERNA

Dessa reagens är avsedda för bestämning av PP i serum hos människa. PP i serum analyseras utan extraktion genom kompetitiv radioimmunoanalys med hjälp av antiserum från kanin mot bovint PP. PP i standarder och analysprov konkurrerar med ¹²⁵I-märkt humant PP om bindning till antikropparna. ¹²⁵I-PP binder till antikropparna i omvänd proportion till mängden PP i standarder och analysprov. Antikroppsbundet ¹²⁵I-PP separeras från obundet PP med hjälp av dubbelantikropp-polyetylenglykolfällning. Radioaktiviteten i fällningen mäts. För standardisering används humant, syntetiskt PP. Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

VARNING

Endast för in vitro diagnostik

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

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

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

Följande säkerhetsåtgärder ska iakttas vid handhavande av radioaktivt material:

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

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

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

REAGENSATSSENS INNEHÅLL

De reagens som medföljer varje sats räcker till 100 rör.

1. Anti-PP (reagens A)

Antiserum mot bovint PP erhållet från kanin. Till 100 rör. Frystorkat i 5.0 mL 0.5 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 2.5% humant serumalbumin och 0.5% natriumazid. Rekonstitueras med 52 mL destillerat vatten.

2. ¹²⁵I-märkt PP (reagens B)

Innehåller per referensdatum 28 KBq eller 0.75 µCi av ¹²⁵I-märkt PP. Producerat genom jodering av syntetiskt humant PP. Renat på HPLC, monojoderat. Specifik aktivitet: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Frystorkat i 1.25 mL 0.5 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 2.5% humant serumalbumin och 0.5% natriumazid. Innehåller 0.12 mL normalt kaninserum. Rekonstitueras med 12.5 mL destillerat vatten.

3. Dubbelantikropp/PEG (reagens C)

50 mL utspätt antiserum från get mot kanin-Ig. Spädningsmedel: 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid. Innehåller 7.5% (m/v) polyetenglykol 6000.

4. Standardspädningsmedel (reagens D)

10.0 mL PP-fritt humant serum, frystorkat. Innehåller 500 KIU aprotinin (Trasylo® eller motsvarande) per mL. Rekonstitueras med 10.0 mL destillerat vatten. För beredning av PP-arbetsstandarden.

5. PP-standard 2 000 pmol/L (8370 pg/mL) (reagens E)

2.00 mL med 2000 pmol/L av syntetiskt humant PP. Frystorkat i 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid. Rekonstitueras med 2.00 mL destillerat vatten.

6. Spädningsbuffert (reagens F)

5.0 mL 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid. Används i stället för antiserum i rör för ospecifik bindning.

7. Kontroller (reagens G-H)

Frystorkat serum med låg och hög koncentration av PP. 1.00 mL av respektive kontroll efter rekonstituering. PP-koncentrationen i kontrollerna indikeras på ampullernas etiketter. Innehåller 0.05% natriumazid.

REAGENS OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

Destillerat vatten

Engångsprovror av polystyren, 11-13x55 mm.

Pipetter med engångsspetsar: 100 och 500 µL

Pipetter (glas): 1.00, 5.00 och 10.00 mL

Mätglas: 25 mL och 50 mL

Vortexblandare

Centrifug, kyld, för minst 1700 x g

Gammaräknare

PROVTAGNING

Patienterna ska ha fastat minst tio timmar före provtagningen.

Venöst blod uppsamlas i rör utan tillsatser. Provet får koagulera. Serum separeras genom centrifugering vid +4° C. Serum bör frysas inom 4 timmar och förvaras vid -18° C eller lägre fram till analystillfället. Upprepad frysning-upptining bör undvikas.

BEREDNING OCH FÖRVARING AV REAGENS

Alla reagens skall förvaras vid 2-8° C fram till rekonstituering och användning. Det vatten som används för rekonstituering av frystorkade reagens skall vara destillerat i en glasapparat eller ha motsvarande renhet. Lös innehållet i ampullen genom att försiktigt vända på ampullen. Undvik skumbildning. Reagensens stabilitet indikeras på ampullernas etiketter. För frystorkade reagens gäller utgångsdatum fram till rekonstituering. Rekonstituerade reagens är stabila i 10 veckor om de lagras på rätt sätt (dock ej längre än till utgångsdatum).

Reagens A: Anti- PP

Rekonstitueras med 52 mL destillerat vatten.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens B: ¹²⁵I-PP

Rekonstitueras med 12.5 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet skall användas flera gånger.

