

Instruction

EURIA-NPY

Neuropeptide Y radioimmunoassay
For in vitro diagnostic use only



Document No.E-23-0030-13

February, 2016

EURIA-NPY

English:	page	2
Francais:	page	17
Espanol:	página	32
Deutsch:	Seite	47
Italiano:	pagina	62
Svenska	sida	77

REF RB 317

IVD



INTRODUCTION

Neuropeptide Y (NPY) is a 36 aminoacid residues peptide which was initially isolated from pig brain (1,2). NPY was later extracted from human adrenal-medullary phaeochromocytoma tissue. The human NPY differs from the pig NPY only by the replacement of leucine at position 17 by methionine (3). NPY shares considerable sequence homology with pancreatic polypeptide and peptide YY (4). NPY-like immunoreactivity has been found in the central nervous system and in peripheral noradrenergic neurons and intestinal neurons (5,6,7,8). Potent vasoconstrictor activity is exhibited by NPY (9). NPY also inhibits noradrenaline release via a presynaptic action (10) and has stimulatory effects on the contraction of the heart (11). Phaeochromocytoma tumours (3,12,13) contain NPY and elevated levels of NPY in plasma from phaeochromocytoma patients have been reported (14). Increased plasma concentrations of NPY have been found in patient with neuroblastoma (15). Increased plasma concentrations of NPY have also been found in pediatric B-cell precursor leukemia (16).

PRINCIPLE OF THE METHOD

The intended use of these reagents is for assay of NPY in human serum/plasma by direct assay without extraction. NPY in the serum/plasma samples is assayed by a competitive radioimmunoassay using an antiserum raised against synthetic NPY conjugated to bovine thyroglobulin. NPY in standards and samples compete with ^{125}I -labelled NPY in binding to the antibodies. ^{125}I -NPY binds in a reverse proportion to the concentration of NPY in standards and samples. Antibody-bound ^{125}I -NPY is separated from the unbound fraction by using double antibody coupled to solid phase. The radioactivity of the antibody-bound ^{125}I -NPY is measured. The antiserum used in this method crossreacts less than 2.0% with human Peptide YY.

For professional use within a laboratory.

CLINICAL CONSIDERATIONS

Increased serum/plasma concentrations of NPY have been found in patients with neuroblastoma (15). Increased serum/plasma concentrations of NPY have also been found in pediatric B-cell precursor leukemia (16).

Elevated levels of NPY have been found in serum/plasma from patients with phaeochromocytoma tumours (3,12,13). Assay of NPY in serum/plasma may serve as valuable tool in the diagnosis of neuroblastoma and pediatric B-cell precursor leukemia and phaeochromocytoma.

Normal level of NPY in human plasma

Subjects	Number	Range	Mean
Healthy normals (age 20-60 years)	109	36-120 pmol/L	74 pmol/L (SD= \pm 15)

Normal level obtained in healthy people in the age 20-60 years.

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-NPY (Reagent A)

Rabbit antiserum raised against NPY conjugated to bovine thyroglobulin. Lyophilized in 2.0 mL 0.5 M phosphate buffer, pH 7.4, with 2.5% human serum albumin, 2.5% EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium azide and 5000 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) per mL. For 100 tubes. Reconstitution in 22 mL distilled water.

Colour: Yellow.

2. ¹²⁵I-NPY (Reagent B)

Contains 28 KBq or 0.75 µCi at reference date. Synthetic, human NPY is iodinated according to Bolton-Hunter. The monoiodinated form is purified by HPLC. Specific activity: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilized in 2.5 mL 0.5 M phosphate buffer, pH 7.4, with 2.5% human serum albumin, 2.5% EDTA, 1.0% Tween 80, 0.5% sodium azide and 5000 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) per mL. Reconstitution in 25 mL distilled water.

Colour: Blue.

3. Double antibody solid phase (Reagent C)

Anti-rabbit-Ig coupled to cellulose particles in 0.01 M phosphate buffer pH 6.8 with 0.25% Human serum albumin, 0.045% NaCl, 0.05% NaN₃, 0.185% EDTA and 0.05% Tween 80. 11.0 mL suspension.

4. Standard diluent (Reagent D)

10.0 mL NPY-free human serum, lyophilized. Contains 500 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) per mL. Reconstitution in 10.0 mL distilled water. For preparation of NPY working standards.

5. NPY standard 3000 pmol/L (Reagent E)

Lyophilized. 2.00 mL standard. Concentration: 3000 pmol/L after reconstitution. The standard is produced from synthetic, human NPY. Lyophilized in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, with 0.25% human serum albumin, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.05% sodium azide and 500 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) per mL. For preparation of NPY working standards.

6. Assay buffer (Reagent F)

5.0 mL 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, with 0.25% human serum albumin, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.05% sodium azide and 500 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) per mL. To be used instead of antiserum in non-specific binding test tubes.

7. Controls (Reagent G-H)

Lyophilized serum controls with low and high concentration of NPY. 2.00 mL of each control after reconstitution. The NPY concentrations are given on the labels of the vials. Contains 0.05% sodium azide.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of lyophilized reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in a vial by gentle inversion and avoid foaming. The stability of the reagents is found on the labels of the vials. For lyophilized reagents the expiry dates are valid for the unreconstituted reagents. The reconstituted reagents are stable for 10 weeks (no longer than to the expiry date) if stored properly.

Reagent A: Anti-NPY

Reconstitute with 22 mL distilled water.
Store at 2-8° C.

Reagent B: ¹²⁵I-NPY

Reconstitute with 25 mL distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.

Reagent C: Double antibody solid phase

Ready for use. Stir continuously during pipetting of this reagent.
Store at 2-8° C.

Reagent D: Standard diluent

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

Reagent E: NPY standard, 3000 pmol/L

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

Reagent F: Assay buffer

Ready for use.
Store at 2-8° C.

Reagent G-H: Controls

Reconstitute with 2.00 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.

EQUIPMENT AND REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Disposable test tubes 11-13 x 55 mm, polystyrene

Pipettes with disposable tips, 100 and 200 μL

A repeating pipette, e.g. Eppendorf Multipipette, for volumes 100 and 200 μL will facilitate the dispensing of the reagents

Variable pipette 200-1000 μL

Vortex mixer

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

Gammacounter

Distilled water

SPECIMEN COLLECTION

Vein blood is collected in tubes without additives. The sample is allowed to clot. The serum is separated by centrifugation at $+4^{\circ}\text{C}$. The serum should be frozen at -20°C within 1 hour. The serum should be stored at -20°C or lower until assayed.

Plasma samples (EDTA or Heparin) can also be used but should not be diluted (dilution of plasma with the standard diluent may lead to clotting in the assay during incubation).

Repeated freezing and thawing should be avoided.

RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE

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

A complete assay includes:

Standards (St-tubes): 7 different concentrations; 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 and 300 pmol/L.

Controls (C-tubes): Controls with known concentrations of NPY.

Samples (P-tubes).

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

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

For an overview see table 1 on page 11.

PERFORMANCE

1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the NPY-working standards by dilution of the NPY-standard 3000 pmol/L (Reagent E) with the standard diluent (Reagent D) according to the following:
A/ 0.200 mL standard 3000 pmol/L + 1.800 mL diluent = 300 pmol/L
B/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL diluent = 150 pmol/L
C/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL diluent = 75 pmol/L
D/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL diluent = 37.5 pmol/L
E/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL diluent = 18.8 pmol/L
F/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL diluent = 9.4 pmol/L
G/ Standard diluent = 0 pmol/L.
Store the standard solutions at -18° C or lower if reused.
3. Pipette 200 µL of the standards (0-300 pmol/L), samples and controls in their respective tubes. Pipette 200 µL of the zero-standard in the NSB-tubes.
4. Pipette 200 µL anti-NPY (Reagent A) to all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
5. Add 200 µL assay buffer (Reagent F) to the NSB-tubes.
6. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
7. Pipette 200 µL ¹²⁵I-NPY (Reagent B) to all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
8. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
9. Pipette 100 µL double antibody-solid phase (Reagent C) to all tubes except the TOT-tubes. (stir continuously during pipetting).
10. Vortex-mix carefully and incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
11. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4° C (minimum 1700 x g).
12. Decant the supernatants immediately after centrifugation.
13. Count the radioactivity of the precipitates in a gamma counter (counting time: 2-4 minutes).

CALCULATION OF RESULTS

1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding tubes from the count rates (CPM) of the replicates of standards, controls and samples.
2. A standard curve is generated by plotting the precipitated CPM, bound fraction in CPM or % B/TOT against the concentrations of the NPY-standards. An example of a standard curve is given on page 12.
3. Interpolate the NPY concentrations of the samples and controls from the generated standard curve.
4. The standard curve and the calculations of the concentrations in samples and controls can also be done by a computer method.

DILUTION OF SAMPLES

Serum samples with NPY concentrations above 300 pmol/L should be diluted with standard diluent (reagent D) for determination of the real concentration of NPY.

The following procedure is recommended:

Dilution 1:2: Pipette 100 μ L sample and 100 μ L standard diluent in the assay tube (perform in duplicate).

Dilution 1:4: Pipette 50 μ L sample and 150 μ L standard diluent in the assay tube (perform in duplicate).

ASSAY CHARACTERISTICS

Sensitivity

The lowest detectable concentration is 3 pmol/L. The figure corresponds to a decrease in binding of 2 x SD of the bound radioactivity in the zero-concentration standard.

Accuracy

A mean recovery of 82.4% (range 75-88%) was achieved in the assay of plasma samples with known amounts of NPY added. NPY was added in the range: 50-150 pmol/L.

Precision

Intra assay variation

<u>Level</u>	<u>Coefficient of variation (%CV)</u>	<u>N</u>
43.7 pmol/L	5.0	8
98.9 pmol/L	4.5	8

Inter assay variation (total variation)

<u>Level</u>	<u>Coefficient of variation (%CV)</u>	<u>N</u>
42.4 pmol/L	9.2	6
90.2 pmol/L	7.6	6

Specificity

The following cross-reactions with related peptides have been found:

Compound	Cross-reaction
Neuropeptide Y, human	100.0%
Peptide YY, human	<0.1%
Pancreatic Polypeptide, human	<0.1%
PYY 3-36	<0.1%
NPY 22-36	<0.1%
PP Bovine	<0.1%

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. Controls

The found concentrations of the controls (reagent G and H) should be within the limits given on the labels of the vials.

2. Total counts (TOT)

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of ^{125}I -NPY in this kit will give 10 500 CPM (-5% to +20%) at the activity reference date (counter efficiency = 80%).

3. Maximum binding (Bo/TOT)

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

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

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

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

$$\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100 \text{ is less than } 8\%.$$

5. Shape of standard curve

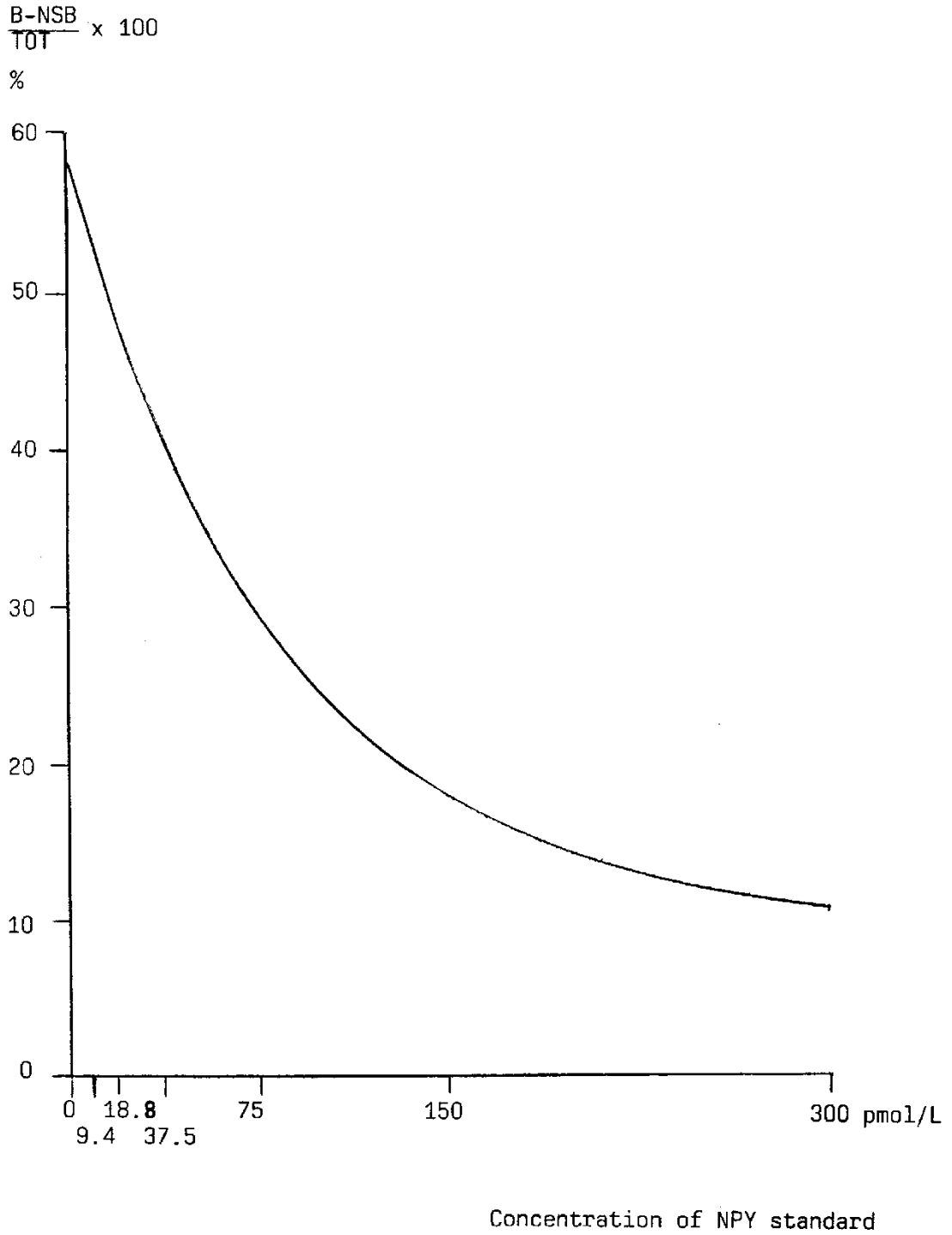
For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the standard line for run to run reproducibility.

OUTLINE OF THE RIA PROCEDURE

Type of tubes	Tube no	Standard sample or control	Anti-NPY (A)	Assay buffer (F)		¹²⁵ I-NPY (B)		Double antibody solid phase (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortex-	200 µL	Vortex-	-	Vortex-mix
NSB	3-4	200 µL	-	200	mix and	200 µL	mix and	100 µL	and
Stand 0	5-6	200 µL	200 µL	-	incubate	200 µL	incubate	100 µL	incubate
Stand 9.4	7-8	200 µL	200 µL	-	for 20-24	200 µL	for 20-24	100 µL	for 30-60
Stand 18.8	9-10	200 µL	200 µL	-	hours at	200 µL	hours at	100 µL	min. at
Stand 37.5	11-12	200 µL	200 µL	-	2-8° C.	200 µL	2-8° C.	100 µL	2-8° C.
Stand 75	13-14	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	Centrifuge
Stand 150	15-16	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	15 min. at
Stand 300	17-18	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	1700 x g at
Control (G)	19-20	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	+4° C.
Control (H)	21-22	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	Decant and
Sample 1	23-24	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	count the
Sample 2	25-26	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	radioactivi- ty of the precipitates.

