

Instruction

EURIA-Gastrin

Gastrin radioimmunoassay
For in vitro diagnostic use only



Document No.E-23-0026-12

February, 2016

EURIA-Gastrin

English:	page	2
Francais:	page	15
Espanol:	página	29
Deutsch:	Seite.....	42
Italiano:	pagina	55
Svenska:	sida	68

REF MD 302

IVD



100

INTRODUCTION

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

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

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

CLINICAL CONSIDERATIONS

Gastrin is one of the best studied gut hormones. It occurs in the circulation in several different forms, among those gastrin-34 and gastrin-17, sulphated and non-sulphated. The determination of gastrin is useful in the diagnosis of gastrin-producing tumours and of achylia with or without pernicious anemia. In all these clinical situations the serum gastrin concentration is high. Treatment with powerful antiseoretagogues may cause a rise in the serum gastrin concentration, because of an impaired acid feedback inhibition of gastrin release. Measurement of serum gastrin can thus be used to monitor the treatment with antiseoretagogues.

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

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

Range: 11-54 pmol/L.

PRINCIPLE OF THE METHOD

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

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

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

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

COMPOSITION OF THE REAGENT KIT

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

1. Anti-gastrin (Reagent A)

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

For 100 tubes.

2. ¹²⁵I-Gastrin (Reagent B)

Contains 66 KBq or 1.8 μ Ci at reference date. Synthetic human gastrin-17 is iodinated. The monoiodinated form is purified by HPLC.

Specific activity: 1700-2100 μ Ci/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilized in 2.5 mL 0.5M phosphate buffer, pH 7.4, with 2.5% human serum albumin and 0.5% sodium azide.

Contains 0.12 mL normal rabbit serum. Colour: Blue.

Reconstitution in 25 mL distilled water.

3. Double antibody-PEG (Reagent C)

50 mL diluted goat anti-rabbit Ig antiserum in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25% human serum albumin and 0.05% sodium azide.

Contains 5.0% (w/v) polyethylene glycol 6000. Colour: Red

4. Assay buffer (Reagent D)

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

5. Gastrin standard (Reagent E)

Lyophilized. 5.00 mL standard after reconstitution. Concentration : 500 pmol/L.

The standard is produced from synthetic human gastrin-17. Diluted in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25% human serum albumin, 0.05% sodium azide.

Reconstitution in 5.00 mL distilled water.

6. Controls (Reagent F-G)

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

EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

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

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

Vortex mixer.

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

Well-type gammacounter.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

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

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

Reagent A: Anti-gastrin

Ready for use. Store at 2-8° C.

Reagent B: ¹²⁵I-gastrin

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

Reagent C: Double antibody-PEG

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

Reagent D: Assay buffer

Ready for use. Store at 2-8° C.

Reagent E: Gastrin standard

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

Store at -18° C or lower if reused.

Reagent F-G: Controls

Reconstitute each vial with 1.00 mL distilled water.

Store at -18° C or lower if reused.

SPECIMEN COLLECTION

Patients should be fasting at least ten hours prior to sample collection. Vein blood is collected in tubes without additives. The sample is cooled in an ice-bath and allowed to clot. Serum is separated by centrifugation at +4° C.

The serum should be frozen within 4 hours and stored at -18° C or lower until assayed. Repeated freezing and thawing should be avoided.

ASSAY PROCEDURE

Reconstitute the reagents as specified.

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

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

Controls (C-tubes): Low and high.

Samples (P-tubes).

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

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

For an overview, see page 10.

PERFORMANCE

- Reconstitute the lyophilized reagents according to the instructions on page 5 and allow the reagents to reach room temperature.
- Prepare the gastrin working standards by dilution of the Gastrin standard 500 pmol/L (Reagen E) with assay buffer (Reagent D) according to the following example:
 - a. Reagent E after reconstitution = 500 pmol/L
 - b. 1.0 mL standard 500 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 250 pmol/L
 - c. 1.0 mL standard 250 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 125 pmol/L
 - d. 1.0 mL standard 125 pmol/L + 1.0 mL assay bufer = 62.5 pmol/L
 - e. 1.0 mL standard 62.5 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 31.2 pmol/L
 - f. 1.0 mL standard 31.2 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 15.6 pmol/L
 - g. Assay buffer = 0 pmol/L(Store the standards at -20° C or lower if reused).
- Pipette 100 µL of standards, controls and samples in their respective tubes. Pipette 300µL assay buffer (Reagent D) into NSB-standard-tubes.
- Pipette 200 µL of ¹²⁵I-Gastrin (Reagent B) into all tubes. The TOT-tubes are capped and kept aside.
- Pipette 200 µL anti-Gastrin (Reagent A) into all tubes **except** NSB and TOT.
- Vortex the tubes carefully and incubate for 60 min at room temperature (20-25° C).

- Add 500 μL of well mixed double antibody-PEG (Reagent C) into all tubes **except** TOT. Vortex carefully and incubate 30-60 min at room temperature.
- Centrifuge for 15 minutes at minimum 1700 x g, temperature 4° C.
- Decant the supernatant immediately after centrifugation, and count the radioactivity in the precipitates in a gamma counter.

CALCULATIONS

- Subtract the average count rate (CPM) of the NSB-standard from the count rate (CPM) of the replicates of the standards, controls and samples.
- A standard curve is generated by plotting the bound fraction, B/TOT against the concentrations of the gastrin standards. An example of a standard curve is given on page 10.
- Interpolate the gastrin concentrations of the controls and samples from the generated standard curve.
- The standard curve and the calculation of the concentrations in samples can be done by a computer method. A spline method may be used.

ASSAY CHARACTERISTICS

Sensitivity

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

Accuracy

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

Precision

Intra assay variation

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

Inter assay variation (total variation)

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

Specificity

The following cross reactions have been found:

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

Interference

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

QUALITY CONTROL

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

1. The found concentrations of the control sera

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

2. Total counts

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

3. Maximum binding (Bo/TOT)

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

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

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

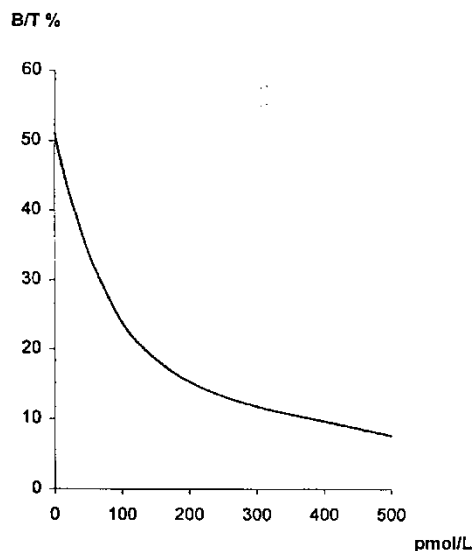
$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ is less than 5%.

