

## Instructions for Use

# Gastrin RIA

RUO

REF RIA-3014R



100



**DRG**

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



**DRG**

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.**  
**Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.**  
**Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.**  
**Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**  
**Molimo koristite samo važeću verziju uputstva u pakovanju isporučenog sa kitom.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Sadržaj

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | INTENDED USE.....   | 2  |
| 2  | BACKGROUND.....   | 2  |
| 3  | PRINCIPLES OF THE METHOD .....                                    | 2  |
| 4  | REAGENTS PROVIDED.....  | 2  |
| 5  | SUPPLIES NOT PROVIDED .....                                       | 3  |
| 6  | REAGENT PREPARATION .....   | 3  |
| 7  | STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS .....                   | 3  |
| 8  | SPECIMEN COLLECTION.....  | 3  |
| 9  | PROCEDURE .....   | 3  |
| 10 | CALCULATION OF RESULTS.....                                       | 4  |
| 11 | PERFORMANCE AND LIMITATIONS .....                                 | 5  |
| 12 | INTERNAL QUALITY CONTROL.....                                     | 6  |
| 13 | PRECAUTIONS AND WARNINGS .....                                    | 7  |
| 14 | SUMMARY OF THE PROTOCOL.....                                      | 7  |
|    |   |    |
| 1  | VERWENDUNGSZWECK.....   | 8  |
| 2  | HINTERGRUND.....  | 8  |
| 3  | GRUNDSÄTZE DER METHODE .....                                      | 8  |
| 4  | MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....                                     | 8  |
| 5  | NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL.....                                | 9  |
| 6  | VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....                                  | 9  |
| 7  | AUFBEWARUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN ..... | 9  |
| 8  | PROBENENTNAHME .....  | 9  |
| 9  | VERFAHREN .....   | 9  |
| 10 | BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....                                   | 10 |
| 11 | LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN .....                               | 11 |
| 12 | INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....                                  | 12 |
| 13 | VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN .....                            | 13 |
| 14 | ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS .....                              | 13 |
|    |   |    |
| 1  | NAMENA.....   | 14 |
| 2  | SLIKA.....  | 14 |
| 3  | PRINCIPI METAODA.....   | 14 |
| 4  | OBEZBEĐENI REAGENSI.....  | 14 |
| 5  | NISU OBEZBEĐENE ZALIHE.....                                       | 15 |
| 6  | PRIPREMA REAGENSA.....  | 15 |
| 7  | ČUVANJE I ROK UPOTREBE REAGENASA.....                             | 15 |
| 8  | UZIMANJE UZORAKA.....   | 15 |
| 9  | POSTUPAK.....   | 15 |
| 10 | IZRAČUNAVANJE REZULTATA.....                                      | 16 |
| 11 | DEJSTVO I OGRANIČENJA .....                                       | 17 |
| 12 | INTERNA KONTROLA KVALITETA.....                                   | 18 |
| 13 | PREDOSTROŽNOST I UPOZORENJA .....                                 | 19 |
| 14 | SADRŽAJ PROTOKOLA.....  | 19 |
|    |   |    |
| 15 | REFERENCES / LITERATURE / BIBLIOGRAFIJA.....                      | 20 |
|    |   |    |
|    | SYMBOLS USED.....   | 21 |

## 1 INTENDED USE

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

**For Research use only. Not for use in diagnostic procedures.**

## 2 BACKGROUND

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

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

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

## 3 PRINCIPLES OF THE METHOD

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

For professional use within a laboratory.

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

## 4 REAGENTS PROVIDED

|                        | Reagents   | 100 Tests Kit                   | Reconstitution  |
|------------------------|--|---------------------------------|---|
| [ANTISERUM]            | Rabbit antiserum raised against synthetic human gastrin-17 conjugated to bovine serum albumin. Diluent: phosphate buffer, human serum albumin and sodium azide (< 0.1%). | 1 vial<br>21 mL                 | <b>Ready</b> for use  |
| [Ag $^{125}\text{I}$ ] | TRACER: $^{125}\text{I}$ odine labelled Gastrin in phosphate buffer with human serum albumin and NaN <sub>3</sub> .  | 1 vial<br>lyophilised<br>66 kBq | <b>Add</b> 25 mL distilled water  |
| [Ab PEG]               | Double antibody-PEG: Goat anti-rabbit Ig antiserum in phosphate buffer with human serum albumin and sodium azide. (< 0.1%). Contains polyethylene glycol                 | 1 vial<br>50 mL                 | <b>Ready</b> for use  |
| [ASS BUF]              | Assay buffer: phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide, (< 0.1%).  | 1 vial<br>40 mL                 | <b>Ready</b> for use  |
| [CAL]                  | Gastrin calibrator in phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide (< 0.1%).   | 1 vial<br>lyophilised           | <b>Reconstitute</b> with distilled water by the volume stated on the vial label |
| [CONTROL N]            | Control - N = 1 or 2<br>Lyophilised controls with two different levels of gastrin.   | 2 vials<br>lyophilised          | <b>Add</b> 1 mL distilled water   |

## 5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

## 6 REAGENT PREPARATION

### A) Antiserum:

Ready for use. Store at 2 °C - 8 °C.

### B) <sup>125</sup>I-gastrin:

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

### C) Double Antibody-PEG:

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

### D) Assay buffer:

Ready for use. Store at 2 °C - 8 °C.

### E) Gastrin calibrator:

Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label.

For preparation of working calibrators, see radioimmunoassay procedure.

Store at -18 °C or lower if reused.

### F) Controls:

Reconstitute each vial with 1 mL distilled water. Store at -18 °C or lower if reused.

## 7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

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

## 8 SPECIMEN COLLECTION

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

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

## 9 PROCEDURE

### 9.1 Handling notes

Reconstitute the reagents as specified.

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

A complete assay includes:

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

Controls: Low and high.

Samples.