Table 1

EXAMPLE OF NPY STANDARD CURVE




REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Tatemoto, K.
Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 79:5485, 1982
2. Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.
Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptides.
Nature (London) 296: 659, 1982.
3. Corder, R., Emson, P.C. and Lowry, P.J.
Purification and characterization of human neuropeptide Y from adrenal medullary pheochromocytoma tissue.
Biochem J 219:699, 1984.
4. Tatemoto, K.
Isolation and characterization of peptide YY (PYY) a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc Natl Acad Sci USA 79:2514, 1982.
5. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T. et al.
Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.
Acta Physiol Scand 116:477, 1982.
6. Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M. et al.
Neuropeptide Y distribution in rat brain.
Science 221:877, 1983.
7. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt T. and Goldstein, M.
High levels of neuropeptide Y (NPY) in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.
Neurosci Lett 42:167, 1983.
8. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C. et al.
Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract.
Cell Tissue Res 234:71, 1983.
9. Lundberg, J.M. and Tatemoto, K.
Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol Scand 116:393, 1982.
10. Lundberg, J.M. and Stjärne, L.
Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and contractile response evoked by fieldstimulation in rat vas deference.
Acta Physiol Scand 120:477, 1984.

11. Lundberg, J.M., Hua, X.Y. and Franco-Cereceda, A.
Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig.
Acta Physiol Scand 121:325, 1984.
12. Adrian, T.E., Terenghi, G., Brown, M.J. et al.
Neuropeptide Y in pheochromocytomas and ganglioneuroblastomas.
Lancet ii:540, 1983.
13. Emson, P.C., Corder, R. and Lowry, P.J.
Demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human pheochromocytoma extracts.
Regulatory Peptides 8:89, 1984.
14. Theodorsson-Norheim, E., Hemsen, A. and Lundberg, J.M.
Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): Chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts.
Scand J Clin Lab Invest 45:355, 1985.
15. Kogner, P., Björk, O. and Theodorsson, E.
Neuropeptide Y in neuroblastoma: Increased concentration in metastasis, release during surgery, and characterization of plasma and tumour extracts.
Medical and Pediatric Oncology 21:317-322, 1993.
16. Kogner, P., Ericsson, A., Barbany, G., Persson, H., Theodorsson, E. and Björk, O.
Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia.
Blood, vol. 80, no. 5 (september 1), 1992:pp 1324-1329.
17. Kalra, S.P., Gube, M.G., Bin Xu, S.P., Horvath, T.L. and Kalra P.S.
Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight.
Endocrine reviews 20(1):68-100, (1999).
18. Kallio, J., Pesonen, U., Kaipio, K., Karvonen, M.K., Jaakkola, U, Heinonen, O.J., Uusitupa, M.I.J. and Koulu, M.
Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans.
The FASEB Journal express article 10.1096/fj. 00-0437 fje. Published online March 12, 2001.

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-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY.
REAG B Ag ¹²⁵I	¹²⁵ I-NPY. Anti-NPY. NPY-I ¹²⁵ . ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY.
REAG C DASP	Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps Doble anticuerpo en fase sólida. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente degli standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 3000	NPY standard 3000 pmol/L. Standard de NPY, 3000 pmol/l. NPY estándar de 3000 pmol/L. NPY Standard 3000 pmol/L. NPY standard 3000 pmol/L. NPY-standard 3000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H 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-NPY

Dosage immunoradiologique du neuropeptide Y
À usage professionnel uniquement

INTRODUCTION

Le neuropeptide Y (NPY) est un peptide de 36 résidus d'acide aminé ayant été, à l'origine, isolé à partir du cerveau de cochon (1,2). Le NPY fut ensuite extrait du tissu adrénomédullaire de phéochromocytome humain. Le NPY humain diffère uniquement du NPY porcin par le remplacement de la leucine par la méthionine en position 17 (3). Le NPY a en commun une homologie séquentielle considérable avec le polypeptide pancréatique et le peptide YY (4). On a trouvé une immunoréactivité analogue au NPY dans le système nerveux central et dans les neurones intestinaux et les neurones noradrénergiques périphériques (5,6,7,8). Le NPY exhibe une activité vasoconstrictrice puissante (9). Le NPY exhibe également une libération de noradrénaline via une action présynaptique (10) et a des effets stimulatoires sur les contractions du cœur (11). Les phéochromocytomes (3,12,13) contiennent du NPY et des niveaux élevés de NPY ont été rapportés dans le plasma de patients atteints de ces tumeurs (14). Des concentrations plasmatiques de NPY élevées ont été trouvées chez des patients atteints de neuroblastomes (15). Des concentrations plasmatiques de NPY élevées ont également été trouvées chez des patients pédiatriques atteints de leucémie à précurseur de cellules B (16).

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Ces réactifs sont indiqués pour le dosage du NPY dans le sérum ou le plasma humain sous forme de dosage direct sans extraction. Le NPY des échantillons sériques/plasmatiques est analysé par dosage immunoradiologique compétitif intégrant un antisérum dirigé contre du NPY synthétique conjugué à de la thyroglobuline bovine. Le NPY des standards et échantillons entre en concurrence avec le NPY marqué à l'iode 125 (NPY ¹²⁵I) dans la liaison aux anticorps. Le NPY marqué à l'iode 125 se lie en proportion inverse à la concentration de NPY des standards et des échantillons. Le NPY marqué à l'iode 125 (NPY ¹²⁵I) lié à l'anticorps est séparé de la fraction non liée par la technique de phase solide à double anticorps. La radioactivité du NPY ¹²⁵I lié à l'anticorps est mesurée. L'antisérum utilise dans cette méthode produit une réaction croisée inférieure à 2,0% avec le Peptide YY humain.
À usage professionnel en laboratoire.

CONSIDÉRATIONS CLINIQUES

Des concentrations sériques/plasmatiques de NPY élevées ont été trouvées chez des patients atteints de neuroblastomes (15). Des concentrations sériques/plasmatiques de NPY élevées ont également été trouvées chez des patients pédiatriques atteints de leucémie à précurseur de cellules B (16).

Des niveaux élevés de NPY ont été trouvés dans le sérum/plasma des patients atteints de phéochromocytomes (3,12,13). Le dosage du NPY dans le sérum/plasma peut donc être un outil utile dans le diagnostic des neuroblastomes, de la leucémie pédiatrique à précurseur de cellules B ainsi que des phéochromocytomes.

Niveau normal de NPY dans le plasma humain

Sujets	Nombre	Plage Moyenne
Normaux sains (âges 20-60 ans)	109	36-120 pmol/l 74 pmol/l (S= ± 15)

Niveau normal obtenu chez les personnes saines âgées de 20 à 60 ans.

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}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-NPY (Réactif A)

Antisérum de lapin dirigé contre du NPY conjugué à de la thyroglobuline bovine. Lyophilisé dans un tampon de phosphate 0,5 M de 2,0 ml (pH 7,4), avec 2,5 % d'albumine sérique humaine, 2,5% EDTA, 1,0% Triton X-100, 0,5% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylo[®] ou équivalent) dosé à 5000 KIU par ml. Pour 100 tubes. Reconstitution dans 22 ml d'eau distillée.

Couleur : Jaune.

2. NPY ¹²⁵I (Réactif B)

Contient 28 KBq ou 0,75 µCi à la date de référence. NPY humain synthétique iodé selon Bolton-Hunter. 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, 2,5% EDTA, 1,0% Tween 80, 0,5% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylo[®] ou équivalent) dosé à 5000 KIU par ml. Reconstitution dans 25 ml d'eau distillée.

Couleur : Bleu.

3. Phase solide à double anticorps (Réactif C)

Anti-Ig de lapin couplée à des particules de cellulose avec 0,01 M tampon phosphate pH 6,8 avec 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,045% de NaCl, 0,05% de NaN₃, 0,185% d'EDTA et 0,05% de Tween 80. Suspension de 11,00 ml.

4. Diluant standard (Réactif D)

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

5. Standard de NPY 3000 pmol/l (Réactif E)

Lyophilisé. Standard de 2,00 ml. Concentration: 3000 pmol/l après reconstitution. Le standard est produit à partir de NPY synthétique humain. Lyophilisé dans un tampon de phosphate 0,5 M (pH 7,4), avec 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,25% EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,05% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylo[®] ou équivalent) dosé à 500 KIU par ml. Pour la préparation des standards de travail NPY.

6. Tampon d'immunodosage (Réactif F)

Tampon de phosphate 0,05 M de 5,0 ml (pH 7,4), avec 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,25% EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,05% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylo[®] ou équivalent) dosé à 500 KIU par ml.

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

7. Témoins (Réactif G-H)

Témoins de sérum lyophilisé avec des concentrations basses et élevés de NPY. 2,00 ml de chaque témoin après reconstitution. Les concentrations de NPY sont indiquées sur les étiquettes des flacons.

Contient 0,05% d'azoture de sodium.

PRÉPARATION ET ENTREPOSAGE DES RÉACTIFS

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

Réactif A: Anti-NPY

Reconstituer avec 22 ml d'eau distillée.
Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif B: NPY ¹²⁵I

Reconstituer avec 25 ml d'eau distillée.
Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

Réactif C: Phase solide à double anticorps

Prêt à l'emploi. Agiter continuellement pendant le pipetage de ce réactif.
Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif D: Diluant standard

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

Réactif E: Standard de NPY, 3000 pmol/l.

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

Réactif F : Tampon de dosage

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

Réactif G-H : Témoins

Reconstituer avec 2,00 ml d'eau distillée. Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS NÉCESSAIRES ET NON FOURNIS

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

Pipettes à embouts jetables, 100 et 200 µl.

L'utilisation d'une pipette à répétition, comme par exemple la Multipipette Eppendorf , pour des volumes de 100 et 200 µl facilitera le versement des réactifs.

Pipette à volume variable 200-1000 µl

Agitateur vortex

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

Compteur de rayons gamma

Eau distillée

COLLECTE DE SPECIMENS

Le sang veineux est recueilli dans des tubes sans additifs. On laisse l'échantillon coaguler. Le sérum est séparé par centrifugation à +4°C. Il doit être congelé à -20°C dans l'heure qui suit. Il devra être entreposé à une température de -20°C ou inférieure jusqu'à son analyse.

Les échantillons de plasma (EDTA ou héparinés) pourront être utilisés mais ne devront pas être dilués (la dilution du plasma avec le diluant standard pourra provoquer une coagulation dans le dosage durant l'incubation).

Éviter de congeler et décongeler à répétition.

PROCÉDURE DE DOSAGE IMMUNORADIOLOGIQUE

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; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 150 et 300 pmol/l.

Témoins (C-tubes) : Témoins avec des concentrations de NPY connues.

Échantillons (P-tubes).

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

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

Voir le tableau 1 en page 26 pour un aperçu.

PERFORMANCE

1. Reconstituer les réactifs conformément aux instructions.
2. Préparer les standards de travail de NPY en diluant le standard NPY de 3000 pmol/l (Réactif E) avec le diluant standard (Réactif D) conformément aux indications suivantes :
 - A/ 0,200 ml de standard 3000 pmol/l + 1,800 ml de diluant = 300 pmol/l
 - B/ 1,00 ml de standard 300 pmol/l + 1,00 ml de diluant = 150 pmol/l
 - C/ 1,00 ml de standard 150 pmol/l + 1,00 ml de diluant = 75 pmol/l
 - D/ 1,00 ml de standard 75 pmol/l + 1,00 ml de diluant = 37,5 pmol/l
 - E/ 1,00 ml de standard 37,5 pmol/l + 1,00 ml de diluant = 18,8 pmol/l
 - F/ 1,00 ml de standard 18,8 pmol/l + 1,00 ml de diluant = 9,4 pmol/l
 - G/ Diluant standard = 0 pmol/l.
 Entreposer les solutions standard à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
3. Pipeter 200 µl des standards (0-300 pmol/l), échantillons et témoins dans leur tubes respectifs. Pipeter 200 µl du standard d'étalonnage zéro dans les NSB-tubes.
4. Pipeter 200 µl d'anti-NPY (Réactif A) dans tous les tubes à l'exception des tubes NSB et TOT-tubes.
5. Ajouter 200 µl de tampon de dosage (Réactif F) dans les tubes NSB.
6. Vortexer et incubé pendant 20-24 heures à 2-8° C.
7. Pipeter 200 µl de NPY ¹²⁵I (réactif B) dans tous les tubes Les TOT-tubes sont hermétiquement fermés et mis de côté.
8. Vortexer et incubé pendant 20-24 heures à 2-8° C.
9. Ajouter 100 µl de phase solide à double anticorps (Réactif C) à tous les tubes à l'exception des TOT-tubes. (Agiter continuellement pendant le pipetage).
10. Vortex en faisant attention et incubé pendant 30-60 minutes à 2-8° C.
11. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4° C (1700 x g minimum).
12. Décanter les surnageants immédiatement après la centrifugation.
13. Compter la radioactivité des précipités dans un compteur de rayons gamma (temps de comptage : 2-4 minutes).

CALCUL DES RÉSULTATS

1. Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes de liaison non-spécifique du taux de comptage (CPM) des réplicats des standards, témoins et échantillons.
2. Une courbe standard est produite en reportant le tracé du CPM précipité, fraction liée (en coups par minute ou % B/TOT) par rapport aux concentrations des standards de NPY. Un exemple de courbe standard est donné en page 27.
3. Interpoler les concentrations de NPY dans les échantillons et témoins à partir de la courbe standard produite.
4. La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons et témoins peuvent également être effectués par méthode informatique.

DILUTION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de sérum dont les concentrations sont supérieures à 300 pmol/l devront être dilués avec le diluant standard (Réactif D) afin de déterminer la concentration réelle de NPY.

La procédure suivante est recommandée :

Dilution 1/2: Pipeter 100 μ L d'échantillon et 100 μ L de diluant standard dans le tube à essai (dupliquer).

Dilution 1/4: Pipeter 50 μ L d'échantillon et 150 μ L de diluant standard dans le tube à essai (dupliquer).

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Sensibilité

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

Exactitude

Un rendement moyen de 82,4% (plage 75-88%) a été obtenu en dosant des échantillons de plasma auxquels avaient été ajoutées des quantités connues de NPY. Le NPY a été ajouté dans la plage : 50-150 pmol/l.

Précision

Variation intra-dosage :

Niveau	Coefficient de variation (%CV)	N
43,7 pmol/l	5.0	8
98,9 pmol/l	4.5	8

Variation inter-dosages (variation totale)

Niveau	Coefficient de variation (%CV)	N
42,4 pmol/l	9.2	6
90,2 pmol/l	7.6	6

Spécificité

On a trouvé les réactions croisées suivantes avec les peptides associés :

Composé	Réaction croisée
Neuropeptide Y humain	100.0%
Peptide YY humain	<0.1%
Polypeptide pancréatique humain	<0.1%
PYY 3-36	<0.1%
NPY 22-36	<0.1%
PP Bovin	<0.1%

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. Témoins

Les concentrations trouvées dans les témoins (Réactif G et H) devront se situer dans les limites figurant sur les étiquettes des flacons.

2. Coups totaux (TOT)

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 NPY¹²⁵I de ce kit produira 10 500 CPM (-5 à +20%) à la date de référence de l'activité (efficacité de comptage = 80%).