5. Slope of standard curve

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

OUTLINE OF THE RIA PROCEDURE

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


EXAMPLE OF GASTRIN STANDARD CURVE

REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F. , and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / 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-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-Gastrine

Dosage immunoradiologique de la gastrine
À usage professionnel uniquement

INTRODUCTION

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

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

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

CONSIDÉRATIONS CLINIQUES

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

La détermination de la gastrine est utile dans le diagnostic des tumeurs produisant de la gastrine et de l'achylie avec ou sans anémie pernicieuse. Dans toutes ces situations cliniques, la concentration de gastrine dans le sérum est élevée. Le traitement aux anti-sécrétagogues puissants est susceptible de produire une hausse de la concentration de gastrine dans le sérum en raison d'un déficit de l'inhibition de la libération de gastrine par rétrocontrôle de l'acide. L'analyse de la gastrine sérique peut donc être utilisée pour surveiller le traitement aux anti-sécrétagogues.

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

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

Plage : 11-54 pmol/l.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

À usage professionnel en laboratoire.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

À usage exclusif en diagnostic in vitro.

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

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

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

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

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

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

COMPOSITION DU KIT DE RÉACTIF

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

1. Anti-gastrine (Réactif A)

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

2. Gastrine ¹²⁵I (Réactif B)

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

La forme monoiodée est purifiée par CLHP.

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

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

Reconstitution dans 25 ml d'eau distillée.

3. PEG double anticorps (Réactif C)

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

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

4. Diluant de dosage (Réactif D)

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

5. Standard de gastrine (Réactif E)

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

Le standard est produit à partir de gastrine-17 humaine synthétique. Dilué dans un tampon de phosphate de 0,05 M (pH 7,4), 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,05% d'azoture de sodium.

Reconstitution dans 5,00 ml d'eau distillée.

6. Témoins (Réactif F-G)

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

MATÉRIELS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

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

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

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

Agitateur vortex.

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

Compteur de rayons gamma à puits.

PRÉPARATION ET ENTREPOSAGE DES RÉACTIFS

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

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

Réactif A: Anti-gastrine

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

Réactif B: Gastrine 125I

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

Réactif C: PEG double anticorps

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

Réactif D: Tampon de dosage

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

Réactif E : Standard de Gastrine

Reconstituer avec 5,00 ml d'eau distillée.

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

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

Réactif F-G : Témoins

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

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

COLLECTE DE SPECIMENS

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

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

PROCÉDURE DE DOSAGE

Reconstituer les réactifs selon les indications fournies.

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

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

Témoins (C-tubes) : Bas et élevé.

Échantillons (P-tubes).

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

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

Pour un aperçu, voir en page 24.

PERFORMANCE

- Reconstituer les réactifs lyophilisés conformément aux instructions de la page 18 et les laisser se stabiliser à température ambiante.
- Préparer les standards de travail de gastrine en diluant le standard de gastrine de 500 pmol/l (Réactif E) avec le tampon de dosage (Réactif D) conformément aux indications suivantes exemple:
 - a. Réactif E = 500 pmol/l
 - b. 1,00 ml de standard de 500 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 250 pmol/l.
 - c. 1,00 ml de standard de 250 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 125 pmol/l
 - d. 1,00 ml de standard de 125 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 62,5 pmol/l
 - e. 1,00 ml de standard de 62,5 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 31,2 pmol/l.
 - f. 1,00 ml de standard de 31,2 pmol/l + 1,00 ml de tampon de dosage = 15,6 pmol/lg.
 - g. tampon de dosage = 0 pmol/l(Entreposer les standards à une température de -20° C ou inférieure en cas de réutilisation).
- Pipeter 100 μ l des standards, témoins et échantillons dans leur tubes respectifs. Pipeter 300 μ l du tampon de dosage (Réactif D) dans des tubes NSB à standard.
- Pipeter 200 μ l de gastrine 125 I (Réactif B) dans tous les tubes Les TOT-tubes sont bouchés et mis de côté.
- Pipeter 200 μ l d'anti-gastrine (Réactif A) dans tous les tubes à **l'exception** des tubes NSB et TOT-tubes.
- Vortexer avec précaution et incubé pendant 60 minutes à température ambiante (20-25° C).
- Ajouter 500 μ l de PEG double anticorps (Réactif C) bien mélangé à tous les tubes à **l'exception** des TOT-tubes. Vortexer avec précaution et incubé pendant 30-60 minutes à température ambiante.
- Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à $+4^{\circ}$ C (1700 x g minimum).
- Décanté le surnageant immédiatement après la centrifugation et compter la radioactivité des précipités dans un compteur à rayons gamma.

CALCULS

- Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes NSB standard du taux de comptage (CPM) des répliqués des standards, des témoins et d'échantillons.
- Une courbe standard est produite en reportant fraction liée (B/TOT) par rapport aux concentrations des standards de gastrine. Un exemple de courbe standard est donné en page 24.
- Interpoler les concentrations de gastrine des témoins et échantillons à partir de la courbe standard produite.
- La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons peuvent également être effectués par méthode informatique. Un algorithme de spline cubique peut être utilisé.

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Sensibilité

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

Exactitude

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

Précision

Variation intra-dosage :

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

Variation inter-dosages (variation totale)

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

Spécificité

On a trouvé les réactions croisées suivantes :

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

Interférence

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

CONTRÔLE QUALITÉ

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

1. Les concentrations trouvées dans les sérums témoins

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

2. Coups totaux

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

3. Liaison maximale (Bo/TOT)

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

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

4. Liaison non-spécifique (NSB/TOT)

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

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

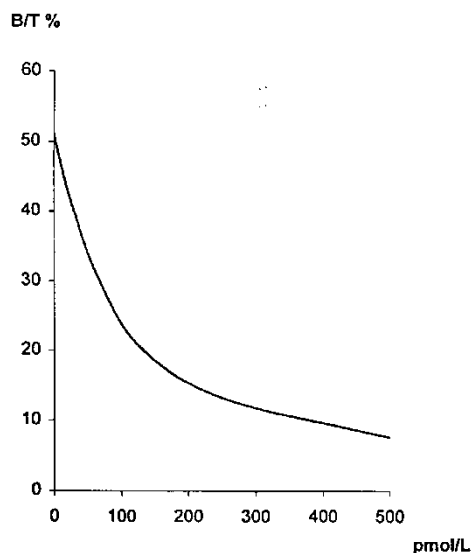
5. Pente de la courbe standard

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

CADRE DE LA PROCÉDURE RIA

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

EXEMPLE DE COURBE STANDARD DE LA GASTRINE




REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F. , and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / 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-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-Gastrin

Radioinmunoensayo para la determinación de la gastrina
Sólo para uso profesional

INTRODUCCIÓN

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

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

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

CONSIDERACIONES CLÍNICAS

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

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

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

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

Rango: 11-54 pmol/l.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

La gastrina I⁻¹²⁵ se fija a los anticuerpos en proporción inversa a la concentración de gastrina de los estándares y muestras. La gastrina I⁻¹²⁵ fijada a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada utilizando la técnica de precipitación de doble anticuerpo con polietilenglicol. Seguidamente se mide la radiactividad de los precipitados. El antisuero utilizado en este ensayo presenta reacciones cruzadas con la gastrina-34 y las formas sulfatadas de la gastrina-17 y la gastrina-34. Sólo para uso profesional en el laboratorio.