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

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

## 9.2 Procedure

1. Reconstitute the lyophilised reagents according to the instructions and allow the reagents to reach room temperature.
2. Prepare the gastrin working calibrators by dilution of the Gastrin calibrator 500 pmol/L with assay buffer according to the following example:
  - a. Gastrin calibrator after reconstitution = 500 pmol/L
  - b. 1.0 mL calibrator 500 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 250 pmol/L
  - c. 1.0 mL calibrator 250 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 125 pmol/L
  - d. 1.0 mL calibrator 125 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 62.5 pmol/L
  - e. 1.0 mL calibrator 62.5 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 31.2 pmol/L
  - f. 1.0 mL calibrator 31.2 pmol/L + 1.0 mL assay buffer = 15.6 pmol/L
  - g. Assay buffer = 0 pmol/L

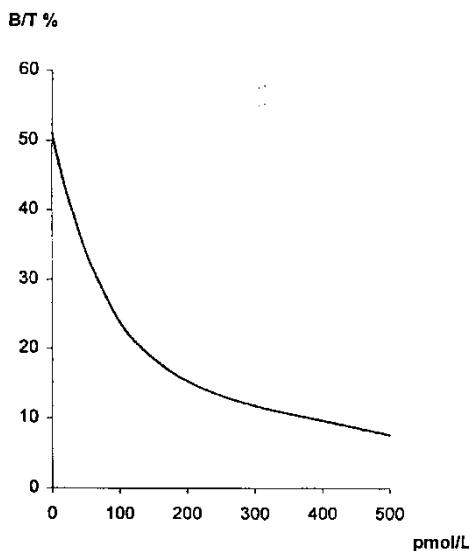
(Store the calibrators at -20 °C or lower if reused).

3. Pipette 100 µL of calibrators, controls and samples in their respective tubes.
4. Pipette 300 µL assay buffer into NSB-tubes.
5. Pipette 200 µL anti-Gastrin into all tubes except NSB and TOT.
6. Vortex the tubes and incubate for 60 min at room temperature (18 °C - 25 °C).
7. Pipette 200 µL of <sup>125</sup>I-Gastrin into all tubes. The TOT-tubes are capped and kept aside.
8. Vortex the tubes and incubate for 60 min at room temperature (18 °C - 25 °C).
9. Add 500 µL of well mixed double antibody-PEG into all tubes except TOT.  
Vortex carefully and incubate 30 - 60 min at room temperature.
10. Centrifuge for 15 min at minimum 1700 x g, temperature 4 °C.
11. Decant the supernatant immediately after centrifugation, and count the radioactivity in the precipitates in a gamma counter.

## 10 CALCULATION OF RESULTS

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

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



## 11 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### 11.1 Limit of Detection

The LoB (limit of blank) was calculated by measuring the blank 22 times and was calculated as the Mean - 2 Standard Deviations of the distribution of the test values .

The LoB was calculated to be 6.3 pmol/L.

The LoD (Limit of Detection) was calculated as the LoB + 1.645 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different runs.

The LoD was calculated to be 10 pmol/L

The LoQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 4 low values samples, 10 times.

The LoQ was calculated to be 11.6 pmol/L

### 11.2 Precision

Intra assay variation

| Level        | Coefficient of variation (%CV) | N  |
|--------------|--------------------------------|----|
| 35.4 pmol/L  | 4.1%                           | 24 |
| 162.6 pmol/L | 4.2%                           | 24 |

Inter assay variation

| Level        | Coefficient of variation (%CV) | N  |
|--------------|--------------------------------|----|
| 40.0 pmol/L  | 6.0%                           | 10 |
| 177.4 pmol/L | 4.0%                           | 10 |

### 11.3 Accuracy

#### DILUTION TEST

| Sample | Dilution | Theoretical Concentration (pmol/L) | Measured Concentration (pmol/L) |
|--------|----------|------------------------------------|---------------------------------|
| A      | 1/1      | 145.71                             | 145.71                          |
|        | 1/2      | 72.86                              | 73.65                           |
|        | 1/4      | 36.43                              | 40.57                           |
|        | 1/8      | 18.21                              | 21.79                           |
|        | 1/16     | 9.11                               | 10.79                           |
| B      | 1/1      | 46.78                              | 46.78                           |
|        | 1/2      | 23.39                              | 23.11                           |
|        | 1/4      | 11.70                              | 12.76                           |
|        | 1/8      | 5.85                               | 4.84                            |

Samples were diluted with the assay buffer.

## 11.4 Specificity

The following cross reactions have been found:

| Compound                  | Cross reaction (%) |
|---------------------------|--------------------|
| Gastrin-17                | 100                |
| Gastrin-17, sulphated     | 87.8               |
| Gastrin-34                | 83.1               |
| CCK-8                     | 40.4               |
| Gastrin 1-14              | < 0.01             |
| Gastrin releasing peptide | <0.01              |

## 11.5 Interference

The effect of potential interfering substances on samples using the Gastrin RIA test was evaluated. Different levels of Haemoglobin, Bilirubin conjugated, Bilirubin non conjugated, and Triglyceride were tested on samples with different Gastrin concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. The tested substances did not affect the performance of the Gastrin RIA test.

| Substance                | Gastrin concentration (pmol/L) | Concentration of Interferent (mg/dL) | Mean % Variation |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| Haemoglobin              | 38.8                           | 500                                  | +1.0 %           |
|                          |                                | 250                                  |                  |
|                          | 168.0                          | 500                                  |                  |
|                          |                                | 250                                  |                  |
| Non conjugated Bilirubin | 41.2                           | 15                                   | +4.5%            |
|                          |                                | 10                                   |                  |
|                          | 159.4                          | 15                                   |                  |
|                          |                                | 10                                   |                  |
| Conjugated Bilirubin     | 38.8                           | 2                                    | -2.1%            |
|                          |                                | 0.4                                  |                  |
|                          | 168.0                          | 2                                    |                  |
|                          |                                | 0.4                                  |                  |
| Triglyceride             | 49.4                           | 250                                  | +0.7%            |
|                          |                                | 50                                   |                  |
|                          | 160.8                          | 250                                  |                  |
|                          |                                | 50                                   |                  |

## 12 INTERNAL QUALITY CONTROL

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

### 1. Controls

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

### 2. Total counts

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

### 3. Maximum binding (B<sub>0</sub>/TOT)

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

### 4. Non-specific binding (NSB/TOT)

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

The non-specific is less than 5%.

### 5. Slope of calibration curve

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

## 13 PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

#### For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

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  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (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.