3. Liaison maximale (Bo/TOT)

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

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

4. Liaison non-spécifique (NSB/TOT)

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

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100 \text{ est inférieur à } 8\%.$$

5. Forme de la courbe standard

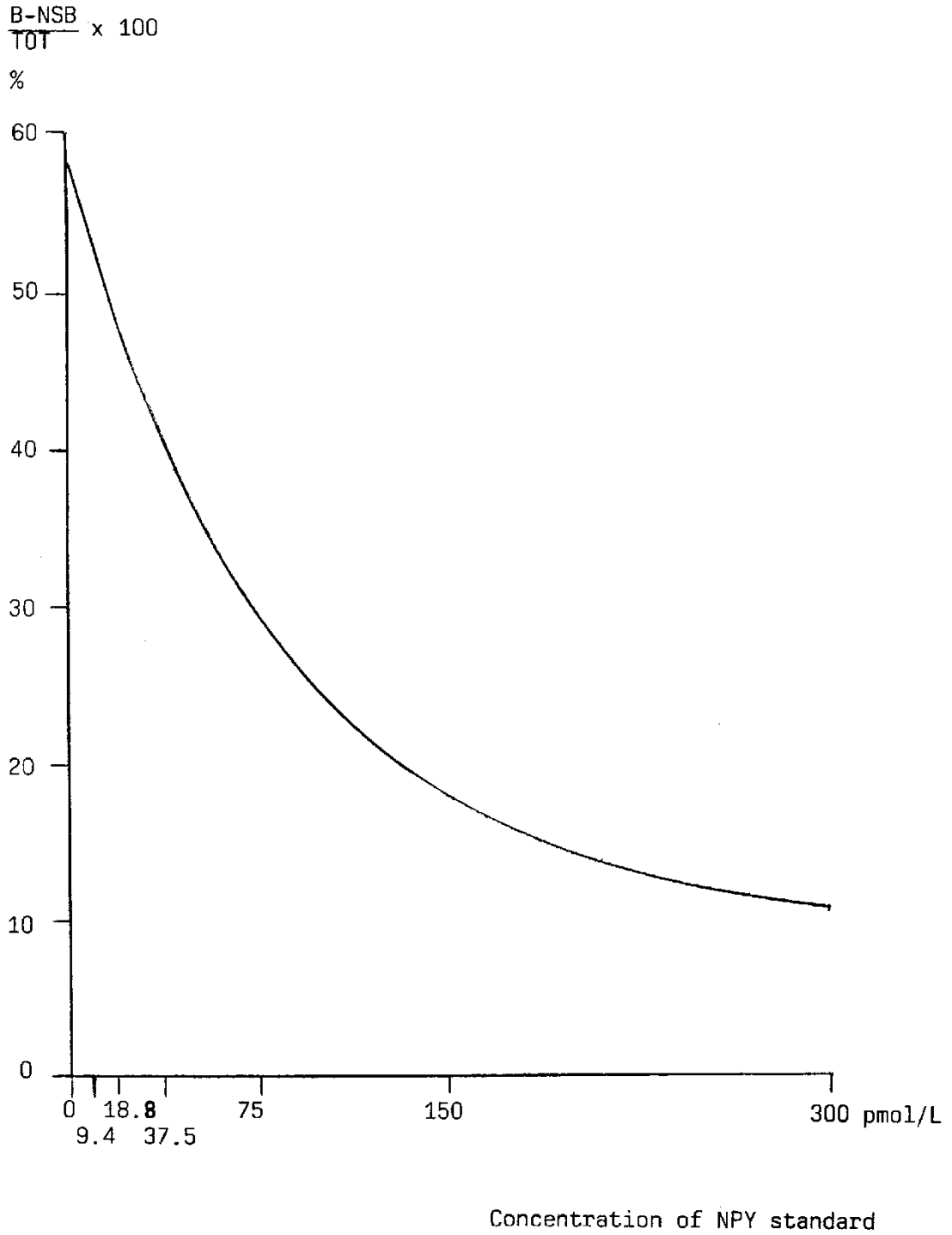
Par exemple, surveiller les points 80, 50 et 20% de la ligne standard pour la reproductibilité inter-séries.

CADRE DE LA PROCÉDURE RIA

Type de tubes	Tube (n°)	Standard Échantillon ou témoin	Anti-NPY (A)	Tampon de dosage (F)		NPY 125 _I (B)		Phase solide à double anticorps (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexer	200 µl	Vortexer	-	Vortexer et
NSB	3-4	200 µl	-	200	et	200 µl	et	100 µl	incuber
Stand 0	5-6	200 µl	200 µl	-	incuber	200 µl	incuber	100 µl	pendant 30-
Stand 9,4	7-8	200 µl	200 µl	-	pendant	200 µl	pendant	100 µl	60
Stand 18,8	9-10	200 µl	200 µl	-	20-24	200 µl	20-24	100 µl	mn. à
Stand 37,5	11-12	200 µl	200 µl	-	heures à	200 µl	heures à	100 µl	2-8° C.
Stand 75	13-14	200 µl	200 µl	-	2-8° C.	200 µl	2-8° C.	100 µl	Centrifuger
Stand 150	15-16	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	15 mn. à
Stand 300	17-18	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	1700 x g à
Témoin (G)	19-20	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	+4° C.
Témoin (H)	21-22	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	Décanter et
Échantillon 1	23-24	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	compter la
Échantillon 2	25-26	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	radioactivi-
		200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	té des
									précipités

Tableau 1

EXAMPLE OF NPY STANDARD CURVE




REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Tatemoto, K.
Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 79:5485, 1982
2. Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.
Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptides.
Nature (London) 296: 659, 1982.
3. Corder, R., Emson, P.C. and Lowry, P.J.
Purification and characterization of human neuropeptide Y from adrenal medullary pheochromocytoma tissue.
Biochem J 219:699, 1984.
4. Tatemoto, K.
Isolation and characterization of peptide YY (PYY) a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc Natl Acad Sci USA 79:2514, 1982.
5. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T. et al.
Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.
Acta Physiol Scand 116:477, 1982.
6. Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M. et al.
Neuropeptide Y distribution in rat brain.
Science 221:877, 1983.
7. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt T. and Goldstein, M.
High levels of neuropeptide Y (NPY) in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.
Neurosci Lett 42:167, 1983.
8. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C. et al.
Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y - and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract.
Cell Tissue Res 234:71, 1983.
9. Lundberg, J.M. and Tatemoto, K.
Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol Scand 116:393, 1982.
10. Lundberg, J.M. and Stjärne, L.
Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and contractile response evoked by fieldstimulation in rat vas deference.
Acta Physiol Scand 120:477, 1984.

11. Lundberg, J.M., Hua, X.Y. and Franco-Cereceda, A.
Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deference and urinary bladder of the guinea-pig.
Acta Physiol Scand 121:325, 1984.
12. Adrian, T.E., Terenghi, G., Brown, M.J. et al.
Neuropeptide Y in phaeochromocytomas and ganglioneuroblastomas.
Lancet ii:540, 1983.
13. Emson, P.C., Corder, R. and Lowry, P.J.
Demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human phaeochromocytoma extracts.
Regulatory Peptides 8:89, 1984.
14. Theodorsson-Norheim, E., Hemse'n, A. and Lundberg, J.M.
Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): Chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts.
Sand J Clin lab Invest 45:355, 1985.
15. Kogner, P., Björk, O. and Theodorsson, E.
Neuropeptide Y in neuroblastoma: Increased concentration in metastasis, release during surgery, and characterization of plasma and tumour extracts.
Medical and Pediatric Oncology 21:317-322, 1993.
16. Kogner, P., Ericsson, A., Barbany, G., Persson, H., Theodorsson, E. and Björk, O.
Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia.
Blood, vol. 80, no. 5 (september 1), 1992:pp 1324-1329.
17. Kalra, S.P., Gube, M.G., Bin Xu, S.P., Horvath, T.L. and Kalra P.S.
Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight.
Endocrine reviews 20(1):68-100, (1999).
18. Kallio, J., Pesonen, U., Kaipio, K., Karvonen, M.K., Jaakkola, U, Heinonen, O.J., Uusitupa, M.I.J. and Koulu, M.
Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of prepronoreuropeptide Y in humans.
The FASEB Journal express article 10.1096/fj. 00-0437 fje. Published online March 12, 2001.

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-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY.
REAG B Ag ¹²⁵I	¹²⁵ I-NPY. Anti-NPY. NPY-I ¹²⁵ . ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY.
REAG C DASP	Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps Doble anticuerpo en fase sólida. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente degli standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 3000	NPY standard 3000 pmol/L. Standard de NPY, 3000 pmol/l. NPY estándar de 3000 pmol/L. NPY Standard 3000 pmol/L. NPY standard 3000 pmol/L. NPY-standard 3000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H 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-NPY

Radioinmunoensayo para la determinación del neuropéptido Y
Sólo para uso profesional

INTRODUCCIÓN

El neuropéptido Y (NPY) es un péptido de 36 residuos de aminoácidos que inicialmente se aisló en el cerebro del cerdo (1,2). Posteriormente el NPY se extrajo del tejido feocromocitómico suprarrenal-medular humano. El NPY humano difiere del NPY del cerdo solamente en la sustitución de la leucina en la posición 17 por la metiona (3). El NPY tiene una homología secuencial considerable con el polipéptido pancreático y el péptido YY (4). Se ha detectado inmunorreactividad tipo NPY en el sistema nervioso central y en neuronas noradrenérgicas periféricas y neuronas intestinales (5,6,7,8). El NPY presenta una potente actividad vasoconstrictora (9). El NPY también inhibe la liberación de noradrenalina actuando a nivel presináptico (10) y tiene efectos estimuladores sobre la contracción del corazón (11). Los tumores feocromocitómicos (3,12,13) contienen NPY, y en los pacientes afectados de feocromocitoma se han detectado niveles elevados de NPY en plasma (14). Se han encontrado concentraciones incrementadas de NPY en plasma en un paciente con neuroblastoma (15). También se han detectado niveles incrementados de NPY en plasma en la leucemia pediátrica de células precursoras B (16).

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aplicación de estos reactivos es la determinación del NPY en suero o plasma humanos mediante ensayo directo sin extracción. El NPY de las muestras de suero o plasma se analiza mediante un radioinmunoensayo competitivo utilizando un antisuero que se enfrenta al NPY sintético conjugado con tiroglobulina bovina. El NPY de los estándares y muestras compiten con el NPY marcado con I-¹²⁵ por la fijación a los anticuerpos. El NPY I-¹²⁵ se fija en proporción inversa a la concentración de NPY de los estándares y las muestras. El NPV I-¹²⁵ fijado a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada utilizando un doble anticuerpo acoplado a fase sólida. Seguidamente, se mide la radiactividad del NPY I-¹²⁵ fijado a los anticuerpos. El antisuero utilizado en este método presenta una reacción cruzada con el péptido YY humano inferior al 2%.

Sólo para uso profesional en el laboratorio.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Se han detectado concentraciones incrementadas de NPY en suero o plasma en pacientes afectados de neuroblastoma (15). También se han detectado concentraciones de NPY incrementadas en la leucemia pediátrica de células precursoras B (16).

Se han encontrado niveles elevados de NPY en suero o plasma en pacientes con tumores feocromocitómicos (3,12,13). El ensayo de NPY en suero o plasma puede ser una herramienta muy valiosa en el diagnóstico del neuroblastoma, la leucemia pediátrica de células precursoras B y los feocromocitomas.

Nivel normal de NPY en plasma humano

Sujetos	Cantidad	Rango	Media
Normales saludables (20-60 años)	109	36-120 pmol/L	74 pmol/L (SD= ± 15)

Nivel normal obtenido en personas sanas de 20 a 60 años de edad.

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 acumulaciones de 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 correspondientes.

COMPOSICIÓN DEL KIT

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

1. Anti-NPY (Reactivo A)

Antisuero de conejo enfrentado a NPY conjugado con tiroglobulina bovina. Liofilizado en 2 mL de tampón fosfato de 0,5 M y pH de 7,4, con 2,5% de albúmina de suero humano, 2,5% de EDTA, 1% de Tritón X-100, 0,5% de azida sódica y 5000 KIU de aprotinina (Trasylo® o equivalente) por mL. Para 100 tubos. Reconstituir en 22 mL de agua destilada.

Color: Amarillo

2. NPY I-¹²⁵ (Reactivo B)

Contiene 28 KBq o 0,75 µCi en la fecha de referencia. NPY humano sintético iodado de acuerdo con la técnica de Bolton-Hunter. La forma monoiodada está purificada mediante HPLC. Actividad específica: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Liofilizado en 2,5 mL de tampón fosfato de 0,5 M y pH de 7,4, con 2,5% de albúmina de suero humano, 2,5% de EDTA, 1% de Tween 80, 0,5% de azida sódica y 5000 KIU de aprotinina (Trasylo® o equivalente) por mL. Reconstituir en 25 mL de agua destilada.

Color: Azul

3. Doble anticuerpo en fase sólida (Reactivo C)

Anti -IgG de conejo unido a partículas de celulosa con 0,01 M tampón fosfato pH 6,8 con 0,25% de albúmina de suero humano, 0,045% de NaCl, 0,05% de NaN₃, 0,185% de EDTA y 0,05% de Tween 80. Suspensión de 11 mL.

4. Diluyente estándar (Reactivo D)

10 mL de suero humano carente de NPY, liofilizado. Contiene 500 KIU de aprotinina (Trasylo® o equivalente) por mL. Reconstituir en 10 mL de agua destilada. Para la preparación de los estándares de trabajo del NPY.

5. Estándar de NPY de 3000 pmol/L (Reactivo E)

Liofilizado. 2 mL de estándar. Concentración: 3000 pmol/L después de la reconstitución. El estándar se produce a partir de NPY humano sintético. Liofilizado en tampón fosfato de 0,5 M y pH de 7,4, con 0,25% de albúmina de suero humano, 0,25% de EDTA, 0,1% de Tritón X-100, 0,05% de azida sódica y 500 KIU de aprotinina (Trasylo® o equivalente) por mL. Para la preparación de los estándares de trabajo del NPY.

6. Tampón del ensayo (Reactivo F)

5 mL de tampón fosfato de 0,05 M y pH de 7,4, con 0,25% de albúmina de suero humano, 0,25% de EDTA, 0,1% de Tritón X-100, 0,05% de azida sódica y 500 KIU de aprotinina (Trasylo® o equivalente) por mL.

Para utilizarlo en vez del antisuero en los tubos de ensayo de fijación no específica.

7. Controles (Reactivos G-H)

Controles de suero liofilizado con concentraciones bajas y altas de NPY. 2 mL de cada control después de la reconstitución. Las concentraciones de NPY figuran en las etiquetas de los viales.

Contiene 0,05% de azida sódica.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

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

Reactivo A: Anti-NPY

Reconstituir con 22 mL de agua destilada.
Conservar a 2-8° C.

Reactivo B: NPY I-¹²⁵

Reconstituir con 25 mL de agua destilada.
Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivo C: Doble anticuerpo en fase sólida

Listo para su uso. Agitar el reactivo mientras se pipeta.
Conservar a 2-8° C.

Reactivo D: Diluyente estándar

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

Reactivo E: Estándar NPY de 3000 pmol/L

Reconstituir con 2 mL de agua destilada.
Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
Para la preparación de los estándares de trabajo del NPY, véase el procedimiento del radioinmunoensayo.

Reactivo F: Tampón del ensayo

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

Reactivos G-H: Controles

Reconstituir con 2 mL de agua destilada. Conservar a - 18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

REACTIVOS Y MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

Tubos de ensayo de polistireno desechables de 11-13 x 55 mm.

Pipetas con puntas desechables: 100 y 200 μ L.