Reagens C: dubbelantikropp/PEG

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

Reagens D: Standardspädningsmedel

Rekonstitueras med 10.0 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet skall användas flera gånger.

Reagens E: PP-standard 2 000 pmol/L

Rekonstitueras med 2.00 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet skall användas flera gånger.
För beredning av standardprov med PP, se beskrivning av radioimmunoanalysen.

reagens F: Spädningsbuffert

Bruksfärdig.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens G-H: Kontroller

Rekonstitueras med 1.00 mL destillerat vatten. Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet skall användas flera gånger.

RADIOIMMUNOANALYS

Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna. Reagensen bör få anta rumstemperatur innan de används. Noggrannhet vid all pipettering har avgörande betydelse. Alla analyser (standarder, kontrollprover, analysprover) skall dubbleras.

En fullständig analys omfattar:

Standardprov (St-rör): 7 olika koncentrationer: 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 samt 200 pmol/L.

Kontrollprov (C-rör):

Analysprov (P-rör):

Rör för bestämning av **ospecifik bindning (OSB-rör).**

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

En översikt återfinns på sidan 69.

GENOMFÖRANDE

1. Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna.
2. Bered arbetsstandarder av PP genom spädning av standarden som innehåller 2000 pmol/L (reagens E) med standardspädmedel (reagens D) enligt följande:
 - a/ 0.200 mL standard 2000 pmol/L + 1.800 mL spädmedel = 200 pmol/L
 - b/ 1.00 mL standard 200 pmol/L + 1.00 mL spädmedel = 100 pmol/L
 - c/ 1.00 mL standard 100 pmol/L + 1.00 mL spädmedel = 50 pmol/L
 - d/ 1.00 mL standard 50 pmol/L + 1.00 mL spädmedel = 25 pmol/L
 - e/ 1.00 mL standard 25 pmol/L + 1.00 mL spädmedel = 12.5 pmol/L
 - f/ 1.00 mL standard 12.5 pmol/L + 1.00 mL spädmedel = 6.25 pmol/L
 - g/ standardspädmedel = 0 pmol/L

Förvara standardproven vid -18° C eller lägre om innehållet skall användas flera gånger.
3. Pipettera 100 µL av standarderna (0-200 pmol/L), kontrollproven och analysproven i respektive provrör. Pipettera 100 µL nollstandard i OSB-rören.
4. Pipettera 500 µL av anti-PP (reagens A) i samtliga rör **utom** OSB- och TOT-rören.
5. Pipettera 500 µL spädningsbuffert (reagens F) i OSB-rören.
6. Vortexblanda och inkubera i 20-24 timmar vid 2-8° C.
7. Pipettera 100 µL ¹²⁵I-PP (reagens B) i samtliga rör. Sätt lock på TOT-rören och ta undan dem.
8. Vortexblanda och inkubera i 20-24 timmar vid 2-8° C.
9. Tillsätt 500 µL dubbelantikropp-PEG (reagens C) till alla rör utom TOT-rören. Rör om detta reagens före pipettering.
10. Vortexblanda och inkubera i 30-60 minuter vid 2-8° C.
11. Centrifugera rören i 15 minuter vid +4° C (minst 1700 x g).
12. Dekantera supernatanten omedelbart efter centrifugeringen.
13. Mät radioaktiviteten i precipitatet i gammaraäknare, (mättid: 2-4 minuter).

BERÄKNING AV RESULTATEN

1. Subtrahera medelvärdet av OSB-rörens CPM från standardernas, kontrollernas och provens CPM.
2. Skapa en standardkurva genom att avsätta fraktionen bunden aktivitet (CPM eller % B/TOT) mot koncentrationen i PP-standarderna. På sidan 70 avbildas ett exempel på en standardkurva.
3. Interpolera fram PP-koncentrationerna i kontrollproven och analysproven utgående från standardkurvan.
4. Bildandet av standardkurvan och beräkningen av koncentrationer i kontrollerna och analysproven kan även göras med datorstöd.