PRECAUCIONES

Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

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

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

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

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

- El material radiactivo debe almacenarse en áreas especialmente diseñadas a tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en áreas autorizadas.
- Debe tenerse mucho cuidado a fin de evitar la ingesta del material y el contacto del material con la piel y la ropa. No pipetear soluciones radiactivas con la boca.
- En los lugares donde se está utilizando material radiactivo, debe estar prohibido beber, comer o fumar.
- Las manos se deben proteger con guantes y lavarse después de utilizar materiales radiactivos.
- El trabajo se debe realizar sobre una superficie cubierta de un material absorbente desechable.
- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente y todos los materiales contaminados deben ser eliminados como residuos radiactivos. Las superficies contaminadas deben limpiarse con detergente.

Los reactivos en este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando azidas metálicas altamente explosivas. Al eliminar los reactivos en el sistema de cañerías, verter siempre abundante agua a chorro para evitar la formación de azidas metálicas. Asimismo, también se debería verter ocasionalmente un 10% de hidróxido de sodio en las tuberías de metal.

COMPOSICIÓN DEL KIT

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

1. Anti-gastrina (Reactivo A)

Antisuero de conejo enfrentado a gastrina-17 humana sintética conjugada con albúmina de suero bovino, 21 ml de antisuero. Diluyente: tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica. Color: Amarillo.
Para 100 tubos.

2. Gastrina I-¹²⁵ (Reactivo B)

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

La forma monoiodada está purificada mediante HPLC.

Actividad específica: 1700-2100 μ Ci/nmol (62-77 MBq/nmol). Liofilizada en 2,5 ml de tampón fosfato de 0,5 M y pH de 7.4, con 2,5% de albúmina de suero humano y 0,5% de azida sódica.

Contiene 0,12 ml de suero normal de conejo. Color: Azul.

Reconstituir en 25 ml de agua destilada.

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

50 ml de antisuero Ig de cabra anti-conejo diluido en tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.

Contiene 5% (p/v) de glicol polietilénico 6000. Color: Rojo.

4. Tampón del ensayo (Reactivo D)

40 ml de tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25 de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.

5. Estándar de gastrina (Reactivo E)

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

El estándar se producen a partir de la gastrina-17 humana sintética. Diluido en tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7.4, con 0,25% de albúmina de suero humano y 0,05% de azida sódica.

Reconstituir en 5 ml de agua destilada.

6. Controles (Reactivos F-G)

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

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

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

Pipetas con puntas desechables: 100, 200 y 500 μ l.

Una pipeta de repetición, por ejemplo una Multipipeta de Eppendorf, para volúmenes de 200 y 500 μ l facilitará la operación de distribución de los reactivos.

Agitador.

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

Contador gamma.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Conservar todos los reactivos a 2-8^o C antes de la reconstitución y el uso. La estabilidad de los reactivos figura en las etiquetas de los viales. En lo que se refiere a los reactivos liofilizados, la fecha de caducidad es válida para los reactivos no reconstituidos. Los reactivos reconstituidos son estables durante 8 semanas si se almacenan correctamente.

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

Reactivo A: Anti-gastrina

Listo para su uso. Conservar a 2-8^o C.

Reactivo B: Gastrina I-¹²⁵

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

Reactivo C: Doble Anticuerpo con PEG

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

Reactivo D: Tampón de ensayo

Listo para su uso. Conservar a 2-8^o C.

Reactivos E: Estándar de Gastrina

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

Conservar a – 18^o C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivos F-G: Controles

Reconstituir cada vial con 1 ml de agua destilada.

Conservar a – 18^o C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

RECOGIDA DE LA MUESTRA

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

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

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Reconstituir los reactivos tal y como se especifica.

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

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

Controles (tubos C): Bajo y alto.

Muestras (tubos P).

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

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

Para un resumen del procedimiento véase la página 37.

REALIZACIÓN

- Reconstituir los reactivos liofilizados de acuerdo a las instrucciones que aparecen en la página 32 y esperar que los reactivos se pongan a temperatura ambiente.
- Preparar los estándares de trabajo de la gastrina diluyendo el estándar **gastrina de 500 pmol/l (Reactivo E) con el tampón de ensayo (Reactivo D)** de acuerdo con las siguientes indicaciones:
 - a. Reactivo E = 500 pmol/l
 - b. 1 ml de estándar de 500 pmol/l + 1 ml de tampón = 250 pmol/l
 - c. 1 ml de estándar de 250 pmol/l + 1 ml de tampón = 125 pmol/l
 - d. 1 ml de estándar de 125 pmol/l + 1 ml de tampón = 62,5 pmol/l
 - e. 1 ml de estándar de 62,5 pmol/l + 1 ml de tampón = 31,2 pmol/l
 - f. 1 ml de estándar de 31,2 pmol/l + 1 ml de tampón = 15,6 pmol/l
 Tampón de ensayo = 0 pmol/l
 Conservar los estándares a -20° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
- Pipetear 100 µl de estándares, controles y muestras en sus tubos respectivos. Pipetear 300 µl de tampón de ensayo (Reactivo D) en los tubos NSB estándar.
- Pipetear 200 µl de gastrina I-¹²⁵ (Reactivo B) en todos los tubos. Tapar y guardar aparte los tubos TOT.
- Pipetear 200 µl de anti-gastrina (Reactivo A) en todos los tubos **exceptuando** los tubos NSB y TOT.
- Agitar con cuidado los tubos e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25° C).
- Añadir 500 µl del doble anticuerpo PEG (Reactivo C) bien mezclado a todos los tubos **exceptuando** los tubos TOT. Agitar con cuidado e incubar durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos a 1700 x g como mínimo, a 4° C.
- Decantar los sobrenadantes inmediatamente después de la centrifugación, y contar la radiactividad de los precipitados mediante un contador gamma.