Una pipeta de repetición, por ejemplo una Multipipeta de Eppendorf, para volúmenes de 100 y 200 μ l facilitará la operación de dosificación de los reactivos

Pipeta variable de 200-1000 μ l

Agitador

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

Contador gamma.

Agua destilada.

RECOGIDA DE LA MUESTRA

La sangre venosa se recoge en tubos que no contienen aditivos. Se deja que la muestra coagule. El suero se separa por centrifugación 4^o C. El suero debería congelarse a -20^o C en un plazo máximo de 1 hora. El suero debe almacenarse a -20^o C o a temperatura inferior hasta que sea analizado.

Pueden utilizarse también muestras de plasma (EDTA o Heparina), pero éstas no deben diluirse (la dilución de plasma con el diluyente estándar puede causar coagulación durante la incubación).

Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO DE RADIOINMUNOENSAYO

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

Un ensayo completo incluye:

Estándares (Tubos St): 7 concentraciones distintas: 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 y 300 pmol/L.

Controles (tubos C): Controles con concentraciones conocidas de NPY.

Muestras (tubos P).

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

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

Para un resumen del procedimiento, véase la tabla 1 de la página 41.

REALIZACIÓN

1. Reconstituir los reactivos siguiendo las instrucciones.
2. Preparar los estándares de trabajo del NPY mediante dilución del estándar de NPY 3000 pmol/L (Reactivo E) con el diluyente estándar (Reactivo D) de acuerdo con las siguientes indicaciones:

A/ 0,2 mL de estándar de 3000 pmol/L + 1,8 mL de diluyente	= 300 pmol/L
B/ 1 mL de estándar de 300 pmol/L + 1 mL de diluyente	= 150 pmol/L
C/ 1 mL de estándar de 150 pmol/L + 1 mL de diluyente	= 75 pmol/L
D/ 1 mL de estándar de 75 pmol/L + 1 mL de diluyente	= 37,5 pmol/L
E/ 1 mL de estándar de 37,5 pmol/L + 1 mL de diluyente	= 18,8 pmol/L
F/ 1 mL de estándar de 18,8 pmol/L + 1 mL de diluyente	= 9,4 pmol/L
G/ Diluyente estándar	= 0 pmol/L.

Conservar las soluciones estándar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
3. Pipetear 200µL de los estándares (0-300 pmol/L), controles y muestras en sus respectivos tubos. Pipetear 200µl del estándar cero en los tubos NSB.
4. Pipetear 200 µl de anti-NPY (Reactivo A) en todos los tubos excepto los tubos NSB y TOT.
5. Añadir 200 µl de tampón de ensayo (Reactivo F) a los tubos NSB.
6. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.
7. Pipetear 200 µl de NPY I-125 (Reactivo B) a todos los tubos. Tapar y guardar aparte los tubos TOT.
8. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.
9. Pipetear 100µL de doble anticuerpo en fase sólida (Reactivo C) en todos los tubos exceptuando los tubos TOT (remover continuamente mientras se pipetea).
10. Agitar con cuidado e incubar durante 30-60 minutos a 2-8° C.
11. Centrifugar los tubos durante 15 minutos a +4° C (a 1700 x g como mínimo)
12. Decantar los sobrenadantes inmediatamente después de la centrifugación.
13. Contar la radiactividad de los precipitados utilizando un contador gamma. (tiempo de contaje: 2-4 minutos).

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Restar la media de CPM de los tubos de fijación no específica (NSB) de la media de CPM de los duplicados de los estándares, controles y muestras.
2. Se puede generar una curva estándar representando gráficamente el precipitado CPM, la fracción fijada CPM o B/TOT, en función de las concentraciones de los estándares NPY. Se muestra un ejemplo de la curva estándar en la página 42.
3. Interpolar las concentraciones de NPY de las muestras y controles a partir de la curva estándar generada.
4. La curva estándar y el cálculo de las concentraciones de las muestras y controles también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos.

DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de suero con concentraciones de NPY superiores a 300 pmol/L deben diluirse con un diluyente estándar (Reactivo D) para la determinación de la concentración real de NPY. Se recomienda seguir el siguiente procedimiento:

Dilución 1:2: Pipetear 100µl de la muestra y 100µl de diluyente estándar en el tubo de ensayo (realizar por duplicado).

Dilución 1:4: Pipetear 50µl de la muestra y 150µl de diluyente estándar en el tubo de ensayo (realizar por duplicado).

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad

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

Recuperación

Cuando se añadieron cantidades conocidas de NPY a las muestras de plasma, se obtuvo una recuperación media de 82,4% (rango: 75-88%). La NPY se añadió en el rango: 50-150 pmol/L.

Precisión

Variación intra-ensayo

<u>Nivel</u>	<u>Coeficiente de variación (%CV)</u>	<u>N</u>
43,7 pmol/L	5,0	8
98,9 pmol/L	4,5	8

Variación inter-ensayo (variación total)

<u>Nivel</u>	<u>Coeficiente de variación (%CV)</u>	<u>N</u>
42,4 pmol/L	9,2	6
90,2 pmol/L	7,6	6

Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas con péptidos relacionados:

Compuesto	Reacción cruzada
Neuropéptido Y humano	<100 %
Péptido YY humano	<0,1 %
Polipéptido pancreático humano	<0,1 %
PYY 3-36	<0,1%
NPY 22-36	<0,1%
PP Bovine	<0,1%

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. Controles

Las concentraciones detectadas en los controles (Reactivos G y H) deben estar dentro de los límites que figuran en las etiquetas de los viales.

2. Cuentas totales (TOT)

Las cuentas obtenidas deberían aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficacia de contaje y el deterioro radiactivo. El contenido de NPY I-¹²⁵ en este kit dará unas cuentas totales (TOT) de 10500 CPM (-5 a +20%) en la fecha de referencia de la radiactividad (eficacia de contaje = 80%).

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

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

$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ es inferior al 8%.

5. Forma de la curva estándar

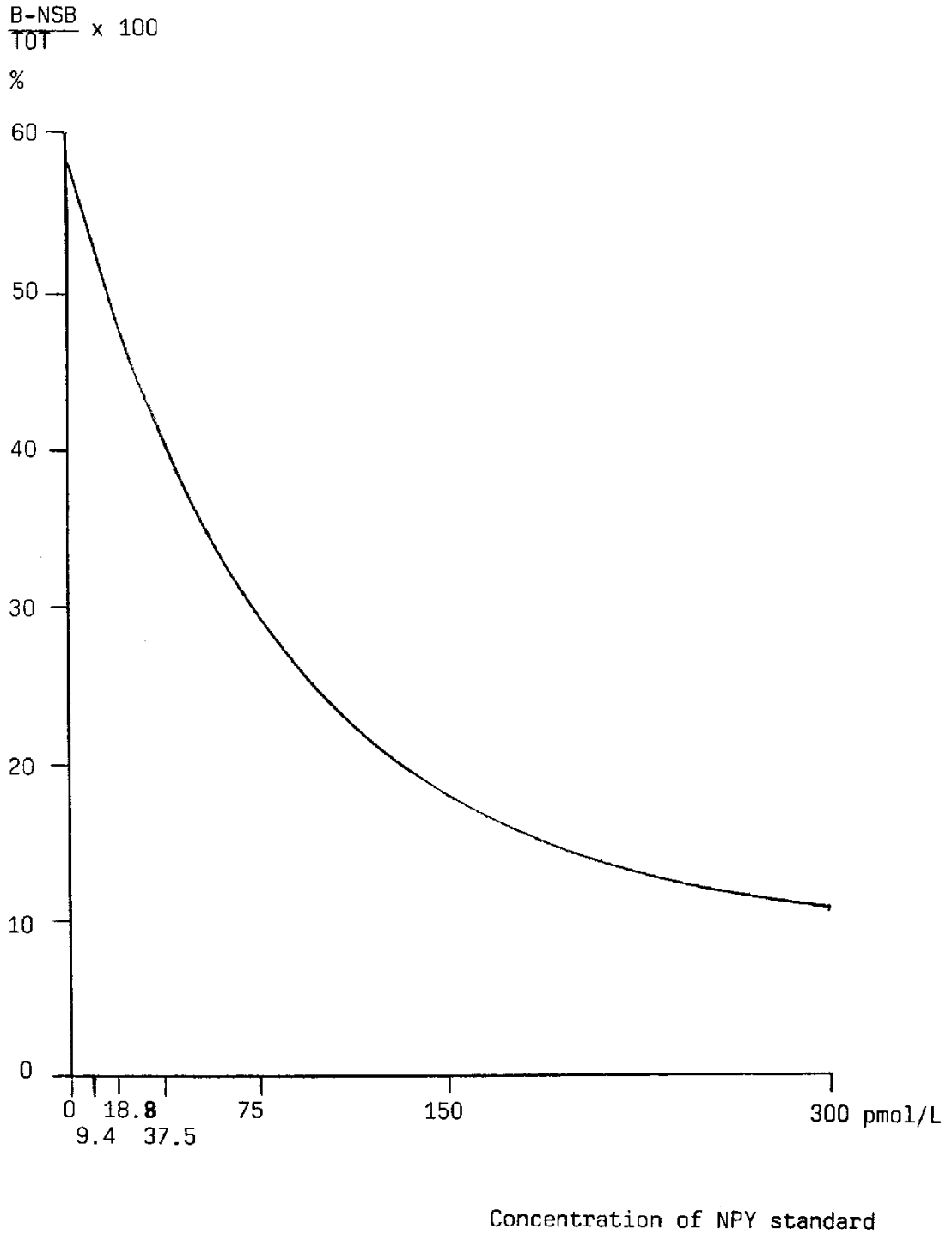
Por ejemplo, monitorizar los puntos 80, 50 y 20% de la línea estándar para controlar la reproductibilidad entre ensayos.

TABLA RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO RIA

Tipo de tubos	Tubo nº	Muestra Estándar o control	Anti-NPY (A)	Tampón de ensayo (F)		NPY I- ¹²⁵ (B)		Doble anticuerpo en fase sólida (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Mezclar con el agitador e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.	200 µl	Mezclar con el agitador e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.	-	Mezclar con el agitador e incubar durante 30-60 minutos a 2-8° C. Centrifugar durante 15 minutos a 1700 xg a +4° C. Decantar y contar la radiactividad de los precipitados.
NSB	3-4	200 µl	-	200		200 µl		100 µl	
Estánd 0	5-6	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Estánd 9,4	7-8	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Estánd 18,8	9-10	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Estánd 37,5	11-12	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Estánd 75	13-14	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Estánd 150	15-16	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Estánd 300	17-18	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Control (G)	19-20	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Control (H)	21-22	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Muestra 1	23-24	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	
Muestra 2	25-26	200 µl	200 µl	-		200 µl		100 µl	

Tabla 1

EXAMPLE OF NPY STANDARD CURVE




REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Tatemoto, K.
Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 79:5485, 1982
2. Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.
Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptides.
Nature (London) 296: 659, 1982.
3. Corder, R., Emson, P.C. and Lowry, P.J.
Purification and characterization of human neuropeptide Y from adrenal medullary pheochromocytoma tissue.
Biochem J 219:699, 1984.
4. Tatemoto, K.
Isolation and characterization of peptide YY (PYY) a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc Natl Acad Sci USA 79:2514, 1982.
5. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T. et al.
Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.
Acta Physiol Scand 116:477, 1982.
6. Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M. et al.
Neuropeptide Y distribution in rat brain.
Science 221:877, 1983.
7. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt T. and Goldstein, M.
High levels of neuropeptide Y (NPY) in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.
Neurosci Lett 42:167, 1983.
8. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C. et al.
Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract.
Cell Tissue Res 234:71, 1983.
9. Lundberg, J.M. and Tatemoto, K.
Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol Scand 116:393, 1982.
10. Lundberg, J.M. and Stjärne, L.
Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and contractile response evoked by fieldstimulation in rat vas deference.
Acta Physiol Scand 120:477, 1984.

11. Lundberg, J.M., Hua, X.Y. and Franco-Cereceda, A.
Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deference and urinary bladder of the guinea-pig.
Acta Physiol Scand 121:325, 1984.
12. Adrian, T.E., Terenghi, G., Brown, M.J. et al.
Neuropeptide Y in pheochromocytomas and ganglioneuroblastomas.
Lancet ii:540, 1983.
13. Emson, P.C., Corder, R. and Lowry, P.J.
Demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human pheochromocytoma extracts.
Regulatory Peptides 8:89, 1984.
14. Theodorsson-Norheim, E., Hemse'n, A. and Lundberg, J.M.
Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): Chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts.
Sand J Clin lab Invest 45:355, 1985.
15. Kogner, P., Björk, O. and Theodorsson, E.
Neuropeptide Y in neuroblastoma: Increased concentration in metastasis, release during surgery, and characterization of plasma and tumour extracts.
Medical and Pediatric Oncology 21:317-322, 1993.
16. Kogner, P., Ericsson, A., Barbany, G., Persson, H., Theodorsson, E. and Björk, O.
Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia.
Blood, vol. 80, no. 5 (september 1), 1992:pp 1324-1329.
17. Kalra, S.P., Gube, M.G., Bin Xu, S.P., Horvath, T.L. and Kalra P.S.
Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight.
Endocrine reviews 20(1):68-100, (1999).
18. Kallio, J., Pesonen, U., Kaipio, K., Karvonen, M.K., Jaakkola, U, Heinonen, O.J., Uusitupa, M.I.J. and Koulu, M.
Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans.
The FASEB Journal express article 10.1096/fj. 00-0437 fje. Published online March 12, 2001.

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-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY.
REAG B Ag ¹²⁵I	¹²⁵ I-NPY. Anti-NPY. NPY-I ¹²⁵ . ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY.
REAG C DASP	Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps Doble anticuerpo en fase sólida. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente degli standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 3000	NPY standard 3000 pmol/L. Standard de NPY, 3000 pmol/l. NPY estándar de 3000 pmol/L. NPY Standard 3000 pmol/L. NPY standard 3000 pmol/L. NPY-standard 3000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H 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-NPY

Neuropeptid Y Radioimmunoassay
Nur für den professionellen Gebrauch

EINLEITUNG

Neuropeptid Y (NPY) ist ein Peptid mit 36 Aminosäuren, welches ursprünglich aus dem Gehirn von Schweinen isoliert wurde (1,2). NPY wurde später aus humanem adrenal-medullarem phaeochromozytomem Gewebe extrahiert. Das humane NPY unterscheidet sich vom Schweine-NPY nur durch Methionin an Position 17 anstelle von Leucin (3). NPY stimmt in bedeutenden Sequenzen mit Pankreatischem Polypeptid und Peptid YY überein (4). Eine NPY-ähnliche Immunreaktivität wurde im zentralen Nervensystem und in den peripheren noradrenergischen Neuronen und intestinalen Neuronen gefunden (5,6,7,8). NPY zeigt eine starke vasokonstriktive Aktivität (9). Außerdem inhibiert NPY die Noradrenalin-Freisetzung durch eine präsynaptische Aktion (10) und zeigt einen stimulierenden Einfluß auf die Herzkontraktion (11). Phaeochromozytome Tumore (3,12,13) enthalten NPY, und erhöhte NPY-Spiegel in Plasma von Phaeochromozytom-Patienten wurden berichtet (14). Ansteigende Plasmakonzentrationen an NPY wurden in Patienten mit einem Neuroblastom gefunden (15). Ansteigende Plasmakonzentrationen an NPY wurden ebenfalls bei pädiatrischer B-Zell-Precursor-Leukämie gefunden (16).