## 14 SUMMARY OF THE PROTOCOL

|  | Total count | NSB               | Calibrators (0 - 6) | Controls          | Samples           |
|--|-------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Calibrators</b>                                       | -           | -                 | 100 $\mu\text{L}$   | -                 | -                 |
| <b>Controls</b>  | -           | -                 | -                   | 100 $\mu\text{L}$ | -                 |
| <b>Samples</b>   | -           | -                 | -                   | -                 | 100 $\mu\text{L}$ |
| <b>Assay diluent</b>                                     | -           | 300 $\mu\text{L}$ | -                   | -                 | -                 |
| <b>Antiserum</b>   | -           | -                 | 200 $\mu\text{L}$   |                   |                   |
| Vortex-mix and incubate for 60 min at 18 °C - 25 °C      |             |                   |                     |                   |                   |
| <b><math>^{125}\text{I}</math> Tracer</b>                |             |                   | 200 $\mu\text{L}$   |                   |                   |
| Vortex-mix and incubate for 60 min at 18 °C - 25 °C      |             |                   |                     |                   |                   |
| <b>Double antibody PEG</b>                               | -           |                   | 500 $\mu\text{L}$   |                   |                   |
| Vortex-mix and incubate for 30 - 60 min at 18 °C - 25 °C |             |                   |                     |                   |                   |
| Centrifuge 15 min ( 1700 g ) at 4 °C                     |             |                   |                     |                   |                   |
| Decant and count the radioactivity of the precipitates   |             |                   |                     |                   |                   |

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunassay für die quantitative *In-vitro* -Messung von Gastrin in menschlichem Serum.

**Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.**

## 2 HINTERGRUND

Gastrin und die Vagusnerven sind die Hauptregulatoren der Magensäuresekretion. Zur Magensäuresekretion tragen jedoch andere Faktoren als Gastrin bei. Die Gastrinproduktion erfolgt im Wesentlichen in der antropylorischen Magenschleimhaut. Einige Gastrin produzierende Zellen sind unter Umständen auch im Zwölffingerdarm und in der Bauchspeicheldrüse vorhanden.

Gastrin kommt im menschlichen Serum in vielen verschiedenen Formen vor. Ein amidierter C-Terminus ist für die biologische Aktivität der Gastrine ausschlaggebend.

Progastrin wird von Preprogastrin gespalten. Es hat sich gezeigt, dass Progastrin in den Tyrosinresten teilweise sulfatiert ist. Das Progastrin wird enzymatisch in die wichtigsten zirkulierenden Formen von biologisch aktivem Gastrin gespalten: Gastrin-34 und Gastrin-17, die in sulfatierten und nicht sulfatierten Formen vorkommen. Geringe Mengen von Gastrin-52 (auch Komponente 1 genannt), Gastrin-14 (Mini-Gastrin) und noch kleinere Fragmente wurden im Serum nachgewiesen.

## 3 GRUNDSÄTZE DER METHODE

Gastrin im Serum wird durch einen kompetitiven Radioimmunoassay unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen ein Gastrin-17- Rinderserumalbumin-Konjugat untersucht. Bei der Bindung an die Antikörper konkurriert Gastrin in Kalibratoren und Proben mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem Gastrin-17. In einem 2-Schritt-Inkubationsprotokoll wird  $^{125}\text{I}$ -Gastrin im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von Gastrin in Kalibratoren und Proben an die Antikörper gebunden.

Antikörpergebundenes  $^{125}\text{I}$ -Gastrin wird unter Verwendung der doppelten Antikörper-Polyethylenglykol-Präzipitationstechnik von der ungebundenen Fraktion getrennt. Die Radioaktivität des Präzipitate wird gemessen. Das in diesem Assay verwendete Antiserum zeigt eine Kreuzreaktion mit Gastrin-34 und den sulfatierten Formen von Gastrin-17.

Für den professionellen Einsatz innerhalb eines Labors.

Das Ergebnis darf nicht für die klinische Diagnose oder das Patientenmanagement verwendet werden.

## 4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

|                        | Reagenzien   | 100 Tests Kit                           | Rekonstitution   |
|------------------------|--|---|--|
| [ANTISERUM]            | Kaninchen-Antiserum gegen synthetisches menschliches Gastrin-17 konjugiert mit Rinderserumalbumin. Verdünnungsmittel: Phosphatpuffer, humanes Serumalbumin und Natriumazid (<0,1 %). | 1 Fläschchen<br>21 mL                   | <b>Gebrauchsfertig</b>   |
| [Ag $^{125}\text{I}$ ] | TRACER: $^{125}\text{I}$ Jodmarkiertes Gastrin in Phosphatpuffer mit humanem Serumalbumin und NaN <sub>3</sub> .   | 1 Fläschchen<br>Lyophilisiert<br>66 kBq | 25 mL destilliertes Wasser<br><b>hinzufügen</b>  |
| [Ab PEG]               | Doppel-Antikörper-PEG: Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig Antiserum in Phosphatpuffer mit humanem Serumalbumin und Natriumazid. (<0,1 %). Enthält Polyethylenglycol                            | 1 Fläschchen<br>50 mL                   | <b>Gebrauchsfertig</b>   |
| [ASS BUF]              | Assay-Puffer: Phosphatpuffer, der humanes Serumalbumin und Natriumazid enthält (<0,1 %).   | 1 Fläschchen<br>40 mL                   | <b>Gebrauchsfertig</b>   |
| [CAL]                  | Gastrin-Kalibrator in Phosphatpuffer, der humanes Serumalbumin und Natriumazid enthält (<0,1 %).   | 1 Fläschchen<br>Lyophilisiert           | Mit destilliertem Wasser mit dem auf dem Fläschchen-etikett angegebenen Volumen rekonstituieren. |
| [CONTROL N]            | Kontrolle – N = 1 oder 2<br>Lyophilisierte Kontrollen mit zwei verschiedenen Gastrinkonzentrationen.   | 2 Fläschchen<br>Lyophilisiert           | 1 mL destilliertes Wasser<br><b>hinzufügen</b>   |

## 5 NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Einweg-Reagenzgläser 11–13 x 55 mm, Polystyrol.
2. Pipetten mit Einwegspitzen, 100, 200 und 500 µL.
3. Eine Repetierpipette, z.B. Eppendorf Multipipette, für die Volumina 200 µL und 500 µL erleichtert die Dosierung der Reagenzien.
4. Vortex-Mixer.
5. Zentrifuge, für min 1700 x g geeignet (bevorzugt wird eine gekühlte Zentrifuge).
6. Gamma-Zähler, Kavitätstyp.

## 6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

### A) Antiserum:

Gebrauchsfertig. Bei 2 °C - 8 °C lagern.

### B) <sup>125</sup>I-Gastrin:

Mit 25 mL destilliertem Wasser rekonstituieren. Bei 2 °C - 8 °C lagern.

### C) Doppel-Antikörper-PEG:

Gebrauchsfertig. Vor der Anwendung gründlich durchmischen. Bei 2 °C - 8 °C lagern.