CÁLCULOS

- Restar la media de CPM del estándar de NSB de la media de CPM de los duplicados de los estándares, de las muestras y controles.
- Representando gráficamente la fracción fijada CPM o B/TOT en función de las concentraciones de los estándares de gastrina, se genera una curva estándar. Se muestra un ejemplo de la curva estándar en la página 37.
- Interpolar las concentraciones de gastrina de los controles y las muestras de la curva estándar generada.
- La curva estándar y el cálculo de las concentraciones de las muestras también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos. También puede utilizarse un algoritmo spline.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad

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

Recuperación

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

Precisión

Variación intra-ensayo

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

Variación inter-ensayo (variación total)

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

Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

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

Interferencia

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

CONTROL DE CALIDAD

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

1. Las concentraciones encontradas del suero de control

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

2. Cuentas totales

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

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

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

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

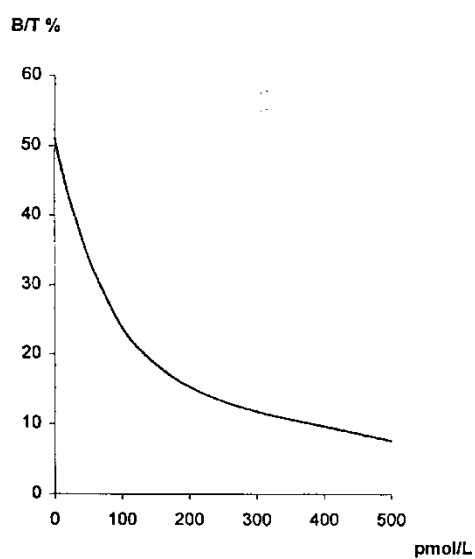
5. Forma de la curva estándar

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

TABLA RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO RIA

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

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR DE GASTRINA



REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F. , and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / 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-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG B Ag ¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG C DAB	Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG D BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG E CAL 500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG F CONTROL	Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG G CONTROL	Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-Gastrin

Gastrin Radioimmunoassay
Nur zur in-vitro-Diagnostik

EINLEITUNG

Gastrin und Vagusnerv sind die Hauptregulatoren der Magensäuresekretion. Außer Gastrin sind jedoch auch andere Faktoren an der Magensäuresekretion beteiligt. Gastrin wird hauptsächlich in der antro-pylorischen Magenschleimhaut gebildet. Einige wenige gastrinproduzierende Zellen befinden sich auch im Zwölffingerdarm und in der Bauchspeicheldrüse.

Gastrin tritt in verschiedenen Formen im menschlichen Serum auf. Ein amidierter C-Terminus ist essentiell für die biologische Aktivität von Gastrin.

Pro-Gastrin wird vom Prä-Pro-Gastrin abgespalten. Es konnte gezeigt werden, dass Pro-Gastrin teilweise in den Tyrosinresten sulfatiert wird. Pro-Gastrin wird enzymatisch in die Hauptformen von biologisch aktivem Gastrin gespalten: Gastrin-34 sowie Gastrin-17, die beide in sulfatierter und nicht-sulfatierter Form auftreten. Kleinere Mengen von Gastrin-52 (auch als Komponente 1 bezeichnet), Gastrin-14 (Mini-Gastrin) und noch kleinere Fragmente sind im Serum nachgewiesen worden.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Gastrin gehört zu den mit am besten untersuchten Darm-Hormonen. Im Blut kommt es in verschiedenen Formen vor, darunter Gastrin-17 und Gastrin-34, sulfatiert und nicht sulfatiert. Die Bestimmung von Gastrin ist nützlich bei der Diagnose von Gastrin produzierenden Tumoren sowie von Achylie mit oder ohne perniziöser Anämie. Bei all diesen klinischen Indikationen ist die Gastrinkonzentration im Serum hoch. Die Behandlung mit starken Sekretionshemmern kann einen Anstieg der Gastrinkonzentration im Serum hervorrufen aufgrund einer gestörten Säure-Feedbackhemmung der Gastrinfreisetzung. Aus diesem Grunde kann die Bestimmung von Serumgastrin zum Monitoring einer Behandlung mit Sekretionshemmern verwendet werden.

Normalwerte von Gastrin im Serum von Menschen: ≤ 60 pmol/l (Nüchternwert, ermittelt mit dieser Methode)

Mittelwert: 25 pmol/l \pm 10 pmol/l (1SD).

Bereich: 11-54 pmol/l.

TESTPRINZIP

Die Reagenzien dieses Tests sind zur Messung von Gastrin in menschlichem Serum bestimmt. Gastrin im Serum wird durch einen kompetitiven Radioimmunoassay unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen ein Gastrin-17 Albuminkonjugat gemessen. Das Gastrin der Standards und Proben konkurriert mit ^{125}I -markiertem Gastrin-17 um die Bindungsstellen am Antikörper. ^{125}I -Gastrin bindet im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von Gastrin in den Standards und Proben. Antikörpergebundenes ^{125}I -Gastrin wird von der ungebundenen Fraktion unter Anwendung der Doppel-Antikörper-Polyethylen-Glykol-Ausfälltechnik getrennt. Die Radioaktivität des Präzipitats wird gemessen. Das verwendete Antiserum dieses Testes kreuzreagiert mit Gastrin-34 und den sulfatierten Formen von Gastrin-17 und Gastrin-34.

Für den professionellen Gebrauch im Labor.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in-vitro-Gebrauch.

Da die Regularien von einem Land zum anderen variieren können, ist es notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person mit den im jeweiligen Land gültigen gesetzlichen Bestimmungen vertraut ist; das betrifft alle Aspekte hinsichtlich Typ und Menge an radioaktivem Material, das in diesem Test verwendet wird.

Der Test enthält Komponenten menschlichen Ursprungs. Diese wurden mittels Immunoassay hinsichtlich Hepatitis B Oberflächenantigen, Antikörper gegen HCV sowie gegen HIV-1 und HIV-2 getestet und ergaben ein negatives Ergebnis. Trotzdem sollten alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden. Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertszeit: 60 Tage), das ionisierende X- (28 keV) und γ - (35.5 keV) Strahlungen emittiert. Es sollten geeignete Maßnahmen gemäß lokalen und/oder nationalen Vorschriften 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-authorisiertes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material darf ausschließlich in speziell gekennzeichneten Räumen erfolgen.
- Vorsicht ist geboten, damit ein Verschlucken sowie Haut- und Kleiderkontakt vermieden werden. Radioaktive Lösungen nicht mit dem Mund pipettieren.
- Dort, wo radioaktives Material verwendet wird, darf weder gegessen, getrunken noch 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 entfernt und sämtliches 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 hoch explosiven Ablagerungen führen. Daher beim Entsorgen in Abflüssen mit reichlich Wasser nachspülen, was die Bildung von Metallaziden verhindert. Rohre, die wahrscheinlich diese explosiven Ablagerungen enthalten, gründlich mit 10%iger Natronlauge spülen.

KOMPONENTEN DES KITS

Die Reagenzien dieses Testkits sind ausreichend für 100 Röhrchen.