TESTPRINZIP

Dieser Test ist für die direkte Analyse von NPY in humanem Serum/Plasma ohne Extraktion bestimmt. Das NPY in den Serum-/Plasmaproben wird in einem kompetitiven Radioimmunoassay mit einem Antiserum gegen synthetisches NPY, welches an bovines Thyroglobulin gebunden ist, bestimmt. Das NPY in den Standards und Proben konkurriert mit dem ¹²⁵I-markierten NPY um die Bindungsstellen des Antikörpers. ¹²⁵I-NPY bindet dabei umgekehrt proportional zur Konzentration von NPY in den Standards und Proben. Das Antikörper-gebundene ¹²⁵I-NPY von der ungebundenen Fraktion mit Hilfe eines Zweitantikörpers, der an eine Festphase gebunden ist, getrennt. Die Radioaktivität des Antikörper-gebundenen ¹²⁵I-NPY wird gemessen. Das in dieser Methode verwendete Antiserum kreuzreagiert zu weniger als 2.0% mit humanem Peptid YY.

Für den professionellen Gebrauch im medizinisch-diagnostischen Labor.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Ansteigende Plasmakonzentrationen an NPY wurden in Patienten mit einem Neuroblastom gefunden (15). Ansteigende Plasmakonzentrationen an NPY wurden ebenfalls bei pädiatrischer B-Zell-Precursor-Leukämie gefunden (16).

Erhöhte Werte von NPY wurden in Serum/Plasma von Patienten mit Phaeochromozytom-Tumoren gefunden (3,12,13). Die Bestimmung von NPY in Serum/Plasma kann als wertvoller Bestandteil der Diagnose des Neuroblastoms, der pädiatrischen B-Zell-Precursor-Leukämie und des Phaeochromozytoms dienen.

Normalwerte von NPY in humanem Plasma

Probenkollektiv	Anzahl	gefundener Bereich	Mittelwert
Gesunde normale (Alter 20-60 Jahre)	109	36-120 pmol/L	74 pmol/L (SD= ± 15)

Teilnehmer der Normalwertstudie waren gesunde Probanden im Alter von 20-60 Jahren.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in vitro Gebrauch.

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

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

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

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

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

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

KOMPONENTEN DES KITS

Die Reagenzien dieses Testkits sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

1. Anti-NPY (Reagenz A)

Kaninchen Antiserum gegen NPY, gebunden an bovines Thyroglobulin. Lyophilisiert in 2.0 mL 0.5 M Phosphatpuffer, pH 7.4, mit 2.5% humanem Serumalbumin, 2.5% EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.5% Natriumazid und 5000 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®) pro mL. Für 100 Röhrchen. In 22 mL bidest. Wasser rekonstituieren.

Farbe: Gelb.

2. ¹²⁵I-NPY (Reagenz B)

Enthält 28 KBq bzw. 0.75 µCi am Markierungstag. Synthetisches, humanes NPY wird in einer Bolton-Hunter-Reaktion iodiert. Die monoiodierte Form wird HPLC-gereinigt. Spezifische Aktivität: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilisiert in 2.5 mL 0.5 M Phosphatpuffer, pH 7.4, mit 2.5% humanem Serumalbumin, 2.5% EDTA, 1.0% Tween 80, 0.5% Natriumazid und 5000 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®) pro mL. In 25 mL bidest. Wasser rekonstituieren.

Farbe: Blau.

3. Doppel-Antikörper-Festphase (Reagenz C)

Anti-Kaninchen-Ig gekoppelt an Zellulosepartikel in 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8 mit 0,25% humanem Serumalbumin, 0,045% NaCl, 0,05% NaN₃, 0,185% EDTA und 0,05% Tween 80. 11.0 mL Suspension.

4. Standard Verdünner (Reagenz D)

10.0 mL NPY-freies humanes Serum, lyophilisiert. Enthält 500 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®) pro mL. In 10.0 mL bidest. Wasser rekonstituieren. Zur Herstellung des NPY-Arbeitsstandards.

5. NPY Standard 3000 pmol/L (Reagenz E)

Lyophilisiert. 2.00 mL Standard. Konzentration: 3000 pmol/L nach Rekonstitution. Der Standard wird aus synthetischem, humanem NPY hergestellt. Lyophilisiert in 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4, mit 0.25% humanem Serumalbumin, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.05% Natriumazid und 500 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®) pro mL. Zur Herstellung des NPY-Arbeitsstandards.

6. Assaypuffer (Reagenz F)

5.0 mL 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.4, mit 0.25% humanem Serumalbumin, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.05% Natriumazid und 500 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®) pro mL.

Zur Verwendung in den NSB-Röhrchen anstelle von Antiserum.

7. Kontrollen (Reagenz G-H)

Lyophilisierte Serumkontrollen mit einer niedrigen und einer hohen Konzentration an NPY. Jede Kontrolle hat nach Rekonstitution ein Volumen von 2.00 mL. Die NPY-Konzentrationen sind den Etiketten auf den Fläschchen zu entnehmen.

Enthält 0.05% Natriumazid.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

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

Reagenz A: Anti-NPY

Mit 22 mL bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei 2-8 °C.

Reagenz B: ¹²⁵I-NPY

Mit 25 mL bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei -18 °C oder tiefer.

Reagenz C: Doppel-Antikörper-Festphase

Gebrauchsfertig. Während des Pipettiervorgangs ständig rühren.
Lagerung bei 2-8 °C.

Reagenz D: Standard Verdünner

Mit 10.0 mL bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei -18 °C oder tiefer.

Reagenz E: NPY Standard, 3000 pmol/L

Mit 2.00 mL bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei -18 °C oder tiefer.
Zur Herstellung des NPY-Arbeitsstandards, siehe RIA.

Reagenz F: Assaypuffer

Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2 – 8 °C

Reagenz G-H: Kontrollen

Mit 2.00 mL bidest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei -18 °C oder tiefer.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Destilliertes Wasser

Einmal-Teströhrchen 11-13 x 55 mm, Polystyrol

Pipetten mit Einmalspitzen, 100, 200 µl.

Eppendorf-Multipipette für Volumina 100 und 200 µl

Verstellbare Pipetten, 200 – 1000 µl

Vortexmixer

Zentrifuge, geeignet für mindestes 1.700xg (vorzugsweise Kühlzentrifuge)

Gamma-Counter

PROBENGEWINNUNG

Venenblut wird in Röhrchen ohne Zusätze gesammelt. Die Proben werden bis zur Gerinnung in einem Eisbad gekühlt. Serum wird durch Zentrifugation bei +4 °C gewonnen.

Das Serum sollte nach der Entnahme innerhalb von 1 Stunde eingefroren und bis zur Analyse bei -20 °C oder tiefer gelagert werden.

Plasmaproben (EDTA oder Heparin) können ebenfalls eingesetzt werden, sollten aber nicht verdünnt werden (Verdünnung des Plasmas mit Standard Verdünner kann zu Gerinnung im Assay während der Inkubation führen).

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

RADIOIMMUNOASSAY

Rekonstituiere die Reagenzien wie beschrieben.

Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Alle Tests (Standards, Kontrollen und Proben) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet:

Standards (St-Röhrchen) 7 Konzentrationen (0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 and 300 pmol/L

Kontrollen (C-Röhrchen) Kontrollen mit bekannten NPY-Konzentrationen

Proben (P-Röhrchen)

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

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

Siehe Übersicht Seite 56.

ARBEITSSCHRITTE

1. Die Reagenzien wie angegeben rekonstituieren.
2. Den NPY-Arbeitsstandard durch Verdünnung des NPY-Standards 3000 pmol/L (Reagent E) mit Standard Verdünner (Reagent D) wie folgt herstellen:

A/ 0.200 mL Standard	3000 pmol/L + 1.800 mL	Verdünner = 300 pmol/L
B/ 1.00 mL Standard	300 pmol/L + 1.00 mL	Verdünner = 150 pmol/L
C/ 1.00 mL Standard	150 pmol/L + 1.00 mL	Verdünner = 75 pmol/L
D/ 1.00 mL Standard	75 pmol/L + 1.00 mL	Verdünner = 37.5 pmol/L
E/ 1.00 mL Standard	37.5 pmol/L + 1.00 mL	Verdünner = 18.8 pmol/L
F/ 1.00 mL Standard	18.8 pmol/L + 1.00 mL	Verdünner = 9.4 pmol/L
G/ Standard	Verdünner = 0 pmol/L.	

Die Standardlösungen bei -18° C oder tiefer lagern.
3. 200 µL der Standards (0-300 pmol/L), Proben und Kontrollen in die entsprechenden Röhren pipettieren. 200 µL Nullstandard in die NSB-Röhren pipettieren.
4. 200 µL Anti-NPY (Reagenz A) in alle Röhren außer NSB und TOT pipettieren.
5. 200 µL Assaypuffer (Reagenz F) in die NSB-Röhren pipettieren.
6. Vortexen und für 20-24 Stunden bei 2-8° C inkubieren.
7. 200 µL ¹²⁵I-NPY (Reagenz B) in alle Röhren pipettieren. Die TOT-Röhren verschließen und beiseite stellen.
8. Vortexen und für 20-24 Stunden bei 2-8° C inkubieren.
9. 100 µL Doppel-Antikörper-Festphase (Reagenz C) in alle Röhren außer TOT pipettieren. (während des Pipettierens ständig rühren).
10. Vorsichtig vortexen und für 30-60 Minuten bei 2-8° C inkubieren.
11. 15 minutes bei +4° C zentrifugieren (mind. 1700 x g).
12. Überstand sofort nach dem Zentrifugieren dekantieren.
13. Radioaktivität der Präzipitate in einem Gammacounter messen (Messzeit: 2-4 Minuten).

TESTAUSWERTUNG

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

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

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

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

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

VERDÜNNUNG DER PROBEN

Serumproben mit NPY-Konzentrationen über 300 pmol/L sollten mit Standard Verdünner (Reagenz D) verdünnt und erneut gemessen werden.

Das folgende Verfahren wird empfohlen:

Verdünnung 1:2: 100 µL Probe und 100 µL Standard Verdünner in die Assay-Röhrchen pipettieren (Doppelbestimmungen empfohlen).

Verdünnung 1:4: 50 µL Probe und 150 µL Standard Verdünner in die Assay-Röhrchen pipettieren (Doppelbestimmungen empfohlen).

TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

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

Richtigkeit

Eine mittlere Wiederfindung von 82.4 % (Bereich: 75 – 88 %) wurde erreicht, wenn NPY-Konzentrationen von 50 - 150 pmol/L zu bekannten Plasmaproben gespikt wurden.

Präzision

Intra assay

<u>Konzentration</u>	<u>Variationskoeffizient (VK %)</u>	<u>N</u>
43.7 pmol/L	5.0	8
98.9 pmol/L	4.5	8

Inter assay

<u>Konzentration</u>	<u>Variationskoeffizient (VK %)</u>	<u>N</u>
42.4 pmol/L	9.2	6
90.2 pmol/L	7.6	6

SPEZIFITÄT

Die folgenden Kreuzreaktivitäten wurden mit verwandten Peptiden gefunden:

Substanz	Kreuzreaktion
Neuropeptid Y, human	100.0%
Peptid YY, human	<0.1%
Pankreatisches Polypeptid, human	<0.1%
PYY 3-36	<0.1%
NPY 22-36	<0.1%
PP Bovine	<0.1%

Interferenz

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

QUALITÄTSKONTROLLE

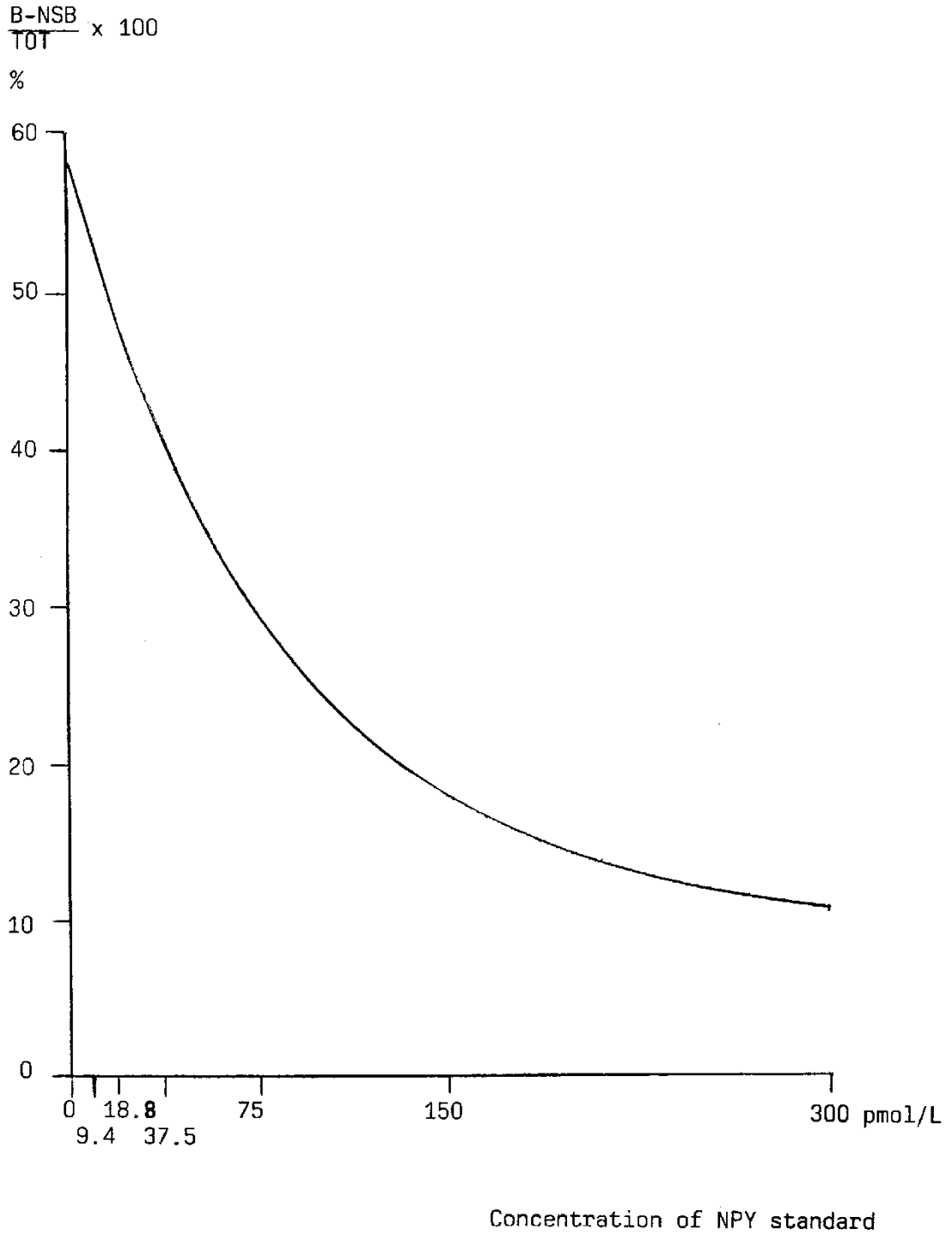
Um eine gleichbleibende Testqualität sicherzustellen, sollte jedes Labor die folgenden Punkte beachten:

- a. Die wiedergefundenen Konzentrationen der Kontrollseren (Reagenz G und H) sollten innerhalb der auf den Etiketten angegebenen Werten liegen.
- b. Total Counts
Die Counts sollten annähernd den erwarteten CPM entsprechen, je nach Effizienz des Gammacounters und radioaktivem Zerfall. Der Gehalt an ^{125}I -NPY dieses Kits beträgt ca. 10.500 CPM (-5 %, +20 %) am Tag der Markierung (Wirkungsgrad des Counters = 80 %).
- c. Maximale Bindung (Bo/TOT)
Für jeden Assay wird die gebundene Radioaktivität des Nullstandards (Bo/TOTx100) berechnet.
- d. Unspezifische Bindung (NSB/TOT)
Für jeden Assay wird die unspezifische Bindung in Prozent (NSB/TOTx100) berechnet. Die NSB/TOTx100 beläuft sich auf weniger als 8 %.
- e. Form der Standardkurve
Als Marker für die Reproduzierbarkeit können die Punkte bei 80, 50 und 20 % der Standardkurve von Testlauf zu Testlauf verwendet werden.