### D) Assay-Puffer:

Gebrauchsfertig. Bei 2 °C - 8 °C lagern.

### E) Gastrinkalibrator:

Mit destilliertem Wasser mit dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumen rekonstituieren.

Zur Vorbereitung der Arbeitskalibratoren siehe Kapitel 9.2 „Verfahren“.

Zur Wiederverwendung bei -18 °C oder kühler lagern.

### F) Kontrollen:

Jedes Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser rekonstituieren

Zur Wiederverwendung bei -18 °C oder kühler lagern.

## 7 AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien vor der Rekonstitution und Verwendung bei 2 °C - 8 °C lagern. Die Stabilität der Reagenzien ist auf den Etiketten der Fläschchen angegeben. Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die nicht rekonstituierten Reagenzien. Die rekonstituierten Reagenzien haben eine Haltbarkeit von 8 Wochen.

Das für die Rekonstitution der lyophilisierten Reagenzien verwendete Wasser sollte in einer Ganzglasapparatur destilliert werden oder von entsprechender Reinheit sein. Den Inhalt durch sanfte Inversion in einem Fläschchen auflösen und Schaumbildung vermeiden.

## 8 PROBENENTNAHME

Die Patienten sollten mindestens zehn Stunden vor der Probenentnahme nüchtern bleiben. Venenblut wird ohne Zusatzstoffe in Röhrchen gesammelt. Die Probe wird in einem Eisbad gekühlt und zur Gerinnung gebracht. Das Serum wird durch Zentrifugieren bei +4 °C getrennt.

Das Serum sollte innerhalb von 4 Stunden eingefroren und bis zur Untersuchung bei -18 °C oder kühler gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

## 9 VERFAHREN

### 9.1 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien wie angegeben rekonstituieren.

Die Reagenzien sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Genauigkeit bei allen Pipettierschritten ist unerlässlich. Alle Tests (Kalibratoren, Kontrollen und Proben) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet:

Kalibratoren: 7 Konzentrationen, 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 und 500 pmol/L.

Kontrollen: Niedrig und hoch.

Proben.

Röhrchen zur Bestimmung der nicht spezifischen Bindung (NSB-Röhrchen)

Röhrchen zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität (TOT-Röhrchen).

## 9.2 Verfahren

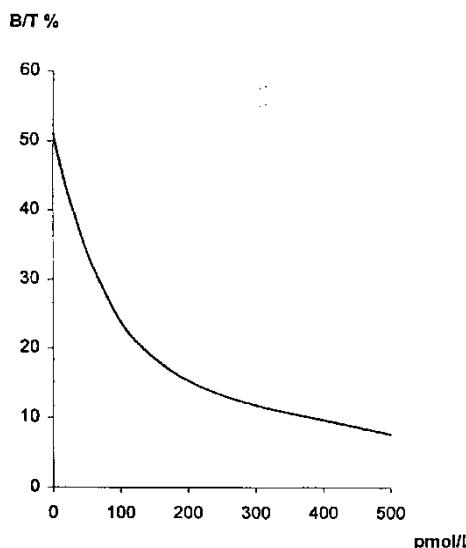
1. Die lyophilisierten Reagenzien entsprechend den Anweisungen rekonstituieren und die Reagenzien Raumtemperatur erreichen lassen.
2. Die Gastrin-Arbeitskalibratoren durch Verdünnung des Gastrinkalibrators 500 pmol/L mit Assay-Puffer wie folgt aufbereiten:
  - a. Gastrinkalibrator nach der Rekonstitution = 500 pmol/L
  - b. 1,0 mL Kalibrator 500 pmol/L + 1,0 mL Assay-Puffer = 250 pmol/L
  - c. 1,0 mL Kalibrator 250 pmol/L + 1,0 mL Assay-Puffer = 125 pmol/L
  - d. 1,0 mL Kalibrator 125 pmol/L + 1,0 mL Assay-Puffer = 62,5 pmol/L
  - e. 1,0 mL Kalibrator 62,5 pmol/L + 1,0 mL Assay-Puffer = 31,2 pmol/L
  - f. 1,0 mL Kalibrator 31,2 pmol/L + 1,0 mL Assay-Puffer = 15,6 pmol/L
  - g. Assay-Puffer = 0 pmol/L

(Die Kalibratoren bei -20 °C oder kühler lagern, wenn sie wiederverwendet werden sollen).
3. 100 µL Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
4. 300 µL Assay-Puffer in die NSB-Röhrchen pipettieren.
5. 200 µL Anti-Gastrin in alle Röhrchen außer NSB und TOT pipettieren.
6. Die Röhrchen vorsichtig mit dem Vortexmixer durchmischen und 60 Min. bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) inkubieren.
7. 200 µL <sup>125</sup>I-Gastrin in alle Röhrchen pipettieren. Die TOT-Röhren werden verschlossen und beiseite gestellt.
8. Die Röhrchen vorsichtig mit dem Vortexmixer durchmischen und 60 Min. bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) inkubieren.
9. Allen Röhrchen, außer dem TOT-Röhrchen, 500 µL gut gemischtes Doppel-Antikörper-PEG hinzugeben. Vorsichtig mit dem Vortexmixer durchmischen und 30 - 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Bei mindestens 1700 × g, Temperatur 4 °C, 15 Minuten zentrifugieren..
11. Den Überstand unmittelbar nach dem Zentrifugieren dekantieren und die Radioaktivität in den Präzipitaten mit einem Gammazähler messen.

## 10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Die durchschnittliche Zählrate (CPM) des NSB von der Zählrate (CPM) der Kalibrator-, Kontroll- und Probenreplikate substrahieren.
- Eine Kalibrierkurve wird durch Auftragen der gebundenen Fraktion B/TOT gegen die Konzentrationen der Gastrinkalibratoren erstellt.
- Die Gastrinkonzentrationen der Kontrollen und Proben aus der erstellten Kalibrierkurve interpolieren.
- Die Kalibrierkurve und die Berechnung der Gastrinkonzentrationen in den Proben können mit einer Computermethode durchgeführt werden. Es kann ein Spline-Verfahren verwendet werden.

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrierkurve verwendet werden.



## 11 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

### 11.1 Nachweisgrenze

Der LoB (limit of blank) wurde durch 22 Messungen des Blindwertes berechnet und ergibt sich aus dem Mittelwert - 2 Standardabweichungen der Verteilung der Testwerte.