1. Anti-Gastrin (Reagenz A)

Kaninchen-Antiserum gegen synthetisches, humanes Gastrin-17, konjugiert an Rinder-Serumalbumin. 21 ml Antiserum. Verdünnungspuffer: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,25 % humanes Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid. Gelb eingefärbt. Für 100 Röhrchen.

2. ¹²⁵I-Gastrin (Reagenz B)

Enthält 66 KBq oder 1,8 µCi am Herstellungstag. Synthetisches humanes Gastrin-17, jodiert. Die monojodierte Form ist HPLC-gereinigt.

Spezifische Aktivität: 1.700-2.100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilisiert in 2,5 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 2,5 % humanem Serumalbumin und 0,5 % Natriumazid. Enthält 0,12 ml normales Kaninchenserum. Blau eingefärbt. In 25 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

3. Doppel-Antikörper-PEG (Reagenz C)

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

4. Assaypuffer (Reagenz D)

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

5. GastrinStandard (Reagenz E)

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

Der Standard wird aus synthetischem, humanem Gastrin-17 hergestellt. Verdünnt in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,25 % humanem Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid.

In 5,00 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

6. Kontrollen (Reagenz F-G)

Lyophilisierte Kontrollen mit niedriger (normal) und hoher Konzentration an Gastrin. Jeweils 1,00 ml nach Auflösen.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

(nicht im Kit enthalten)

Einmal-Teströhrchen aus Polystyrol: 11-13 x 55 mm

Pipetten mit Einmalspitzen, 100, 200 und 500 µl

Eine Mehrfach-Pipette, wie z.B. Eppendorf-Multipipette für Volumina 200 und 500 µl erleichtert die Verteilung der Reagenzien

Vortexmixer

Zentrifuge, Minimum von 1.700 x g (Kühlzentrifuge ist zu bevorzugen)

Gamma-Counter

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien sollten vor dem Auflösen und Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden. Die Stabilität der Reagenzien ist auf dem Etikett jedes Fläschchens angegeben. Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die nicht-rekonstituierten Reagenzien. Nach Rekonstitution haben die Reagenzien bei ordnungsgemäßer Lagerung eine Haltbarkeit von 8 Wochen.

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

Reagenz A: Anti-Gastrin

Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2–8 °C

Reagenz B: ¹²⁵I-Gastrin

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

Reagenz C: Doppel-Antikörper-PEG

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

Reagenz D: Assaypuffer

Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2 – 8 °C.

Reagenz E: Gastrin-Standard

Mit 5,00 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Zubereitung der Arbeitsstandards: siehe Radioimmunoassay-Testdurchführung. Lagerung bei -18 °C oder tiefer bei Wiederverwendung.

Reagenz F-G: Kontrollen

Mit 1,00 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.

Lagerung bei -18 °C oder tiefer, bei Wiederverwendung.

PROBENGEWINNUNG

Vor der Blutentnahme sollten die Patienten mindestens 10 Stunden nüchtern sein. Venenblut wird in Röhrchen ohne Zusätze gewonnen. Die Proben werden sofort in einem Eisbad gekühlt. Serum wird durch Zentrifugation bei +4 °C gewonnen.

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

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Reagenzien wie beschrieben rekonstituieren
Vor dem Gebrauch müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
Genauigkeit bei allen Pipettierschritten ist unerlässlich. Alle Tests (Standards, Kontrollen und Proben) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet:

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

Kontrollen (C-Röhrchen) niedrig und hoch

Proben (P-Röhrchen)

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

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

Für einen Überblick, siehe Seite 50.

DURCHFÜHRUNG

- Die lyophilisierten Reagenzien wie auf Seite 45 beschrieben rekonstituieren. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellung der Gastrin-Arbeitsstandards durch Verdünnung des Gastrin-Standards (Reagenz E) mit dem Assaypuffer (Reagenz D) wie folgt:
- a. Reagenz E nach Rekonstitution = 500 pmol/l
- b. 1,00 ml Standard 500 pmol/l + 1,00 ml Assaypuffer = 250 pmol/l
- c. 1,00 ml Standard 250 pmol/l + 1,00 ml Assaypuffer = 125 pmol/l
- d. 1,00 ml Standard 125 pmol/l + 1,00 ml Assaypuffer = 62,5 pmol/l
- e. 1,00 ml Standard 62,5 pmol/l + 1,00 ml Assaypuffer = 31,2 pmol/l
- f. 1,00 ml Standard 31,2 pmol/l + 1,00 ml Assaypuffer = 15,6 pmol/l
- g. Assaypuffer = 0 pmol/l
(Die Standards bei -20°C oder tiefer lagern, wenn sie wiederverwendet werden sollen)
- 100 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. 300 µl Assaypuffer (Reagenz D) in die NSB-Standard-Röhrchen pipettieren.
- 200 µl ¹²⁵I-Gastrin (Reagenz B) in alle Röhrchen pipettieren. Die TOT-Röhrchen werden verschlossen und zur Seite gestellt.
- 200 µl Anti-Gastrin (Reagenz A) in alle Röhrchen **außer** NSB und TOT pipettieren.
- Sorgfältig vortexen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.

- 500 µl gut gemixten Doppel-Antikörper-PEG (Reagenz C) in alle Röhren **außer** TOT pipettieren. Vorsichtig vortexen und für 30 – 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Röhren bei 4 °C 15 Minuten mit mindestens 1.700 x g zentrifugieren.
- Überstand unmittelbar nach dem Zentrifugieren dekantieren und die Radioaktivität des Niederschlags in einem Gamma-Counter messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Den Mittelwert der Zählrate (CPM) der NSB-Standards von der Zählrate (CPM) der Replikate von Standards, Kontrollen und Proben abziehen.
- Erstellen einer Standardkurve durch Auftragen der gebundenen Fraktion, B/TOT gegen die Konzentration der Gastrin-Standards. Ein Beispiel einer Standardkurve ist auf Seite 53 abgebildet.
- Die Gastrinkonzentrationen der Kontrollen und Proben von der erstellten Standardkurve ablesen.
- Steht ein entsprechendes Computerprogramm zur Verfügung, so können die Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen durchgeführt werden, z.B. unter Anwendung eines Spline Algorithmus.

TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt bei 5 pmol/l. Dieser Wert entspricht einer Abnahme der Bindung von 2xSD der gebundenen Radioaktivität im Nullstandard.

Genauigkeit

Eine Wiederfindung von 97,6 % wurde erreicht, wenn bekannte Mengen an Gastrin im Bereich von 65 – 222 pmol/l zu Serumproben hinzugefügt wurden.