ASSAY SCHEMA

Röhrchen- Typ	Röhr- chen Nr.	Standard Probe oder Kontrolle	Anti-NPY (A)	Assay- puffer (F)		¹²⁵ I- NPY (B)		Doppel- Anti- körper- Fest- phase (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexen	200 µL	Vortexen	-	Vortexen
NSB	3-4	200 µL	-	200	und für	200 µL	und für	100 µL	und für 30-
Stand 0	5-6	200 µL	200 µL	-	20-24 h	200 µL	20-24 h	100 µL	60 min bei
Stand 9.4	7-8	200 µL	200 µL	-	bei 2-8°C	200 µL	bei 2-8°C	100 µL	2-8°C inku-
Stand 18.8	9-10	200 µL	200 µL	-	inku-	200 µL	inku-	100 µL	bieren.
Stand 37.5	11-12	200 µL	200 µL	-	bieren.	200 µL	bieren.	100 µL	15 min. bei
Stand 75	13-14	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	1700 x g
Stand 150	15-16	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	und +4° C
Stand 300	17-18	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	zentrifu-
Kontr. (G)	19-20	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	gieren.
Kontr. (H)	21-22	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	Dekantieren
Probe 1	23-24	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	und Radio-
Probe 2	25-26	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	aktivität der Präzipitate messen.

EXAMPLE OF NPY STANDARD CURVE









REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Tatemoto, K.
Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 79:5485, 1982
2. Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.
Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptides.
Nature (London) 296: 659, 1982.
3. Corder, R., Emson, P.C. and Lowry, P.J.
Purification and characterization of human neuropeptide Y from adrenal medullary pheochromocytoma tissue.
Biochem J 219:699, 1984.
4. Tatemoto, K.
Isolation and characterization of peptide YY (PYY) a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc Natl Acad Sci USA 79:2514, 1982.
5. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T. et al.
Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.
Acta Physiol Scand 116:477, 1982.
6. Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M. et al.
Neuropeptide Y distribution in rat brain.
Science 221:877, 1983.
7. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt T. and Goldstein, M.
High levels of neuropeptide Y (NPY) in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.
Neurosci Lett 42:167, 1983.
8. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C. et al.
Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y - and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract.
Cell Tissue Res 234:71, 1983.
9. Lundberg, J.M. and Tatemoto, K.
Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol Scand 116:393, 1982.
10. Lundberg, J.M. and Stjärne, L.
Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and contractile response evoked by fieldstimulation in rat vas deference.
Acta Physiol Scand 120:477, 1984.

11. Lundberg, J.M., Hua, X.Y. and Franco-Cereceda, A.
Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig.
Acta Physiol Scand 121:325, 1984.
12. Adrian, T.E., Terenghi, G., Brown, M.J. et al.
Neuropeptide Y in pheochromocytomas and ganglioneuroblastomas.
Lancet ii:540, 1983.
13. Emson, P.C., Corder, R. and Lowry, P.J.
Demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human pheochromocytoma extracts.
Regulatory Peptides 8:89, 1984.
14. Theodorsson-Norheim, E., Hemsen, A. and Lundberg, J.M.
Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): Chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts.
Scand J Clin Lab Invest 45:355, 1985.
15. Kogner, P., Björk, O. and Theodorsson, E.
Neuropeptide Y in neuroblastoma: Increased concentration in metastasis, release during surgery, and characterization of plasma and tumour extracts.
Medical and Pediatric Oncology 21:317-322, 1993.
16. Kogner, P., Ericsson, A., Barbany, G., Persson, H., Theodorsson, E. and Björk, O.
Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia.
Blood, vol. 80, no. 5 (september 1), 1992:pp 1324-1329.
17. Kalra, S.P., Gube, M.G., Bin Xu, S.P., Horvath, T.L. and Kalra P.S.
Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight.
Endocrine reviews 20(1):68-100, (1999).
18. Kallio, J., Pesonen, U., Kaipio, K., Karvonen, M.K., Jaakkola, U, Heinonen, O.J., Uusitupa, M.I.J. and Koulu, M.
Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans.
The FASEB Journal express article 10.1096/fj. 00-0437 fje. Published online March 12, 2001.

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-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY.
REAG B Ag ¹²⁵I	¹²⁵ I-NPY. Anti-NPY. NPY-I ¹²⁵ . ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY.
REAG C DASP	Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps Doble anticuerpo en fase sólida. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente degli standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 3000	NPY standard 3000 pmol/L. Standard de NPY, 3000 pmol/l. NPY estándar de 3000 pmol/L. NPY Standard 3000 pmol/L. NPY standard 3000 pmol/L. NPY-standard 3000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H 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-NPY

Neuropeptide Y radioimmunoassay
Solo per uso professionale

INTRODUZIONE

Il Neuropeptide Y (NPY) è un peptide di 36 aminoacidi isolato inizialmente dal cervello di maiale (1,2). In seguito il NPY è stato estratto da tessuto umano, feocromocitoma della midollare del surrene. Il neuropeptide Y umano differisce da quello porcino per la sostituzione di un residuo di leucina in posizione 17 con metionina (3). Il NPY presenta una considerevole omologia con la sequenza del polipeptide pancreatico e del peptide YY (4). Immunoreattività NPY-like è stata trovata nel sistema nervoso centrale e nel sistema nervoso periferico in neuroni adrenergici e in neuroni intestinali (5,6,7,8). Il NPY ha notevole azione vasocostrittrice (9), inibisce la liberazione di noradrenalina attraverso un meccanismo presinaptico(10) ed ha effetto stimolatorio sulla contrazione del cuore (11). Il tessuto tumorale di feocromocitoma (3,12,13) contiene NPY e sono stati trovati elevati livelli di NPY nel plasma di pazienti con feocromocitoma (14), neuroblastoma (15) e in pazienti pediatriche con leucemia a cellule pre-B (16).

PRINCIPIO DEL METODO

I reattivi contenuti nel kit permettono la determinazione quantitativa diretta del neuropeptide Y nel siero e nel plasma umani.

Il dosaggio del NPY è un metodo radioimmunologico competitivo che utilizza un anticorpo diretto contro il NPY sintetico coniugato con tireoglobulina bovina.

Una quantità definita di NPY marcato con ¹²⁵I compete con il NPY presente in standard e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo specifico; il marcato viene legato in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di NPY in campioni e standard. Al termine dell'incubazione, il marcato legato all'anticorpo viene precipitato con l'aggiunta di un secondo anticorpo legato a cellulosa. Le provette vengono quindi centrifugate, decantate e contate con un contatore gamma; la concentrazione di NPY nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva standard. L'anticorpo utilizzato nel kit presenta una cross-reazione < 2,0% con il Peptide YY umano. Per uso professionale in laboratorio.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

Valori aumentati di NPY sono stati trovati in campioni di pazienti con neuroblastoma (15), in pazienti pediatriche con leucemia a cellule pre-B(16), con feocromocitoma (3,12,13)..

Il dosaggio del NPY in campioni di siero o plasma si è dimostrato utile nella diagnosi di neuroblastoma, leucemia a cellule pre-B e feocromocitoma.

Valori attesi di NPY nel plasma umano:

Soggetti	Numero	Range	Valore medio
Adulti normali (età 20-60 anni)	109	36-120 pmol/L	74 pmol/L (SD= ± 15)

I valori sono stati ottenuti in soggetti apparentemente sani di età compresa tra 20 e 60 anni.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro.

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

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

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

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

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

CONTENUTO DEL KIT

I reattivi sono sufficienti per 100 determinazioni.

1. Anti-NPY (Reattivo A)

Antisiero anti NPY coniugato a tireoglobulina bovina da coniglio. Liofilizzato in 2 mL di tampone fosfato 0.5 M, pH 7.4, contenente albumina umana 2.5%, EDTA 2.5%, Triton X-100 1.0%, sodio azide 0.5% e 5000 KIU aprotinina (Trasylol® o equivalente) per mL. Ricostituire con 22 mL di acqua distillata.

Colore: Giallo.

2. ¹²⁵I-NPY (Reattivo B)

Il flacone contiene NPY sintetico marcato secondo Bolton-Hunter con ¹²⁵I, con attività totale di 28 kBq alla data riportata sul flacone, purificato con HPLC, monoiodinato. Attività specifica 62-77 Mbq/nmol. Il marcato è liofilizzato in 2.5 mL di tampone fosfato 0.5 M, pH 7.4, albumina umana 2.5%, EDTA 1%, Tween 80, 0.5%, sodio azide 0.5% e 5000 KIU/mL di aprotinina (Trasylol® o equivalente). Ricostituire con 25 mL di acqua distillata. Colore: blu.

3. Secondo anticorpo-fase solida (Reattivo C)

Il flacone contiene 11.0 mL di sospensione Ig anti-coniglio legate a particelle di cellulosa in 0,01 M tampone fosfato, pH 6,8 con albumina di siero umana 0,25%, NaCl 0,045%, NaN₃ 0,05%, EDTA 0,185% e Tween 80 0,05%.

4. Diluente degli standard (Reattivo D)

Il flacone contiene 10 mL di plasma umano liofilizzato. Contiene 500 KIU/mL di aprotinina (Trasylol® o equivalente). Ricostituire con 10 mL di acqua distillata. Da utilizzare per la preparazione della curva standard.

5. NPY standard 3000 pmol/L (Reattivo E)

NPY umano sintetico, 3000 pmol/L dopo ricostituzione, liofilizzato in 2 mL di tampone fosfato 0.05 M, pH 7.4, contenente albumina umana 0.25%, EDTA 0.1%, Triton X-100 0.05%, sodio azide e 500 KIU aprotinina (Trasylol® o equivalente) per mL. Da utilizzare per la preparazione della curva standard.

6. Diluente (Reattivo F)

Il flacone contiene 5 mL di tampone fosfato 0.05M, pH 7.4, albumina umana 0.25%, EDTA 0.1%, Triton X-100 0.05%, sodio azide e 500 KIU aprotinina (Trasylol® o equivalente) per mL. Da utilizzare per la determinazione dei colpi non specifici.

7. Controlli (Reattivi G-H)

I controlli, dopo ricostituzione contengono concentrazioni normali ed elevate di NPY in plasma umano. Ricostituire con 2.00 mL di acqua distillata. Le concentrazioni di NPY sono riportate sulle etichette dei rispettivi flaconi. Contengono sodio azide 0.05%.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

Conservare i reattivi prima della ricostituzione a 2-8°C. Ricostituire i reattivi con acqua bidistillata. Risospendere i reattivi ricostituiti per inversione evitando la formazione di schiuma. La stabilità dei reattivi è riportata sull'etichetta di ciascun flacone; per i reattivi liofilizzati la data riportata si riferisce alla scadenza prima della ricostituzione. I reattivi ricostituiti sono stabili se conservati come prescritto, per almeno 10 settimane, ma non oltre la data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Reattivo A: Anti-NPY

Ricostituire con 22 mL di acqua bidistillata.
Conservare a 2-8° C.

Reattivo B: ¹²⁵I-NPY

Ricostituire con 25 mL di acqua bidistillata.
Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.

Reattivo C: Secondo anticorpo-fase solida

Pronto per l'uso. Mantenere in sospensione durante la dispensazione.
Conservare a 2-8° C.

Reattivo D: Diluente degli standard

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

Reattivo E: NPY standard, 3000 pmol/L

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

Reattivo F: Tampone

Pronto per l'uso.
Conservare a 2-8° C.

Reattivi G-H: Controlli

Ricostituire con 2.0 mL di acqua bidistillata.
Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.

MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

Acqua bidistillata.

Provette in polistirene o polipropilene 11-13 x 55 mm

Micropipette di precisione con puntali monouso 100, 200 μ L

Micropipette a ripetizione da 100 and 200 μ L

Micropipetta a volume variabile 200-1000 μ L

Agitatore tipo Vortex

Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)

Sistema di aspirazione o decantazione

Contatore gamma programmato per leggere ^{125}I .

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni in provette senza anticoagulante, lasciare coagulare e separare per centrifugazione a 4°C il siero dalla parte corpuscolata. Portare immediatamente il siero a -20°C o a temperature inferiori fino al momento del dosaggio.

E' possibile utilizzare anche campioni di plasma da eparina o EDTA; questi campioni non possono essere diluiti poiché la diluizione del campione con il diluente degli standard può provocarne la coagulazione durante l'incubazione.

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, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 and 300 pmol/L.

Controlli (provette C): i controlli sono a concentrazioni note di NPY. Si usano per il controllo di qualità del dosaggio.

Campioni (provette S)

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

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

Il metodo è riportato in dettaglio nelle pagine successive.

METODO

1. Ricostituire i reattivi secondo le istruzioni.
2. Preparare le soluzioni di lavoro degli standard a partire dallo standard 3000 pmol/L (reattivo E) con il diluente degli standard (reattivo D), secondo il seguente schema:

A/ 0.200 mL standard 3000 pmol/L + 1.800 mL diluente = 300 pmol/L

B/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL diluente = 150 pmol/L

C/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL diluente = 75 pmol/L

D/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL diluente = 37.5 pmol/L

E/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL diluente = 18.8 pmol/L

F/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL diluente = 9.4 pmol/L

G/ Diluente = 0 pmol/L.

Conservare le soluzioni avanzate a -18°C o a temperature inferiori.

3. Pipettare 200 μL di standard (0-300 pmol/L), campioni e controlli nelle rispettive provette. Pipettare 200 μL di standard zero nelle provette degli NSB.
4. Aggiungere 200 μL di anticorpo anti NPY (reattivo A) in tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale e per gli NSB.
5. Aggiungere 200 μL di diluente (reattivo F) nelle provette per gli NSB.
6. Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a $2-8^{\circ}\text{C}$.
7. Aggiungere 200 μL di ^{125}I -NPY (reattivo B) in tutte le provette. Mettere da parte le provette per l'attività totale e tapparle.
8. Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a $2-8^{\circ}\text{C}$.
9. Aggiungere 100 μL di secondo anticorpo – fase solida (reattivo C) a tutte le provette tranne quelle per l'attività totale (Agitare con cura il reattivo durante la dispensazione).
10. Agitare su vortex e incubare 30-60 min. a $2-8^{\circ}\text{C}$.
11. Centrifugare le provette 15 min. a 4°C (1700 x g).
12. Eliminare immediatamente il surnatante per decantazione.
13. Misurare la radioattività del precipitato, frazione legata, di tutte le provette per almeno due minuti in un contatore gamma.

CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre la media delle cpm degli NSB dalle cpm dei replicati di standard, controlli e campioni.
2. Generare la curva standard riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli standard. Un esempio di curva standard è riportato nelle pagine seguenti.
3. Le concentrazioni di NPY in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione sulla curva standard.
4. E' possibile usare un sistema di elaborazione computerizzato.