KVALITETKONTROLL

För att säkerställa kvaliteten på utförd analys, ska följande punkter kontrolleras:

- 1. Uppmätt koncentration i kontrollproverna**
PP-nivåerna ska vara inom de gränser som anges på vialernas etiketter.
- 2. Total counts**
De erhållna värdena bör ligga nära förväntade CPM efter korrigerig för räknarens verkningsgrad och isotopens sönderfall. Innehållet av ^{125}I -PP i analysplatsen ger 10 500 CPM (-5%, +20%) vid referensdatum (räknarens verkningsgrad = 80%).
- 3. Maximal bindning (B_0/TOT)**
Beräkna för varje analys andelen (i %) av bunden radioaktivitet i nollstandard: $(B_0/\text{TOT}) \times 100$.
- 4. Ospecifik bindning (OSB/TOT)**
Beräkna för varje analys andelen (i %) av ospecifik bindning: $(\text{OSB}/\text{TOT}) \times 100$.
Den ospecifika bindningen bör vara under 7%.
- 5. Lutningen på standardkurvan**
Beräkna exempelvis 80, 50 och 20%-punkterna på standardkurvan för kontroll av reproducerbarhet från analystillfälle till analystillfälle.

PRESTANDA**Känslighet**

Den lägsta mätbara koncentrationen är 3 pmol/L. Denna siffra innebär en minskning av bindningen motsvarande dubbla standardavvikelsen (2xSD) hos radioaktiviteten i standarden med koncentrationen noll.

Noggrannhet

När kända mängder hPP tillsattes till humant serum erhöles återvinning på i genomsnitt 104% (95-113%).

Precision

Variationer inom analyser

<u>Nivå</u>	<u>Variationskoefficient (%VK)</u>	<u>N</u>
28.8 pmol/L	2.6	10
108.5 pmol/L	1.8	10

Variationer mellan analyser (totalt)

<u>Nivå</u>	<u>Variationskoefficient (%VK)</u>	<u>N</u>
38.8 pmol/L	2.0	10
99.3 pmol/L	3.5	10

Specifitet

Följande korsreaktioner har uppmätts:

<u>Peptid</u>	<u>Korsreaktion</u>
Pankreaspolypeptid, människa	100.0 %
Pankreaspolypeptid, nötkreatur	120 %
Gastric inhibitory peptide, gris	0.02 %
Cholecystokinin 39, gris	0.02 %
Sekretin, gris	0.02 %
Gastrin34, människa	<0.01 %
Gastrin17, människa	<0.01 %
Glukagon, människa/gris	0.03 %
Insulin, gris	<0.01 %
ACTH 1-39, gris	<0.003%
Neuropeptid Y, människa	<0.8 %
Peptide YY, människa	<1.0 %

Interferens

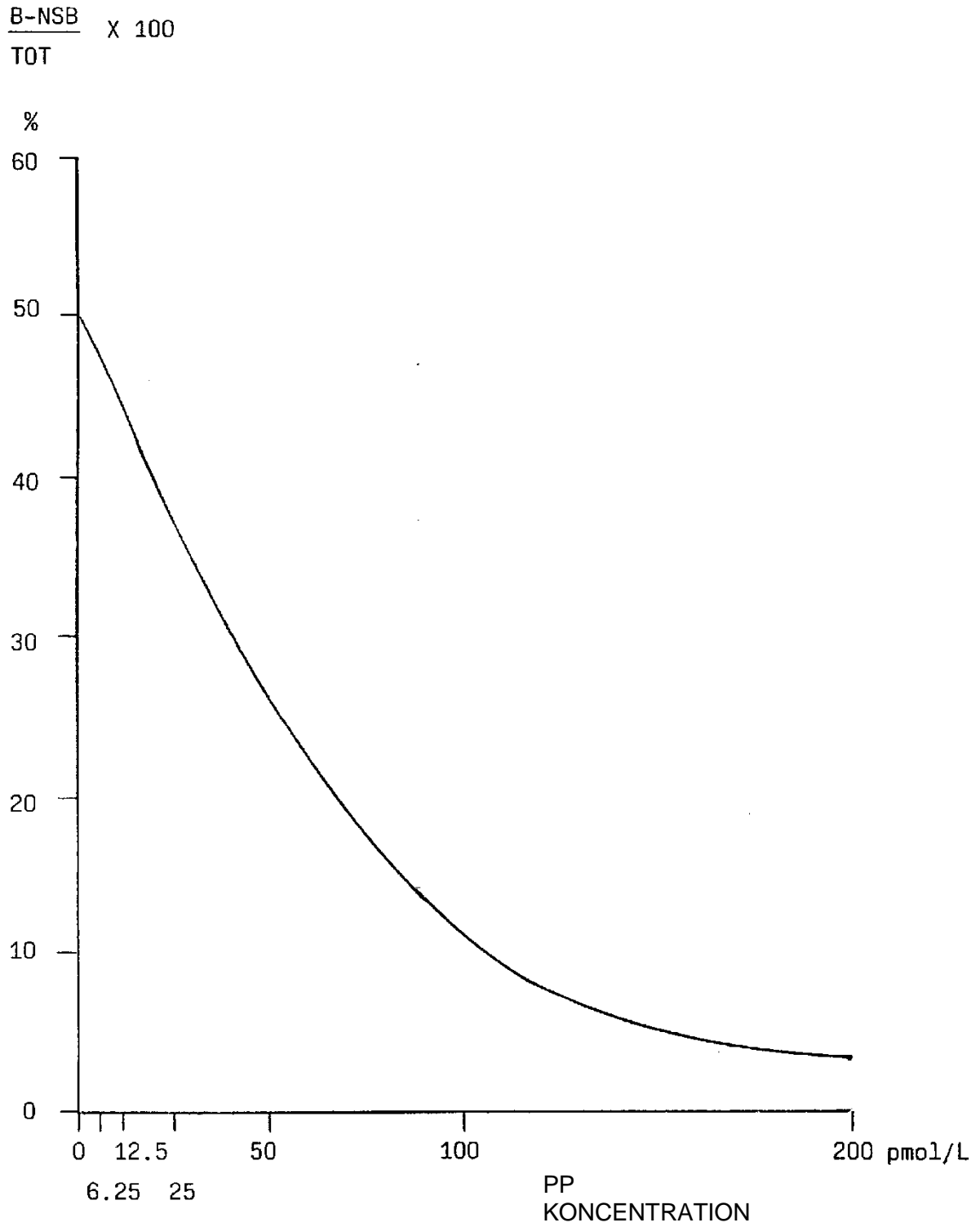
Prov som uppvisar grumlighet, hemolys, hyperlipemi eller som innehåller fibrin kan ge felaktiga resultat.