Präzision

Intra-Assay-Varianz

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

Inter-Assay-Varianz (Gesamtvarianz)

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

Spezifität

Folgende Kreuzreaktionen wurden gefunden:

Substanz	Kreuzreaktivität
Gastrin-17	100%
Gastrin-17, sulfatiert	83%
Gastrin-34	61%
CCK-8	36%
Gastrin1-14	<0,1%
Gastrin-releasing peptide	<0,01%
Vasoaktives intestinales Peptid	<0,01%
Motilin	<0,01%
Glukagon	<0,01%
Somatostatin 14	<0,01%
C-Peptid	<0,01%

Interferenz

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

QUALITÄTSKONTROLLE

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

1. Die gefundenen Konzentrationen der Kontrollen

(Reagenz F und G) sollten innerhalb der auf den Fläschchen-Etiketten angegebenen Werte liegen.

2. Gesamt- Counts

Die gezählten Counts sollten dem erwarteten CPM nahekommen. Der Gehalt an ¹²⁵I-Gastrin dieses Kits beträgt ca. 25.000 CPM (-5 %, +20 %) am Tag der Markierung (Wirkungsgrad des Counters = 80 %).

3. Maximale Bindung (Bo/TOT)

Für jeden Assay die %-gebundene Radioaktivität des Nullstandards berechnen:
 $Bo/TOT \times 100$

4. Unspezifische Bindung (NSB/TOT)

Für jeden Assay die % unspezifische Bindung berechnen: $NSB/TOT \times 100$.

$NSB/TOT \times 100$ ist unter 5 % .

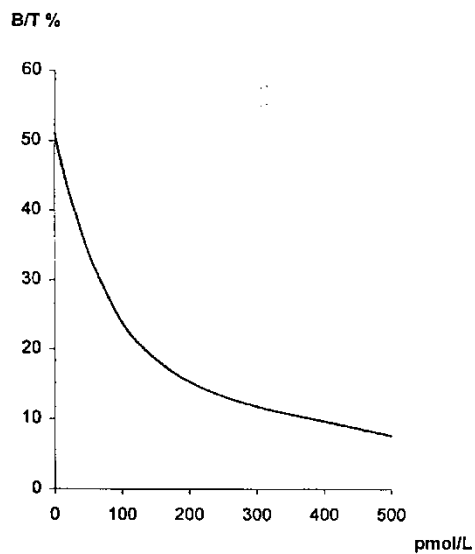
5. Verlauf der Standardkurve

Als Marker für die Reproduzierbarkeit von Testlauf zu Testlauf können z.B. die Punkte bei 80, 50 und 20 % der Standardkurve verwendet werden.

ÜBERBLICK DER RIA-TESTDURCHFÜHRUNG

Röhrchen-Typ	Röhrchen Nr.	Standard Probe oder Kontrolle	Assay-puffer (D)	¹²⁵ I-Gastrin mit NRS (B)	Anti-Gastrin (A)		Doppel-Antikörper-PEG (C)	
TOT	1- 2	-	-	200 µl	-	Vortexen	-	Vortexen
NSB _{st}	3- 4	-	300 µL	200 µl	-	und für	500 µl	und für
Stand 0	5- 6	100 µl	-	200 µl	200 µl	60 min	500 µl	30-60 min
Stand 15,6	7- 8	100 µl	-	200 µl	200 µl	bei	500 µl	bei Raum-
Stand 31,3	9-10	100 µl	-	200 µl	200 µl	Raum-	500 µl	tempera-
Stand 62,5	11-12	100 µl	-	200 µl	200 µl	tempera-	500 µl	tur
Stand 125	13-14	100 µl	-	200 µl	200 µl	tur	500 µl	inkubieren.
Stand 250	15-16	100 µl	-	200 µl	200 µl	inku-	500 µl	15 Min bei
Stand 500	17-18	100 µl	-	200 µl	200 µl	bieren.	500 µl	1700 x g
Kontrolle low	19-20	100 µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	zentrifugier
Kontrolle high	21-22	100 µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	en.
Probe 1	23-24	100 µl	-	200 µl	200 µl		500 µl	Dekantieren
								und Radio-
								aktivität des
								Präzipitats
								messen.

BEISPIEL GASTRIN STANDARDKURVE



REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F. , and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / 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-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-Gastrin

Gastrin Radioimmunoassay
Solo per uso professionale

INTRODUZIONE

La gastrina e l'attività del nervo vago sono i regolatori principali della secrezione acida da parte dello stomaco, ma anche altri fattori possono influenzare tale secrezione. Il sito principale di produzione della Gastrina è la mucosa dell'antro dello stomaco, ma alcune cellule gastrino secernenti si possono trovare anche nel duodeno e nel pancreas. La gastrina può essere presente nel siero in forme diverse, ma la presenza di un gruppo amidico all'estremità C-terminale della molecola, sembra essere essenziale per l'attività biologica della Gastrina.

Dal precursore preprogastrina viene liberata la progastrina, parzialmente solfatata nei residui tirosinici; per idrolisi enzimatica dalla progastrina viene prodotta la gastrina biologicamente attiva, gastrina-34 e gastrina-17, che possono essere sia solfatate che non solfatate. Nel siero si possono trovare anche piccole quantità di gastrina-52 (chiamata anche componente 1), gastrina-14 (mini gastrina) e piccoli frammenti peptidici.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

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

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

LIVELLI NORMALI DI GASTRINA OTTENUTI CON QUESTO METODO IN SOGGETTI A DIGIUNO:

≤60 pmol/L

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

Range: 11 -54 pmol/L

PRINCIPIO DEL METODO

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

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

Per uso professionale in laboratorio.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti. I regolamenti che riguardano l'uso e la detenzione di materiale radioattivo possono essere diversi da paese a paese; il responsabile del laboratorio deve conoscere i regolamenti locali per quanto riguarda il tipo e la quantità di radioattivo contenuta in questo kit.

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

Norme di radioprotezione

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

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

CONTENUTO DEL KIT

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

1. Anti gastrina (Reattivo A)

Anticorpo anti gastrina da coniglio preparato usando come immunogeno gastrina-17 coniugata con albumina bovina. L'anticorpo, 21 mL, è pronto per l'uso. Diluente: tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4, albumina umana 0.25%, sodio azide 0.05%. Colore: giallo. Per 100 determinazioni.

2. Gastrina - ¹²⁵I (Reattivo B)

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

3. Secondo anticorpo-PEG (Reattivo C)

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

4. Tampone (Reattivo D)

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

5. Standard di gastrina (Reattivo E)

Concentrazione: 500pmol/l.

Volume: 5mL di standard dopo ricostituzione.

Il flacone contiene 5.00 ml di gastrina-17 umana sintetica, liofilizzata in tampone fosfato 0.05M, pH 7.4, albumina umana 0.25% e sodio azide 0, 05%.

Ricostituire con 5 mL di acqua distillata.

6. Controlli (Reattivi F-G)

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

MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

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

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

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

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

Reattivo A: Anticorpo anti gastrina

Pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C.