DILUIZIONE DEI CAMPIONI

Diluire 1:2 o 1:4 con il reattivo D i campioni con concentrazione di NPY superiore a 300 pmol/L. Moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione.

Si raccomanda di seguire la procedura seguente:

Diluizione 1:2. Pipettare in duplicato 100 μ L di campione e 100 μ L di diluente degli standard nelle provette per il dosaggio.

Diluizione 1:4. Pipettare in duplicato 50 μ L di campione e 150 μ L di diluente degli standard nelle provette per il dosaggio.

CARATTERISTICHE DEL METODO

Sensibilità

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

Accuratezza

Aggiungendo quantità note e comprese tra 50-150 pmol/L di NPY a campioni di plasma umano è stato trovato un recupero medio del 82.4% (75-88%).

Precisione

Variatione intra saggio

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
43.7 pmol/L	5.0%	8
98.9 pmol/L	4.5%	8

Variatione inter saggio (variazione totale)

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
42.4 pmol/L	9.2%	6
90.2 pmol/L	7.6%	6

Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni con peptidi correlati:

Peptide	Cross-reaction
Neuropeptide Y, umano	100.0%
Peptide YY, umano	<0.1%
Pancreatic Polypeptide, umano	<0.1%
PYY 3-36	<0.1%
NPY 22-36	<0.1%
PP Bovine	<0.1%

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 G e H) devono essere nei limiti riportati sulle etichette dei flaconi.

3. 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 NPY- 125 I deve essere compresa tra 10500 cpm (-5%+ 20 %), alla data riportata come riferimento (efficienza del contatore 80%).

3. Capacità legante (Bo/TOT)

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

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 8%.

5. Pendenza della curva

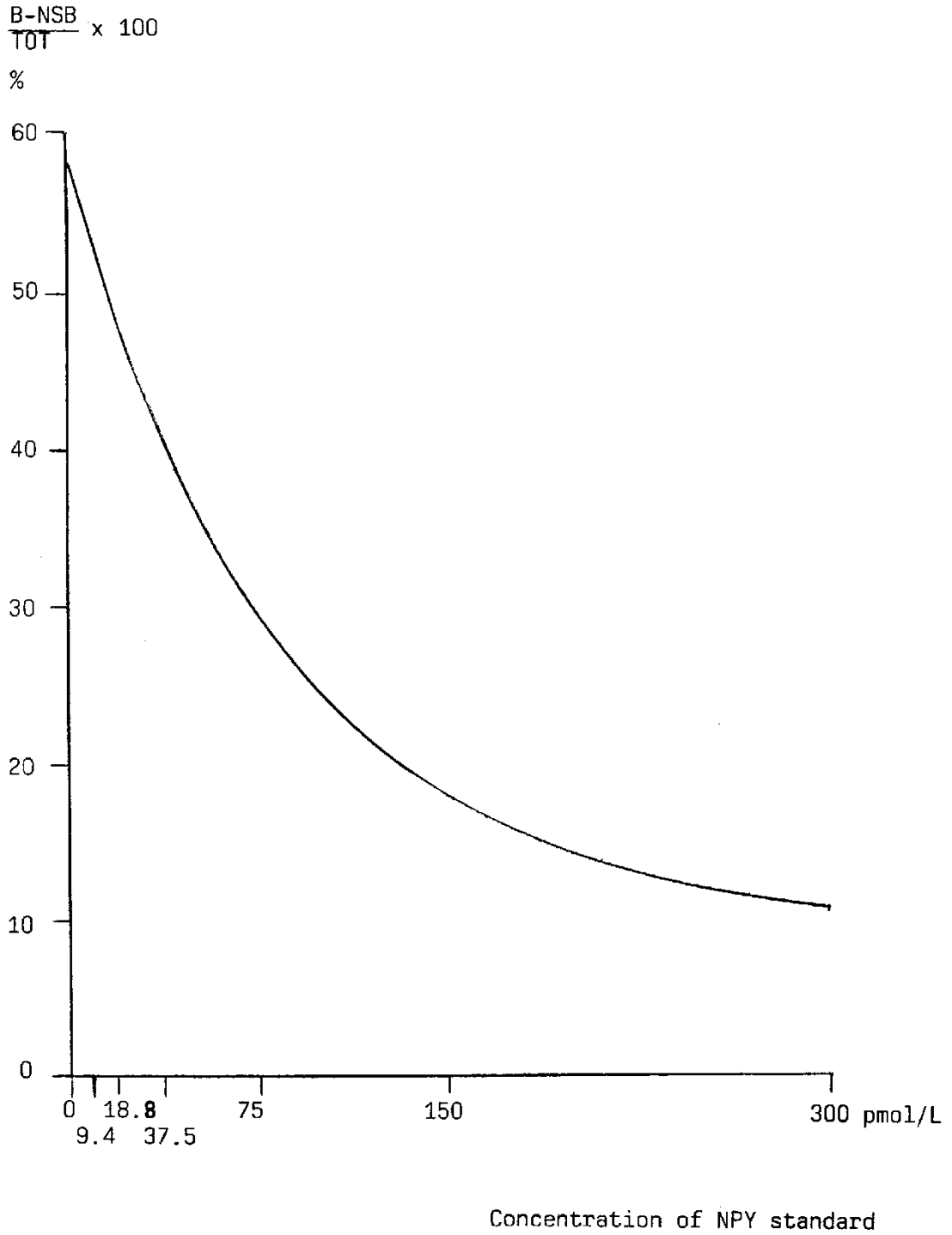
Calcolare ogni volta le intercette ai rapporti di competizione (B/ Bo) 80, 50, 20% per valutare la riproducibilità della curva tra i diversi saggi.

SCHEMA DEL DOSAGGIO RIA

Provetta	Numero	Standard, campioni o controlli	Anticorpo anti NPY (A)	Tampone (F)		Marcato ¹²⁵ I NPY (B)		Secondo anticorpo-fase solida (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Agitare su	200 µL	Agitare su	-	Agitare su
NSB	3-4	200 µL	-	200 µL	vortex e	200 µL	vortex e	100 µL	vortex e
Stand 0	5-6	200 µL	200 µL	-	incubare	200 µL	incubare	100 µL	incubare
Stand 9.4	7-8	200 µL	200 µL	-	20-24 ore	200 µL	20-24 ore	100 µL	30-60 min a
Stand 18.8	9-10	200 µL	200 µL	-	a	200 µL	a	100 µL	2-8°C.
Stand 37.5	11-12	200 µL	200 µL	-	2-8°C.	200 µL	2-8°C.	100 µL	
Stand 75	13-14	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	Centrifugare
Stand 150	15-16	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	15 min a
Stand 300	17-18	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	1700 xg a
Controllo (G)	19-20	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	4°C.
Controllo (H)	21-22	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	
Campione 1	23-24	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	Decantare o
Campione 2	25-26	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	aspirare il
etc.									surnatante e
									contare la
									radioattività
									del precipitato

Tabella 1

EXAMPLE OF NPY STANDARD CURVE




REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Tatemoto, K.
Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 79:5485, 1982
2. Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.
Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptides.
Nature (London) 296: 659, 1982.
3. Corder, R., Emson, P.C. and Lowry, P.J.
Purification and characterization of human neuropeptide Y from adrenal medullary pheochromocytoma tissue.
Biochem J 219:699, 1984.
4. Tatemoto, K.
Isolation and characterization of peptide YY (PYY) a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc Natl Acad Sci USA 79:2514, 1982.
5. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T. et al.
Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.
Acta Physiol Scand 116:477, 1982.
6. Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M. et al.
Neuropeptide Y distribution in rat brain.
Science 221:877, 1983.
7. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt T. and Goldstein, M.
High levels of neuropeptide Y (NPY) in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.
Neurosci Lett 42:167, 1983.
8. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C. et al.
Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract.
Cell Tissue Res 234:71, 1983.
9. Lundberg, J.M. and Tatemoto, K.
Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol Scand 116:393, 1982.
10. Lundberg, J.M. and Stjärne, L.
Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and contractile response evoked by fieldstimulation in rat vas deference.
Acta Physiol Scand 120:477, 1984.

11. Lundberg, J.M., Hua, X.Y. and Franco-Cereceda, A.
Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig.
Acta Physiol Scand 121:325, 1984.
12. Adrian, T.E., Terenghi, G., Brown, M.J. et al.
Neuropeptide Y in pheochromocytomas and ganglioneuroblastomas.
Lancet ii:540, 1983.
13. Emson, P.C., Corder, R. and Lowry, P.J.
Demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human pheochromocytoma extracts.
Regulatory Peptides 8:89, 1984.
14. Theodorsson-Norheim, E., Hemsen, A. and Lundberg, J.M.
Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): Chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts.
Scand J Clin Lab Invest 45:355, 1985.
15. Kogner, P., Björk, O. and Theodorsson, E.
Neuropeptide Y in neuroblastoma: Increased concentration in metastasis, release during surgery, and characterization of plasma and tumour extracts.
Medical and Pediatric Oncology 21:317-322, 1993.
16. Kogner, P., Ericsson, A., Barbany, G., Persson, H., Theodorsson, E. and Björk, O.
Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia.
Blood, vol. 80, no. 5 (september 1), 1992:pp 1324-1329.
17. Kalra, S.P., Gube, M.G., Bin Xu, S.P., Horvath, T.L. and Kalra P.S.
Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight.
Endocrine reviews 20(1):68-100, (1999).
18. Kallio, J., Pesonen, U., Kaipio, K., Karvonen, M.K., Jaakkola, U, Heinonen, O.J., Uusitupa, M.I.J. and Koulu, M.
Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans.
The FASEB Journal express article 10.1096/fj. 00-0437 fje. Published online March 12, 2001.

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-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY.
REAG B Ag ¹²⁵I	¹²⁵ I-NPY. Anti-NPY. NPY-I ¹²⁵ . ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY.
REAG C DASP	Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps Doble anticuerpo en fase sólida. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente degli standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 3000	NPY standard 3000 pmol/L. Standard de NPY, 3000 pmol/l. NPY estándar de 3000 pmol/L. NPY Standard 3000 pmol/L. NPY standard 3000 pmol/L. NPY-standard 3000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H 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-NPY

Neuropeptide Y radioimmunoassay
Endast för professionell användning

INTRODUKTION

Neuropeptid Y (NPY) är en 36 aminosyraresters peptid, som ursprungligen isolerades från svinhjärna (1, 2). NPY extraherades senare från adrenalt-medulär pheochromocytomvävnad.

Humant NPY skiljer sig från svin-NPY endast genom att leucin i position 17 är ersatt av metionin (3). NPY delar en betydande sekvenshomologi med pankreatisk polypeptid och peptid YY (4). NPY-lik immunreaktivitet har detekterats i det centrala nervsystemet och i perifera noradrenerga neuroner och intestinala neuroner (5, 6, 7, 8). NPY företer en potent vasokonstriktoreffekt (9). NPY inhiberar också noradrenalinfrisättning via en presynaptisk verkan (10) och har en stimulerande effekt på hjärtats sammandragning (11).

Pheochromocytomtumörer (3, 12, 13) innehåller NPY och förhöjda nivåer av NPY i plasma från pheochromocytompatienter har rapporterats (14).

Ökade plasmakoncentrationer av NPY har detekterats i patienter med neuroblastom (15). Ökade plasmakoncentrationer av NPY har också detekterats i pediatrik β-cellprekursor-leukemi (16).

PRINCIP

Dessa reagens är avsedda för bestämning av NPY i serum/plasma hos människa, genom direktanalys utan extraktion. NPY i serum/plasma analyseras genom kompetitiv radioimmunoanalys, med användning av antiserum mot syntetiskt NPY som konjugerats med bovin thyreoglobulin. NPY i standarder och analysprov konkurrerar med ¹²⁵I-märkt NPY om bindning till antikropparna. ¹²⁵I-NPY binder till antikropparna i omvänd proportion till mängden NPY i standarder och analysprov. Antikroppsbundet ¹²⁵I-NPY avskiljs från obundet NPY med hjälp av dubbel antikropp fast fas. Radioaktiviteten i antikroppsbundet ¹²⁵I-NPY mäts. Det antiserum som används vid denna metod korsreagerar mindre än 2,0% med human peptid YY. Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

KLINISKA ÖVERVÄGANDEN

Förhöjda serum/plasmakoncentrationer av NPY har detekterats i patienter med neuroblastom (15). Förhöjda serum/plasmakoncentrationer av NPY har också detekterats vid pediatrik β-cellsprekursor-leukemi (16).

Förhöjda nivåer av NPY har detekterats i serum/plasma från patienter med pheochromocytoma tumörer (3, 12, 13). Analys av NPY i serum/plasma kan tjäna som ett värdefullt hjälpmedel i diagnos av neuroblastom, pediatrik β-cellsprekursor-leukemi och pheochromocytom.

Normala nivåer av NPY i human plasma

Personer	Antal	Intervall	Medelvärde
Friska normala p. (åldrarna 20 -60)	109	36-120 pmol/L	74 pmol/L (SD = ±15)

Normal nivå erhållen hos friska personer i åldern 20-60.

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.

REAGENSKITETS INNEHÅLL

De reagens som medföljer varje kit räcker till 100 rör.

1. Anti-NPY (reagens A)

Antiserum från kanin mot NPY konjugerat med bovint tyreoglobulin. Frystorkat i 2.0 mL 0.5 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 2.5% humant serumalbumin, 2.5% EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.5% natriumazid och 5000 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) per mL. Till 100 rör. Rekonstitueras med 22 mL destillerat vatten.
Färg: Gult.

2. ¹²⁵I-märkt NPY (reagens B)

Innehåller per referensdatum 28 KBq eller 0.75 µCi. Syntetiskt humant NPY, joderat enligt Bolton-Hunter. 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, 2.5% EDTA, 1.0% Tween 80, 0.5% natriumazid och 5000 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) per mL. Rekonstitueras med 25 mL destillerat vatten.
Färg: Blått.

3. Dubbel antikropp fast fas (reagens C)

Antikanin-Ig kopplat till cellulosapartiklar i 0,01 M fosfatbuffert, pH 6,8 med 0,25% humant serumalbumin, 0,045% NaCl, 0,05% NaN₃, 0,185% EDTA och 0,05% Tween 80.
11,0 mL suspension.

4. Standardspädningsmedel (reagens D)

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

5. NPY-standard 3000 pmol/L (reagens E)

Frystorkat. 2.00 mL standard. Koncentration: 3000 pmol/L efter rekonstituering. Standard är framställd av syntetiskt humant NPY. Frystorkat i 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.05% natriumazid och 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) per mL. För beredning av NPY arbetsstandarder.

6. Spädningsbuffert (reagens F)

5.0 mL 0.05 M fosfatbuffert, pH 7.4, med 0.25% humant serumalbumin, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.05% natriumazid och 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) per mL.
Används i stället för antiserum i rör för ospecifik bindning.

7. Kontroller (reagens G-H)

Frystorkat serum med låg och hög koncentration av NPY. 2.00 mL av respektive kontroll efter rekonstituering. NPY-koncentrationen i kontrollerna indikeras på ampullernas etiketter. Innehåller 0.05% natriumazid.

BEREDNING OCH FÖRVARING AV REAGENS

Alla reagens ska förvaras vid 2-8° C fram till rekonstituering och användning. 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. Reagensens stabilitet indikeras på ampullernas etiketter. För frystorkade reagens gäller utgångsdatum fram till rekonstituering. Rekonstituerade reagens är stabila i 10 veckor om de lagras på rätt sätt (dock ej längre än till utgångsdatum).