Der LoB-Wert wurde mit 6,3 pmol/L berechnet.

Die LoD (Limit of Detection) wurde als LoB + 1,645 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration berechnet, die in 10 verschiedenen Läufen getestet wurde.

Die LoD wurde auf 10 pmol/L berechnet.

Der LoQ (Limit of Quantification) wurde berechnet, indem 4 Proben mit niedrigen Werten 10-mal getestet wurden.

Der LoQ wurde auf 11,6 pmol/L berechnet.

### 11.2 Präzision

Intra-Assay-Variation

| Konzentration | Variationskoeffizient (%CV) | N  |
|---------------|-----------------------------|----|
| 35,4 pmol/L   | 4,1%                        | 24 |
| 162,6 pmol/L  | 4,2%                        | 24 |

Inter-Assay-Variation (Gesamtvariation)

| Konzentration | Variationskoeffizient (%CV) | N  |
|---------------|-----------------------------|----|
| 40,0 pmol/L   | 6,0%                        | 10 |
| 177,4 pmol/L  | 4,0%                        | 10 |

### 11.3 Genauigkeit

#### VERDÜNNUNGSTEST

| Probe | Verdünnung | Theoretische Konzentration (pmol/L) | Gemessene Konzentration (pmol/L) |
|-------|------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| A     | 1/1        | 145,71                              | 145,71                           |
|       | 1/2        | 72,86                               | 73,65                            |
|       | 1/4        | 36,43                               | 40,57                            |
|       | 1/8        | 18,21                               | 21,79                            |
|       | 1/16       | 9,11                                | 10,79                            |
| B     | 1/1        | 46,78                               | 46,78                            |
|       | 1/2        | 23,39                               | 23,11                            |
|       | 1/4        | 11,70                               | 12,76                            |
|       | 1/8        | 5,85                                | 4,84                             |

Die Proben wurden mit dem Assaypuffer verdünnt.

### 11.4 Spezifität

Es wurden folgende Kreuzreaktionen festgestellt:

| Stoff                        | Kreuzreaktion % |
|------------------------------|-----------------|
| Gastrin-17                   | 100,0           |
| Gastrin-17, sulfatiert       | 87,8            |
| Gastrin-34                   | 83,1            |
| CCK-8                        | 40,4            |
| Gastrin 1-14                 | < 0,01          |
| Gastrin-freisetzendes Peptid | < 0,01          |

## 11.5 Interferenz

Die Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen auf Proben, die mit dem Gastrin RIA-Test untersucht wurden, wurden bewertet.

Verschiedene Konzentrationen von Hämoglobin, konjugiertem und nicht-konjugiertem Bilirubin und Triglycerid wurden an Proben mit unterschiedlichen Gastrin-Konzentrationen getestet. Unser Akzeptanzkriterium war eine Interferenz von weniger als 10 %. Die getesteten Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Leistung des Gastrin RIA-Tests.

| Substanz                     | Gastrin-Konzentration (pmol/L) | Konzentration der Störsubstanzen (mg/dL) | Mittlere Variation (%) |
|------------------------------|--------------------------------|--|------------------------|
| Hämoglobin                   | 38,8                           | 500                                      | +1,0 %                 |
|                              |                                | 250                                      |                        |
|                              | 168,0                          | 500                                      |                        |
|                              |                                | 250                                      |                        |
| Nicht konjugiertes Bilirubin | 41,2                           | 15                                       | +4,5%                  |
|                              |                                | 10                                       |                        |
|                              | 159,4                          | 15                                       |                        |
|                              |                                | 10                                       |                        |
| Konjugiertes Bilirubin       | 38,8                           | 2  | -2,1%                  |
|                              |                                | 0,4                                      |                        |
|                              | 168,0                          | 2  |                        |
|                              |                                | 0,4                                      |                        |
| Triglycerid                  | 49,4                           | 250                                      | +0,7%                  |
|                              |                                | 50                                       |                        |
|                              | 160,8                          | 250                                      |                        |
|                              |                                | 50                                       |                        |

## 12 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Um es dem Labor zu ermöglichen, die konsistente Durchführung des Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, sollten die folgenden wichtigen Faktoren überprüft werden.

### 1. Kontrollen

Die gefundenen Konzentrationen der Kontrollen sollten innerhalb der auf den Fläschchenetiketten angegebenen Grenzwerte liegen.

### 2. Gesamt-Aktivität

Die erhaltenen Zählrate sollten sich den erwarteten CPM annähern, wenn sie um die Counter-Effizienz und den radioaktiven Zerfall bereinigt werden. Der Gehalt an  $^{125}\text{I}$ -Gastrin in diesem Kit ergibt zum Referenzdatum 25000 CPM (-5, + 20 %) (Zähleffizienz = 80 %).

### 3. Maximale Bindung (B<sub>0</sub>/TOT)

Für jeden Assay die im Null-Kalibrator gebundene Radioaktivität in % berechnen: B<sub>0</sub>/TOT × 100

### 4. Nicht spezifische Bindung (NSB/TOT)

Für jeden Assay die nicht-spezifische Bindung in % berechnen: NSB/TOT × 100

Der nicht-spezifische Anteil beträgt weniger als 5 %.

### 5. Steigung der Kalibrierkurve

Die 80 %-, 50 %- und 20 %-Punkte der Kalibrierkurve z. B. auf Reproduzierbarkeit von Durchlauf zu Durchlauf überwachen.

## 13 VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

#### Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

Da die Vorschriften von Land zu Land unterschiedlich sein können, ist es notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person(en) mit den geltenden örtlichen Vorschriften in Bezug auf alle Aspekte radioaktiver Materialien der bei diesem Test verwendeten Art und Menge vertraut ist bzw. sind.

Dieses Kit enthält Bestandteile menschlichen Ursprungs. Sie wurden mittels Immunoassay auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen, Antikörper gegen HCV und auf Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutzerivaten beachtet werden.

Dieses Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tage), die ionisierende X- (28 keV) und γ- (35,5 keV) Strahlen emittieren. Es sollten Maßnahmen ergriffen werden, um die ordnungsgemäße Handhabung des radioaktiven Materials gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften sicherzustellen. Nur autorisiertes Personal sollte Zugang zu den Reagenzien haben.

Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sind beim Umgang mit radioaktiven Materialien zu beachten:

- Radioaktives Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert werden, die normalerweise für unbefugtes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material sollte nur in genehmigten Bereichen durchgeführt werden.
- Es sollte darauf geachtet werden, dass Verschlucken und Kontakt mit Haut und Kleidung vermieden wird. Radioaktive Lösungen nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Verwendung von radioaktivem Material darf weder gegessen, getrunken oder geraucht werden
- Die Hände sollten durch Handschuhe geschützt und nach der Verwendung radioaktiver Materialien gewaschen werden.
- Die Arbeiten sollten auf einer Oberfläche durchgeführt werden, die mit absorbierendem Einwegmaterial bedeckt ist.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort entfernt und alle kontaminierten Materialien als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Oberflächen sollten mit einem Reinigungsmittel gereinigt werden.

Die Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid. Der Kontakt mit Kupfer- oder Bleiabflussrohren kann zur kumulativen Bildung von hochexplosiven Azidablagerungen führen. Bei der Entsorgung der Reagenzien im Abwasser stets mit reichlich Wasser spülen, wodurch die Bildung von Metallazid verhindert wird. Rohrleitungen, bei denen der Verdacht besteht, dass sie mit diesen explosiven Ablagerungen kontaminiert sind, sollten gründlich mit 10%iger Natriumhydroxidlösung gespült werden.

## 14 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

|   | Gesamtaktivität | NSB    | Kalibratoren (0–6) | Kontrollen | Proben |  |  |  |  |
|---|-----------------|--------|--------------------|------------|--------|--|--|--|--|
| <b>Kalibratoren</b>   | -               | -      | 100 µL             | -          | -      |  |  |  |  |
| <b>Kontrollen</b>   | -               | -      | -                  | 100 µL     | -      |  |  |  |  |
| <b>Proben</b>   | -               | -      | -                  | -          | 100 µL |  |  |  |  |
| <b>Assay-Verdünnungsmittel</b>  | -               | 300 µL | -                  | -          | -      |  |  |  |  |
| <b>Antiserum</b>  | -               | -      |                    | 200 µL     |        |  |  |  |  |
| Mit dem Vortex-Mixer durchmischen und 60 Minuten bei 18 °C - 25 °C inkubieren       |                 |        |                    |            |        |  |  |  |  |
| <b><sup>125</sup>I-Tracer</b>   | 200 µL          |        |                    |            |        |  |  |  |  |
| Mit dem Vortex-Mixer durchmischen und 60 Minuten bei 18 °C - 25 °C inkubieren       |                 |        |                    |            |        |  |  |  |  |
| <b>Doppel-Antikörper-PEG</b>  | -               | 500 µL |                    |            |        |  |  |  |  |
| Mit dem Vortex-Mixer durchmischen und 30 - 60 Minuten bei 18 °C - 25 °C inkubieren. |                 |        |                    |            |        |  |  |  |  |
| 15 Minuten (1700 g ) bei 4 °C zentrifugieren.                                       |                 |        |                    |            |        |  |  |  |  |
| Abgießen und Radioaktivität der Präzipitate messen.                                 |                 |        |                    |            |        |  |  |  |  |

## 1 NAMENA

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

**Samo za istraživačku upotrebu. Nije za upotrebu u dijagnostičkim procedurama.**

## 2 SLIKA

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

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

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

## 3 PRINCIPI METODE

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

Za profesionalnu upotrebu u laboratoriji.

Rezultat se ne sme koristiti za kliničku dijagnozu ili upravljanje pacijentom.

## 4 OBEZBEĐENI REAGENSI

|                        | Reagensi  | 100 paketa za testiranje           | Rastvaranje  |
|------------------------|---|------------------------------------|--|
| [ANTISERUM]            | Zečji antiserum upotrebljen u odnosu na sintetički humani gastrin-17 konjugovan sa govedim serumskim albuminom. Razblaživač: fosfatni pufer, humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%). | 1 bočica<br>21 mL                  | <b>Spremno</b> za upotrebu   |
| [Ag $^{125}\text{I}$ ] | INDIKATOR: $^{125}\text{I}$ -Jod-Gastrin u fosfatnom puferu sa humanim serumskim albuminom i $\text{NaN}_3$ (natrijum azid).  | 1 bočica<br>liofilizovan<br>66 kBq | <b>Dodati</b> 25 mL destilovane vode   |
| [Ab PEG]               | Dvostruko antitelo-PEG: Protiv zečji Ig antiserum koze u fosfatnom puferu sa humanim serumskim albuminom i natrijum azidom. (<0.1%). Sadrži polietilen glikol                                 | 1 bočica<br>50 mL                  | <b>Spremno</b> za upotrebu   |
| [ASS BUF]              | Određivanje pufera: fosfatni pufer koji sadrži humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).   | 1 bočica<br>40 mL                  | <b>Spremno</b> za upotrebu   |
| [CAL]                  | Kalibrator gastrina u fosfatnom puferu koji sadrži humani serumski albumin i natrijum azid (<0.1%).   | 1 bočica<br>liofiliziran           | <b>Rekonstituirajte</b> destiliranom vodom prema zapremini navedenoj na etiketi boćice |
| [CONTROL N]            | Kontrola - N = 1 ili 2<br>Kontrolni materijal za liofiliziranje sa dva različita nivoa gastrina.  | 2 boćice<br>liofiliziran           | <b>Dodati</b> 1 mL destilovane vode  |

## 5 NISU OBEZBEĐENE ZALIHE

Dole navedeni materijal je potreban ali nije obezbeđen u pakovanju:

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

## 6 PRIPREMA REAGENSA

### A) Antiserum:

Spremno za upotrebu. Čuvati na temperaturi od 2 °C - 8 °C.

### B) <sup>125</sup>I-Gastrin:

Rastvoriti u 25 mL destilovane vode. Čuvati na temperaturi od 2 °C - 8 °C.

### C) Dvostruko antitelo PEG:

Spremno za upotrebu. Dobro promućkati pre upotrebe. Čuvati na temperaturi od 2 °C - 8 °C.

### D) Testni pufer:

Spremno za upotrebu. Čuvati na temperaturi od 2 °C - 8 °C.

### E) Kalibrator gastrina:

Rekonstituirajte destiliranim vodom prema zapremini navedenoj na etiketi boćice.

Za pripremu kalibratora, videti proceduru radioimunološkog testiranja.

Čuvati na temperaturi od -18 °C ili nižoj u slučaju ponovne upotrebe.

### F) Kontrola:

Rastvoriti sadržaj svake boćice u 1 mL destilovane vode. Čuvati na temperaturi od -18 °C ili nižoj u slučaju ponovne upotrebe.