Reattivo B: gastrina-¹²⁵I

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

Reattivo C: Secondo anticorpo – PEG.

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

Reattivo D: tampone

Pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C.

Reattivi E: Standard di gastrina

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

Reattivi F-G: Controlli

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

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I pazienti devono essere a digiuno da almeno 10 ore prima del prelievo. Raccogliere i campioni in provette senza anticoagulante. Porre immediatamente il campione in bagno di acqua e ghiaccio. Separare il siero per centrifugazione a 4°C. Portare entro 4 ore il siero a -18°C o a temperature inferiori fino al momento del dosaggio. Evitare ripetuti cicli di congelamento – scongelamento dei campioni.

METODO DEL DOSAGGIO

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

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

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

Campioni (provette S)

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

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

Il metodo è riportato in dettaglio nelle pagine seguenti

Prima dell'uso portare i reattivi a temperatura ambiente.

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

CALCOLO DEI RISULTATI

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

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Sensibilità

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

Accuratezza

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

Precisione

Variazione intra saggio

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

Variazione inter saggio (variazione totale)

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

SPECIFICITÀ

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

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

Interferenza

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

CONTROLLO DI QUALITA'

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

1. Concentrazione trovata dei controlli

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

2. Attività totale

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

3. Capacità legante (Bo/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 5%.

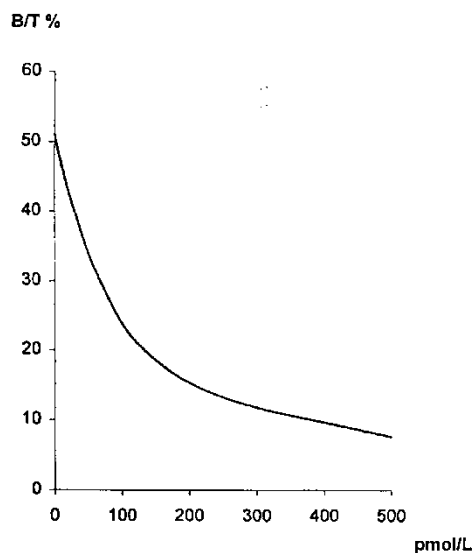
5. Pendenza della curva

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

SCHEMA DEL DOSAGGIO RIA

Provetta	Numero	Standard, campioni o controlli	Tampone	Marcato gastrina ¹²⁵	Anticorpo anti gastrina (Reattivo A)		Secondo anticorpo + PEG	
T	1-2	-	-	200 µL	-	Agitare su vortex e incubare 60 min a temperatura ambiente	-	Agitare su vortex e incubare 30-60 min a temperatura ambiente
NSB _{st}	3-4	-	300 µL	200 µL	-		500 µL	
St. zero	5-6	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 15.6	7-8	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 31.3	9-10	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 62.5	11-12	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 125	13-14	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 250	15-16	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
St. 500	17-18	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Contr. (L)	19-20	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Contr. (M)	21-22	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	
Campione 1	23-24	100 µL	-	200 µL	200 µL		500 µL	

EXAMPLE OF GASTRIN STANDARD CURVE





REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F. , and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / 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-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURIA-Gastrin

Gastrin Radioimmunoassay
Endast för professionell användning

INTRODUKTION

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

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

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

KLINISKA ÖVERVÄGANDEN

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

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

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

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

Intervall: 11-54 pmol/L.

PRINCIPERNA BAKOM METODEN

Dessa reagens är avsedda för bestämning av gastrin i serum hos människa. Gastrin i serum bestäms genom kompetitiv radioimmunoanalys med ett antiserum från kanin som framtagits mot ett gastrin-17-albuminkonjugat. Gastrin i standarder och analysprov konkurrerar med ^{125}I -märkt gastrin-17 om bindning till antikropparna. ^{125}I -gastrin binder till antikropparna i omvärd proportion till mängden av gastrin i standarder och analysprov. Antikroppsbundet ^{125}I -gastrin separeras från den obundna fraktionen med hjälp av dubbel antikropp-polyetylenglykolteknik. Radioaktiviteten i fällningen mäts. Antiserum som används vid denna analys korsreagerar med gastrin-34 och de sulfaterade formerna av gastrin-17 och gastrin-34.

Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

VARNING

Endast för in vitro diagnostik

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

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

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

Följande säkerhetsåtgärder ska iakttas vid handhavande av radioaktivt material:

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

Reagensen i kitet innehåller natriumazid. Kontakt med avloppsrör av koppar eller bly kan resultera i ackumulerad bildning av mycket explosiva azidavlagringar. Vid utspolning av reagens i avloppet ska rikliga mängder vatten spolas med för att undvika uppkomst av metallisk azid. Rör som misstänks vara kontaminerade av explosiva avlagringar ska spolas/sköljas noggrant med 10% natriumhydroxidlösning.

REAGENSATSSENS INNEHÅLL

De reagens som medföljer varje sats räcker till 100 rör.

1. Anti-gastrin (reagens A)

Antiserum från kanin framtaget mot syntetiskt humant gastrin-17, konjugerat med bovin serumalbumin. 21 mL antiserum. Spädningsmedel: 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid. Färg: Gult.
Till 100 rör.

2. ¹²⁵I-gastrin (reagens B)

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

3. Dubbel antikropp-PEG (reagens C)

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

4. Analysbuffert (reagens D)

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

5. Gastrinstandard (reagens E)

Frystorkat. 5.00 mL standard efter rekonstituering. Koncentration: 500 pmol/L.
Standarden framställs av syntetiskt humant gastrin-17. Den har späts med 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin och 0.05% natriumazid.
Rekonstitueras med 5 mL destillerat vatten.

6. Kontrollprov (reagens F-G)

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

UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

Engångsprovror 11-13 x 55 mm, polystyren.
Pipetter med engångsspetsar, 100, 200 och 500 µL.
Tillsatsen av reagens underlättas av tillgång till en repeterande pipett, t ex Eppendorf Multipipette, för volymerna 200 och 500 µL
Vortexblandare.
Centrifug som klarar minst 1700 x g (helst en kyld centrifug).
Gammaräknare.

BEREDNING OCH FÖRVARING AV REAGENS

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

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

Reagens A: Anti-gastrin

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

Reagens B: ¹²⁵I-gastrin

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

Reagens C: Dubbel antikropp-PEG

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

Reagens D: Analysbuffert

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

Reagens E: Gastrinstandard

Rekonstitueras med 5.00 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.
För beredning av gastrin-standardpunkterna se analysprocedur.

Reagens F-G: Kontrollprov

Varje ampull rekonstitueras med 1.00 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

PROVTAGNING

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

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

ANALYSPROCEDUR

Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna.

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

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

Kontrollprov (C-rör): Låg och hög.

Analysprov (P-rör):

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

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

En översikt återfinns på sidan 76.