Reagens A: Anti- NPY

Rekonstitueras med 22 mL destillerat vatten.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens B: ¹²⁵I-märkt NPY

Rekonstitueras med 25 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

Reagens C: Dubbel antikropp fast fas

Bruksfärdig. Rör om hela tiden när detta reagens pipetteras.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens D: Standardspädningsmedel

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

Reagens E: NPY-standard 3000 pmol/L

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

Reagens F: Spädningsbuffert

Bruksfärdig.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens G-H: Kontroller

Rekonstitueras med 2.00 mL destillerat vatten. Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

REAGENS OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

Engångsprovror 11-13 x 55 mm, polystyren.

Pipetter med engångsspetsar, 100 och 200 µL.

Tillsatsen av reagens underlättas av tillgång till en repeterande pipett, t ex Eppendorf

Multipipette, för volymerna 100 och 200 µL.

Ställbar pipett 200-1000 µL.

Vortexblandare

Centrifug som klarar minst 1700 x g (helst en kyld centrifug).

Gammaräknare

Destillerat vatten

PROVTAGNING

Venöst blod uppsamlas i rör utan tillsatser. Provet får koagulera. Serum separeras genom centrifugering vid +4° C. Serum fryses vid -20° C inom 1 timme. Serum förvaras vid -20° C eller lägre fram till analystillfället.

Plasmaprov kan också användas (EDTA eller heparin), men bör inte spädas (spädning av plasma med standardspädningsmedlet kan leda till koagulation under inkubationen).

Upprepad frysning-upptining bör undvikas.

RADIOIMMUNOANALYS

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

En fullständig analys omfattar:

Standardprov (St-rör): 7 olika koncentrationer: 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 samt 300 pmol/L.

Kontrollprov (C-rör): Kontrollprov med kända koncentrationer av NPY.

Analysprov (P-rör):

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

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

En översikt återfinns på sidan 86.

GENOMFÖRANDE

1. Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna.
2. Bered arbetsstandarder av NPY genom spädning av standard som innehåller 3000 pmol/L (reagens E) med standardspädningsmedlet (reagens D) enligt följande:
 - A/ 0.200 mL standard 3000 pmol/L + 1.800 mL spädningsmedel= 300 pmol/L
 - B/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL spädningsmedel= 150 pmol/L
 - C/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL spädningsmedel= 75 pmol/L
 - D/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL spädningsmedel= 37.5 pmol/L
 - E/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL spädningsmedel= 18.8 pmol/L
 - F/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL spädningsmedel= 9.4 pmol/L
 - G/ standardspädningsmedel= 0 pmol/L

Förvara standarderna vid -18°C eller lägre om de ska användas flera gånger.
3. Pipettera 200 µL av standarderna (0-300 pmol/L), kontrollerna och analysproven i respektive provrör. Pipettera 200 µL nollstandard i OSB-rören.
4. Pipettera 200 µL av anti-NPY (reagens A) i samtliga rör utom OSB- och TOT-rören.
5. Pipettera 200 µL spädningsbuffert (reagens F) i OSB-rören.
6. Vortexblanda och inkubera i 20-24 timmar vid 2-8° C.
7. Pipettera 200 µL ¹²⁵I-NPY (reagens B) i samtliga rör. Sätt lock på TOT-rören och ta undan dem.
8. Vortexblanda och inkubera i 20-24 timmar vid 2-8° C.
9. Tillsätt 100 µL dubbel antikropp på fast fas (reagens C) till alla rör utom TOT-rören (rör om kontinuerligt under pipetteringen).
10. Vortexblanda och inkubera i 30-60 minuter vid 2-8° C.
11. Centrifugera rören i 15 minuter vid +4° C (1700 x g).
12. Dekantera supernatanten omedelbart efter centrifugeringen.
13. Mät radioaktiviteten i pelleten med gammaraäknare (mättid 2-4 minuter).

BERÄKNING AV RESULTAT

1. Subtrahera medelvärdet av OSB-rörens CPM från standardernas, kontrollernas och provens CPM.
2. Skapa en standardkurva genom att avsätta fraktionen bunden aktivitet (CPM eller % B/TOT) mot koncentrationen i NPY-standarderna. På sidan 87 avbildas ett exempel på en standardkurva.
3. Interpolera fram NPY-koncentrationerna i kontrollerna och analysproven utgående från standardkurvan.
4. Bildandet av standardkurvan och beräkningen av koncentrationer i analysproven kan göras med datorstöd.

SPÄDNING AV PROV

Serumprov med NPY-koncentrationer över 300 pmol/L bör spädas med standardspädningsmedel (reagens D) för bestämning av faktisk koncentration NPY.

Följande procedur rekommenderas:

Spädning 1:2: Pipettera 100 µL prov och 100 µL standardspädningsmedel i analysröret (dubblera analysen).

Spädning 1:4: Pipettera 50 µL prov och 150 µL standardspädningsmedel i analysröret (dubblera analysen).

PRESTANDA**Känslighet**

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

Noggrannhet

Återvinningen var i medeltal 82.4% (intervall 75-88%) vid analys av plasmaprov med kända tillsatta mängder NPY. NPY-tillsatsen låg i intervallet: 50-150 pmol/L

Precision

Variation inom analyser

<u>Nivå</u>	<u>Variationskoefficient (% VK)</u>	<u>N</u>
43.7 pmol/L	5.0	8
98.9 pmol/L	4.5	8

Variation mellan analyser (totalt)

<u>Nivå</u>	<u>Variationskoefficient (% VK)</u>	<u>N</u>
42.4 pmol/L	9.2	6
90.2 pmol/L	7.6	6

Specificitet

Följande korsreaktioner med relaterade peptider har uppmätts:

Substans	Korsreaktion
Neuropeptid Y, människa	100.0%
Peptide YY, människa	<0.1%
Pankreaspolypeptid, människa	<0.1%
PYY 3-36	<0.1%
NPY 22-36	<0.1%
PP Bovine	<0.1%

Interferens

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

KVALITETSKONTROLL

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

1. Kontroller

De uppmätta koncentrationerna i kontrollerna (reagensen G och H) ska ligga inom de gränser som anges på ampullerna.

2. Total aktivitet (TOT)

De erhållna värdena bör ligga nära förväntade CPM efter korrigerig för räknarens verkningsgrad och isotopens sönderfall. Innehållet av ¹²⁵I-NPY i detta kit ger 10 500 CPM (-5%, +20%) vid referensdatum (räknarens verkningsgrad = 80%).

3. Maximal bindning (B₀/TOT)

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

4. Ospecifik bindning (OSB/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av icke-specifik bindning: $(OSB/TOT) \times 100$.
 $(OSB/TOT) \times 100$ är mindre än 8%.

5. Formen på standardkurvan

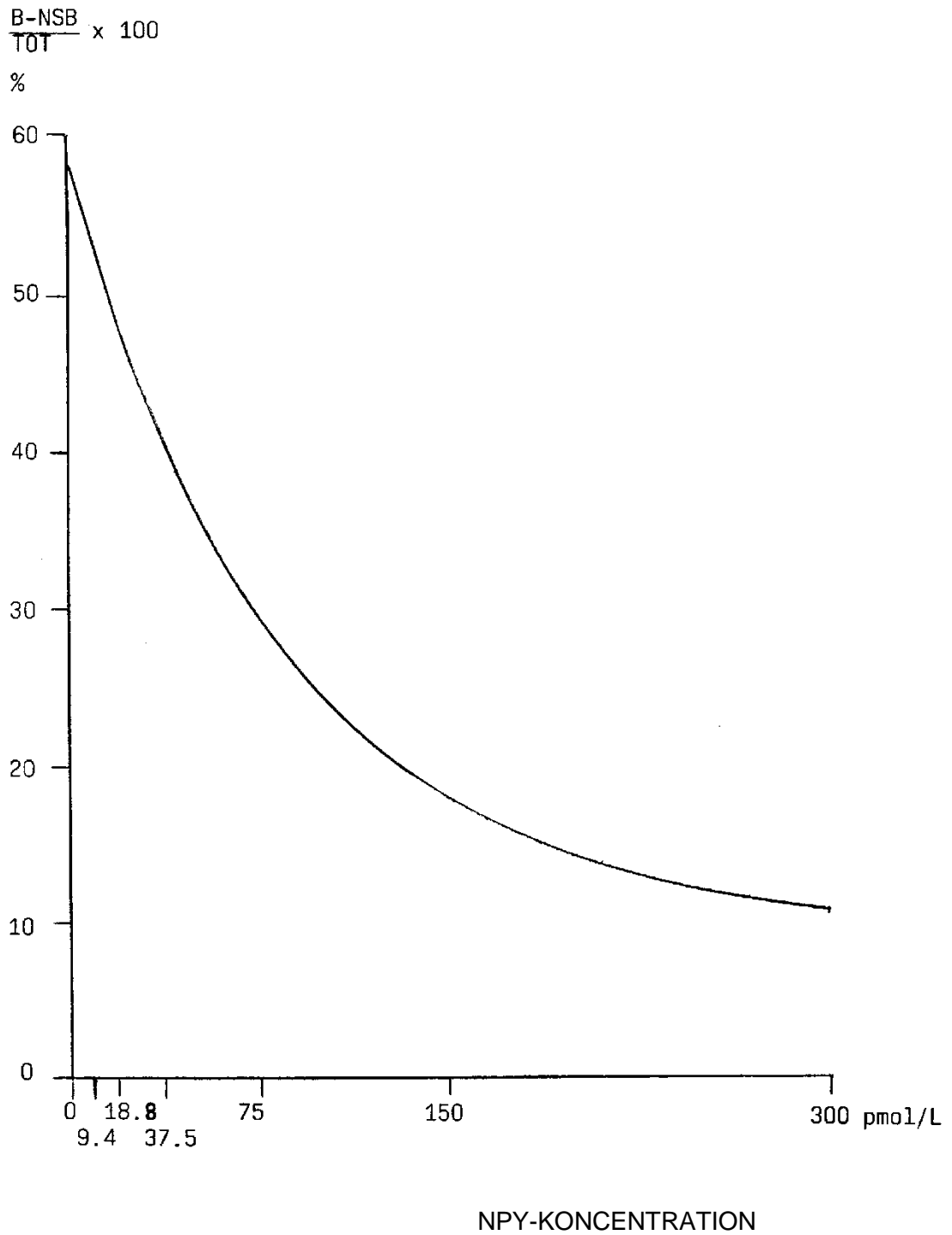
Beräkna exempelvis 80, 50 och 20 %-punkterna på standardkurvan för kontroll av reproducerbarhet från analystillfälle till analystillfälle.

SCHEMA ÖVER UTFÖRANDET

Typ av rör	Rör nr	Standard, kontroll eller prov	Anti-NPY (A)	Spädningsbuffert (F)		¹²⁵ I-NPY (B)		Dubbel antikropp fast fas (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexa	200 µL	Vortexa	-	Vortexa
OSB	3-4	200 µL	-	200	och	200 µL	och	100 µL	och inkubera
Stand 0	5-6	200 µL	200 µL	-	inkubera	200 µL	inkubera	100 µL	30-60
Stand 9.4	7-8	200 µL	200 µL	-	20-24	200 µL	20-24	100 µL	min.
Stand 18.8	9-10	200 µL	200 µL	-	timmar	200 µL	timmar	100 µL	vid
Stand 37.5	11-12	200 µL	200 µL	-	vid	200 µL	vid	100 µL	2-8° C.
Stand 75	13-14	200 µL	200 µL	-	2-8° C.	200 µL	2-8° C.	100 µL	Centrifugera
Stand 150	15-16	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	15 min.
Stand 300	17-18	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	1700 x g
Kontroll (G)	19-20	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	vid +4° C.
Kontroll (H)	21-22	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	Dekantera
Prov 1	23-24	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	och
Prov 2	25-26	200 µL	200 µL	-		200 µL		100 µL	avläs precipitatens radioaktivitet.

Table 1

EXEMPEL PÅ NPY STANDARDKURVA









REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

1. Tatemoto, K.
Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 79:5485, 1982
2. Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.
Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptides.
Nature (London) 296: 659, 1982.
3. Corder, R., Emson, P.C. and Lowry, P.J.
Purification and characterization of human neuropeptide Y from adrenal medullary pheochromocytoma tissue.
Biochem J 219:699, 1984.
4. Tatemoto, K.
Isolation and characterization of peptide YY (PYY) a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc Natl Acad Sci USA 79:2514, 1982.
5. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T. et al.
Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.
Acta Physiol Scand 116:477, 1982.
6. Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M. et al.
Neuropeptide Y distribution in rat brain.
Science 221:877, 1983.
7. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt T. and Goldstein, M.
High levels of neuropeptide Y (NPY) in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.
Neurosci Lett 42:167, 1983.
8. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C. et al.
Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea pig digestive tract.
Cell Tissue Res 234:71, 1983.
9. Lundberg, J.M. and Tatemoto, K.
Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol Scand 116:393, 1982.
10. Lundberg, J.M. and Stjärne, L.
Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and contractile response evoked by fieldstimulation in rat vas deference.
Acta Physiol Scand 120:477, 1984.

11. Lundberg, J.M., Hua, X.Y. and Franco-Cereceda, A.
Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig.
Acta Physiol Scand 121:325, 1984.
12. Adrian, T.E., Terenghi, G., Brown, M.J. et al.
Neuropeptide Y in pheochromocytomas and ganglioneuroblastomas.
Lancet ii:540, 1983.
13. Emson, P.C., Corder, R. and Lowry, P.J.
Demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human pheochromocytoma extracts.
Regulatory Peptides 8:89, 1984.
14. Theodorsson-Norheim, E., Hemsen, A. and Lundberg, J.M.
Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): Chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts.
Scand J Clin Lab Invest 45:355, 1985.
15. Kogner, P., Björk, O. and Theodorsson, E.
Neuropeptide Y in neuroblastoma: Increased concentration in metastasis, release during surgery, and characterization of plasma and tumour extracts.
Medical and Pediatric Oncology 21:317-322, 1993.
16. Kogner, P., Ericsson, A., Barbany, G., Persson, H., Theodorsson, E. and Björk, O.
Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukemia.
Blood, vol. 80, no. 5 (september 1), 1992:pp 1324-1329.
17. Kalra, S.P., Gube, M.G., Bin Xu, S.P., Horvath, T.L. and Kalra P.S.
Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight.
Endocrine reviews 20(1):68-100, (1999).
18. Kallio, J., Pesonen, U., Kaipio, K., Karvonen, M.K., Jaakkola, U., Heinonen, O.J., Uusitupa, M.I.J. and Koulu, M.
Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans.
The FASEB Journal express article 10.1096/fj.00-0437.fje. Published online March 12, 2001.

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-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY. Anti-NPY.
REAG B Ag ¹²⁵ I	¹²⁵ I-NPY. Anti-NPY. NPY-I ¹²⁵ . ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY. ¹²⁵ I-NPY.
REAG C DASP	Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps Doble anticuerpo en fase sólida. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas.
REAG D DIL CAL	Standard diluent. Diluant standard. Diluyente estándar. Standard Verdünner. Diluente degli standard. Standardspädningsmedel.
REAG E CAL 3000	NPY standard 3000 pmol/L. Standard de NPY, 3000 pmol/l. NPY estándar de 3000 pmol/L. NPY Standard 3000 pmol/L. NPY standard 3000 pmol/L. NPY-standard 3000 pmol/L.
REAG F BUF AS	Assay buffer. Tampon de dosage. Tampón de ensayo. Assaypuffer. Tampone. Spädningsbuffert.
REAG G CONTROL	Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso). Kontroll, nivå 1 (låg).
REAG H 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