## 7 ČUVANJE I ROK UPOTREBE REAGENASA

Čuvati sve reagense na temperaturi od 2 °C - 8 °C pre rastvaranja i upotrebe. Stabilnost reagenasa je naznačena na deklaracijama na boćicama. Za liofilizirane reagense, rok upotrebe je isti kao i za nerastvorene reagense. Rastvorenii reagensi su stabilni 8 nedelja ukoliko se čuvaju na adekvatan način.

Voda koja se koristi za rastvaranje liofiliziranih reagenasa treba da je destilovana i u staklenoj ambalaži ili da bude odgovarajuće čistoće. Rastvorite sadržaj u boćici laganim mešanjem izbegavajući stvaranje pene.

## 8 UZIMANJE UZORAKA

Pacijenti treba da ne jedu barem deset sati pre uzimanja uzorka. Krv iz vene skuplja se u epruvetama bez dodataka. Uzorak se hlađi u hladnoj vodi i ostavlja se da se zgruša. Serum se izdvaja centrifugiranjem na temperaturi od +4 °C.

Serum treba zamrznuti u roku od 4 sata i čuvati na temperaturi od -18 °C ili nižoj do testiranja. Treba izbegavati ponovno zamrzavanje i odmrzavanje.

## 9 POSTUPAK

### 9.1 Proceduralna uputstva

Rastorite naznačene reagense.

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

Kompletno određivanje uključuje:

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

Kontrolni materijal: Nizak i visok.

Uzorci.

Epruvete za određivanje nespecifičnog vezivanja (NSB epruvete).

Epruvete za određivanje ukupne radioaktivnosti (TOT epruvete).

## 9.2 Postupak

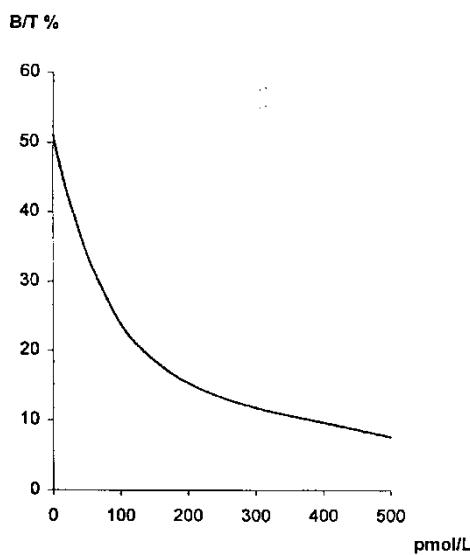
1. Rastvorite liofilizirane reagense prema uputstvima i pustite da reagensi dostignu sobnu temperaturu.
2. Pripremite kalibrator gastrina rastvaranjem kalibratora gastrina 500 pmol/L sa testnim puferom prema sledećem primeru:
  - a. Kalibrator gastrina nakon rastvaranja = 500 pmol/L
  - b. 1,0 mL kalibratora 500 pmol/L + 1,0 mL testnog pufera = 250 pmol/L
  - c. 1,0 mL kalibratora 250 pmol/L + 1,0 mL testnog pufera = 125 pmol/L
  - d. 1,0 mL kalibratora 125 pmol/L + 1,0 mL testnog pufera = 62,5 pmol/L
  - e. 1,0 mL kalibratora 62,5 pmol/L + 1,0 mL testnog pufera = 31,2 pmol/L
  - f. 1,0 mL kalibratora 31,2 pmol/L + 1,0 mL testnog pufera = 15,6 pmol/L
  - g. testni pufer = 0 pmol/L

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

## 10 IZRAČUNAVANJE REZULTATA

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

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



## 11 DEJSTVO I OGRANIČENJA

### 11.1 Granica detekcije

LoB (granica slepog dela) je izračunata merenjem slepog uzorka 22 put i izračunata je kao srednja vrednost - 2 standardne devijacije distribucije vrednosti testa. LoB je izračunato na 6,3 pmol/L.

LoD (granica detekcije) je izračunata kao LoB + 1,645 standardne devijacije uzorka niske koncentracije testiranog u 10 različitih serija. LoD je izračunat na 10 pmol/L.

LoK (granica kvantifikacije) je izračunata testiranjem 4 uzoraka niskih vrednosti, n = 10. LOK je 11,6 pmol/L.

### 11.2 Preciznost

Varijacije između testova

| Nivo         | Koeficijent varijacije (%CV) | N  |
|--------------|------------------------------|----|
| 35,4 pmol/L  | 4,1%                         | 24 |
| 162,6 pmol/L | 4,2%                         | 24 |

Varijacije unutar testa (ukupne varijacije)

| Nivo         | Koeficijent varijacije (%CV) | N  |
|--------------|------------------------------|----|
| 40,0 pmol/L  | 6,0%                         | 10 |
| 177,4 pmol/L | 4,0%                         | 10 |

### 11.3 Tačnost

#### TEST RAZREĐIVANJA

| Uzorak | Razblaživanje | Teorijska koncentracija (pmol/L) | Measured Concentration (pmol/L) |
|--------|---------------|----------------------------------|---------------------------------|
| A      | 1/1           | 145,71                           | 145,71                          |
|        | 1/2           | 72,86                            | 73,65                           |
|        | 1/4           | 36,43                            | 40,57                           |
|        | 1/8           | 18,21                            | 21,79                           |
|        | 1/16          | 9,11                             | 10,79                           |
| B      | 1/1           | 46,78                            | 46,78                           |
|        | 1/2           | 23,39                            | 23,11                           |
|        | 1/4           | 11,70                            | 12,76                           |
|        | 1/8           | 5,85                             | 4,84                            |

### 11.4 Specifičnost

Ustanovljene su sledeće unakrsne reakcije:

| Smeša                     | Unakrsna reakcija (%) |
|---------------------------|-----------------------|
| Gastrin-17                | 100,0                 |
| Gastrin-17, sulphated     | 87,8                  |
| Gastrin-34                | 83,1                  |
| CCK-8                     | 40,4                  |
| Gastrin 1-14              | < 0,01                |
| Gastrin releasing peptide | < 0,01                |

## 11.5 Mešanje

Procjenjen je efekat potencijalno interferirajućih supstanci na uzorke korišćenjem Gastrin RIA testa. Različiti nivoi hemoglobina, bilirubina i triglicerida su testirani na uzorcima sa različitim koncentracijama gastrina. Naš kriterijum prihvatanja je bio da imamo smetnje manje od 10%. Ispitane supstance nisu uticale na performanse Gastrin RIA testa.