GENOMFÖRANDE

- Späd de frystorkade reagenserna enligt instruktionen på sidan 71. Reagensen ska vara rumstempererade vid användning.
- Bered Gastrinstandardpunkterna genom spädning av Gastrinstandarden med koncentrationen 500 pmol/L (Reagens E) i analysbuffert (Reagens D) enligt följande exempel:
 - a. Reagens E = 500pmol/L
 - b. 1.00 mL standard 500 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 250 pmol/L
 - c. 1.00 mL standard 2.50 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 125 pmol/L
 - d. 1.00 mL standard 125 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 62,5 pmol/L
 - e. 1.00 mL standard 62,5 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 31,2 pmol/L
 - f. 1.00 mL standard 31,2 pmol/L + 1.00 mL analysbuffert = 15,6 pmol/L
 - g. Spädningsbuffert = 0 pmol/LFörvara standardpunkterna i -20° C eller lägre vid återanvändning.
- Pipettera 100 µL av standarder, kontrollprov och analysprov i respektive provrör. Pipettera 300 µL analysbuffert (reagens D) i NSB-standardprovrör.
- Pipettera 200 µL av ¹²⁵I-gastrin (reagens B) i samtliga rör. Sätt lock på TOT-rören och ta undan dem.
- Pipettera 200 µL av anti-gastrin (reagens A) i samtliga rör **utom** NSB- och TOT-rören.

- Blanda innehållet i rören noggrant med vortexblandare och inkubera sedan i 60 minuter vid rumstemperatur (20-25° C).
- Tillsätt 500 µL väl blandat dubbel antikropp-PEG (reagens C) i samtliga rör **utom** TOT. Blanda noggrant med vortexblandare och inkubera i 30-60 minuter vid rumstemperatur.
- Centrifugera i 15 minuter vid minst 1700 x g och 4° C.
- Dekantera supernatanten omedelbart efter centrifugering och mät radioaktiviteten i fällningen med gammareäknare.

BERÄKNINGAR

- Subtrahera medelvärdet av NSB-standardrörens CPM från CPM-värdena för replikaten av standardrören, analysproven och kontrollrören.
- Skapa en standardkurva genom att avsätta bunden fraktion, B/TOT, mot koncentrationen i gastrinstandarderna. På sidan 76 avbildas ett exempel på en standardkurva.
- Interpolera fram gastrinkoncentrationerna i kontrollproven och analysproven utgående från standardkurvan.
- Bildandet av standardkurvan och beräkningen av koncentrationer i analysproven kan göras med datorstöd. En spline-anpassning kan användas.

PRESTANDA**Känslighet**

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

Noggrannhet

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

Precision

Variationer inom analyser

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

Variationer mellan analyser (totalt)

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

SPECIFICITET

Följande korsreaktioner har uppmätts:

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

Interferens

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

KVALITETSKONTROLL

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

1. Uppmätt koncentration i kontrollproven

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

2. Total counts

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

3. Maximal bindning (B_0/TOT)

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

4. Icke-specifik bindning (NSB/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av icke-specifik bindning: $(\text{NSB}/\text{TOT}) \times 100$.
 $(\text{NSB}/\text{TOT}) \times 100$ är mindre än 5%.

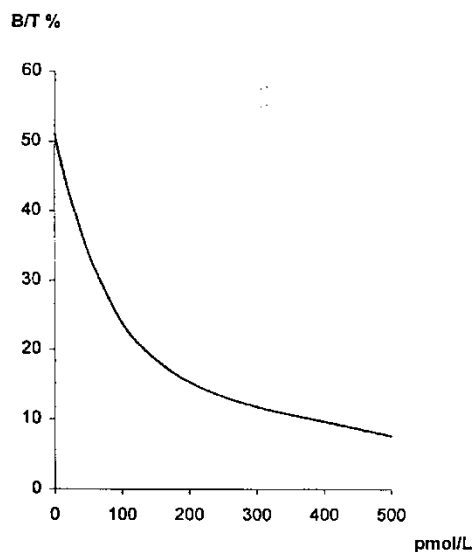
5. Lutningen på standardkurvan

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

SCHEMA ÖVER UTFÖRANDET

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

EXEMPEL PÅ GASTRIN STANDARDKURVA




REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30:221, 1972.
2. Stadil, F., and Rehfeld, J.F.
Determination of gastrin in serum: An evaluation of the reliability of a radioimmunoassay.
Scand. J. Gastroenterol. 8:101, 1973.
3. Rehfeld, J.F.
Three compounds of gastrin in human serum; gel filtration studies on the molecular size of immunoreactive serum gastrin.
Biochim. Biophys. Acta 285:364, 1972.
4. Rehfeld, J.F., Stadil, F.
Radioimmunoassay for gastrin employing immunosorbent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 31:459, 1973.
5. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Gel filtration studies on immunoreactive gastrin from Zollinger-Ellison patients.
Gut. 14:369, 1973.
6. Rehfeld, J.F., Stadil, F., and Vikelsøe, J.
Immunoreactive gastrin components in human serum.
Gut. 15:102, 1974.
7. Rehfeld, J.F.
Radioimmunoassay of gastrin.
In S.R. Bloom (ed.), Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York, 1978, pp. 145-148.
8. Rehfeld, J.F., and Stadil, F.
Big gastrins in the Zollinger- Ellison syndrome.
Lancet 2:1200, 1972.
9. Rehfeld, J.F., de Magistris, L., and Andersen, B.N.
Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity.
Regulatory Peptides. 2:333, 1981.
10. Rehfeld, J.F.
Gastrins and cholecystokinins in gut and brain.
Acta Pharmacol. Toxicol. 24:44, 1977.

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / 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-gastrin. Anti-gastrine. Anti-gastrina. Anti Gastrin. Anti-gastrin. Anti-gastrin.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-gastrin. Gastrine ¹²⁵ I. Gastrina I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Gastrin. ¹²⁵ I-gastrin. ¹²⁵ I-gastrin.
REAG	C	DAB		Double antibody – PEG solution. Solution de PEG double anticorps. Solución de Doble anticuerpo con PEG. Doppel-Antikörper-PEG. Double antibody-PEG solution. Dubbel antikropp-PEG lösning.
REAG	D	BUF	AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Assay buffer. Spädningsbuffert.
REAG	E	CAL	500	Gastrin standard 500 pmol/L. Standard de gastrine, 500 pmol/L. Estándar de gastrina 500 pmol/L. Gastrin Standard 500 pmol/L. Gastrin standard 500 pmol/L. Gastrinstandard 500 pmol/L.
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (normal). Témoin, niveau 1 (normal). Control, nivel 1 (normal). Kontrolle, Level 1 (normal). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (normal).
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato). Kontroll, nivå 2 (hög).

EURO DIAGNOSTICA AB

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