SCHEMA ÖVER UTFÖRANDET

Typ av rör	Rör nr	Standard, kontroll eller prov	Anti-PP (A)	Spädningsbuffert (F)		¹²⁵ I-PP (B)		Dubbelanti kropp - PEG (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexa	100 µL	Vortexa	-	Vortexa och
OSB	3-4	100 µL	-	500	och	100 µL	och	500 µL	inkubera
Stand 0	5-6	100 µL	500 µL	-	inkubera	100 µL	inkubera	500 µL	30-60 min.
Stand 6.25	7-8	100 µL	500 µL	-	20-24	100 µL	20-24	500 µL	Vid 2-8° C.
Stand 12.5	9-10	100 µL	500 µL	-	timmar	100 µL	timmar	500 µL	Centrifugera
Stand 25	11-12	100 µL	500 µL	-	vid	100 µL	vid	500 µL	15 min.
Stand 50	13-14	100 µL	500 µL	-	2-8° C.	100 µL	2-8° C.	500 µL	1700 x g
Stand 100	15-16	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	vid +4° C.
Stand 200	17-18	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	Dekantera
Kontroll (G)	19-20	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	och avläs
Kontroll (H)	21-22	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	precipitatens
Prov 1	23-24	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	radioaktivitet.
Prov 2	25-26	100 µL	500 µL	-		100 µL		500 µL	
etc.									

Table 1







EXEMPEL PÅ PP STANDARDKURVA



REFERENCES / REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.
Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L.
Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of
pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic
polypeptide administration in man. Surgery 104:119-129, 1988.

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE. SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER SOM BRUKES PÅ ETIKETTER / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-PP. Anti-PP. Anti-PP. Anti PP. Anti PP. Anti-PP.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-PP. PP ¹²⁵ I. PP I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-PP. PP- ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-PP.
REAG	C	DAB		Double antibody-PEG. PEG double anticorps. Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Secondo anticorpo-PEG. Dobbelt antistoff, fast fase. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	DIL	CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente dello standard. Standardspädningsmedel.
REAG	E	CAL	2000	PP standard 2000 pmol/L. Standard de PP, 2000 pmol/L. Estándar PP 2000 pmol/L. PP Standard 2000 pmol/L. PPstandard P 2000pmol/L. PP-standard 2000 pmol/L.
REAG	F	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG	G	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoins, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controllo, livello 1 (normale). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG	H	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoins, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controllo, livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 MALMÖ, Sweden
 Telephone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
 E-post: info@eurodiagnostica.com
 www.eurodiagnostica.com