| Supstanca                | Koncentracija gastrina<br>(pmol/L) | Koncentracija<br>interferenta (mg/dL) | Srednja<br>varijacija u % |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Hemoglobin               | 38,8                               | 500                                   | +1,0 %                    |
|                          |                                    | 250                                   |                           |
|                          | 168,0                              | 500                                   |                           |
|                          |                                    | 250                                   |                           |
|                          | Nekonjugovani<br>bilirubin         | 15                                    |                           |
|                          |                                    | 10                                    |                           |
|                          |                                    | 15                                    |                           |
|                          |                                    | 10                                    |                           |
| Konjugovani<br>bilirubin | 38,8                               | 2                                     | -2,1%                     |
|                          |                                    | 0,4                                   |                           |
|                          | 168,0                              | 2                                     |                           |
|                          |                                    | 0,4                                   |                           |
| Trigliceridi             | 49,4                               | 250                                   | +0,7%                     |
|                          |                                    | 50                                    |                           |
|                          | 160,8                              | 250                                   |                           |
|                          |                                    | 50                                    |                           |

## 12 INTERNA KONTROLA KVALITETA

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

### 1. Kontrolni materijal:

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

### 2. Ukupni rezultati

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

### 3. Maksimalno vezivanje (B<sub>0</sub>/TOT)

Izračunati sa svaki test procenat vezivanja radioaktivnosti u nullom kalibratoru:  $B_0/\text{TOT} \times 100$

### 4. Nespecifično vezivanje (NSB/TOT)

Izračunati sa svaki test procenat nespecifičnog vezivanja:  $NSB/\text{TOT} \times 100$

Nespecifično je manje od 5%.

### 5. Nagib kalibracione krive

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

## 13 PREDOSTROŽNOST I UPOZORENJA

### Bezbednost

#### Samo za istraživačku upotrebu. Nije za upotrebu u dijagnostičkim procedurama.

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

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

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

Treba poštovati sledeće mere predostrožnosti kada se rukuje radioaktivnim materijalima:

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

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

## 14 SADRŽAJ PROTOKOLA

|  | Ukupni rezultati | NSB    | Kalibratori (0-6) | Kontrolni materijal | Uzorci |
|--|------------------|--------|-------------------|---------------------|--------|
| <b>Kalibratori</b>   | -                | -      | 100 µL            | -                   | -      |
| <b>Kontrolni materijal</b>   | -                | -      | -                 | 100 µL              | -      |
| <b>Uzorci</b>  | -                | -      | -                 | -                   | 100 µL |
| <b>Razblaživač za testiranje</b>   | -                | 300 µL | -                 | -                   | -      |
| <b>Antiserum</b>   | -                | -      |                   | 200 µL              |        |
| Pomešati u vorteks mikseru i inkubirati 60 minuta na temperaturi od 18 °C - 25 °C      |                  |        |                   |                     |        |
| <b><math>^{125}\text{I}</math> indikator</b>   |                  |        | 200 µL            |                     |        |
| Pomešati u vorteks mikseru i inkubirati 60 minuta na temperaturi od 18 °C - 25 °C      |                  |        |                   |                     |        |
| <b>Dvostruko antitelo PEG</b>  | -                |        |                   | 500 µL              |        |
| Pomešati u vorteks mikseru i inkubirati 30 - 60 minuta na temperaturi od 18 °C - 25 °C |                  |        |                   |                     |        |
| Centrifugirati 15 minuta (1700 g) na 4 °C  |                  |        |                   |                     |        |
| Dekantovati i izračunati radioaktivnost taloga   |                  |        |                   |                     |        |

**15 REFERENCES / LITERATURE / BIBLIOGRAFIJA**

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

**SYMBOLS USED**

| Symbol            | English                                   | Deutsch                           | Italiano                                | Español                                      | Français                                  |
|-------------------|---|-----------------------------------|---|--|---|
|                   | European Conformity                       | CE-Konformitäts-kennzeichnung     | Conformità europea                      | Conformidad europea                          | Conformité normes européennes             |
|                   | Consult instructions for use              | Gebrauchsanweisung beachten       | Consultare le istruzioni per l'uso      | Consulte las instrucciones de uso            | Consulter les instructions d'utilisation  |
|                   | <i>In vitro</i> diagnostic medical device | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum     | Dispositivo medico-diagnóstico in vitro | Producto sanitario para diagnóstico In vitro | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|                   | Catalogue number                          | Katalognummer                     | Numero di Catalogo                      | Número de catálogo                           | Référence de catalogue                    |
|                   | Batch code                                | Chargenbezeichnung                | Codice del lotto                        | Código de lote                               | Numéro de lot                             |
|                   | Contains sufficient for <n> tests         | Ausreichend für <n> Prüfungen     | Contenuto sufficiente per "n" saggi     | Contenido suficiente para <n> ensayos        | Contenu suffisant pour "n" tests          |
|                   | Temperature limit                         | Temperaturgrenzwerte              | Temperatura di conservazione            | Temperatura de conservación                  | Température de conservation               |
|                   | Use-by date                               | Verwendbar bis                    | Utilizzare prima del                    | Estable hasta                                | Utiliser jusque                           |
|                   | Manufacturer                              | Hersteller                        | Fabbricante                             | Fabricante                                   | Fabricant                                 |
|                   | Distributor *                             | Vertriebspartner *                | Distributore                            | Distribuidor                                 | Distributeur                              |
|                   | Date of manufacture                       | Herstellungsdatum                 | Data di produzione                      | Fecha de fabricación                         | Date de production                        |
|                   | Biological risks                          | Biologische Risiken               | Rischi biologici                        | Riesgos biológicos                           | Risques biologiques                       |
|                   | Caution                                   | Achtung                           | Attenzione                              | Precaución                                   | Attention                                 |
|                   | Unique device Identifier                  | eindeutige Produktidentifizierung |   |  |   |
|                   |   |                                   |   |  |   |
|                   | For research use only                     | Nur für Forschungszwecke          | Solo a scopo di ricerca                 | Sólo para uso en investigación               | Seulement dans le cadre de recherches     |
| <b>Content</b>    | Content                                   | Inhalt                            | Contenuto                               | Contenido                                    | Contenu                                   |
| <b>Volume/No.</b> | Volume / No.                              | Volumen/Anzahl                    | Volume/Quantità                         | Volumen/Número                               | Volume/Quantité                           |
|                   |   |                                   |   |  |   |