



# TRYPSIN RIA

*KIPCE07*



# History

---

## Summary of change :

<b>Previous Version :</b>	<b>Current Version :</b>
190719/1	200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <a href="https://www.diasource-diagnostics.com/">https://www.diasource-diagnostics.com/</a> "
No Manufacturer symbol	Manufacturer symbol added
No IVD symbol	IVD symbol added
"LOT"	"Version"
PI number	PI number cleared



# TRYPSIN RIA

en

KIPCE07

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the in vitro quantitative measurement of human trypsin in serum.

## 2. INTRODUCTION

Differential diagnosis in patients presenting with "acute abdomen" is often difficult, particularly when the symptoms are due to pancreatic disease. Some means of assessing pancreatic function in these circumstances is desirable, and tests should also be suitable for monitoring the progress of the condition. In searching for a diagnostic marker, it is necessary to examine the characteristic products of the exocrine pancreas. In practice, these are the various pancreatic enzymes- principally, amylase, lipase and trypsin which are involved in the intestinal digestion of carbohydrates, fats and proteins. Of these enzymes, only trypsin is produced solely by the pancreas and its measurement may thus be considered to provide an ideal basis for a specific test of pancreatic function.

### 2.1 Chemical and biological properties of trypsin

Trypsin is one of the enzymes involved in the digestion of dietary protein in the small bowel. It functions as an endopeptidase with a marked preferential specificity for peptide bonds arising from the carbonyl groups of L-arginyl and L-lysyl residues. Chemically, trypsin is a protein consisting of 201 amino acids with a molecular weight of 22,900.

In common with other proteolytic enzymes of pancreatic origin, trypsin is synthesized and secreted from the acinar cells of the exocrine pancreas as an inactive precursor or proenzyme, trypsinogen. This occurs in two forms, both of which are converted to enzymatically active trypsin by the action of enterokinase produced by cells in the duodenum. This kinase, in the presence of  $Ca^{++}$  ions, removes the hexapeptide Val-(Asp)<sub>4</sub>-Lys from trypsinogen, thereby unmasking the active centre of the trypsin molecule. In addition trypsin itself can activate the trypsinogen by autocatalysis.

Some trypsin appears to be excreted intact from the gut, as it can be detected and measured in stool. In addition, the trypsinogen, trypsin and probably trypsin bound to a pancreatic inhibitor may find their way from the pancreatic cells into the blood via the interstitial fluid. In blood all tryptic activity is blocked by three specific inhibitors ( $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_2$ -macroglobulin and inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor). Nevertheless, normal serum still retains some proteolytic activity as shown by the hydrolysis of synthetic substrates, but this cannot be due solely to trypsin.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

Trypsin can be measured in duodenal or pancreatic juice by spectrophotometric methods, which depend upon its ability to hydrolyse synthetic substrates. However, as the trypsin is inactive and the enzymatic activity of trypsin in serum is blocked by the inhibitors mentioned above, this approach cannot be used to determine blood levels of the enzyme. If the immunological rather than the enzymatic properties of trypsin could be used in a method for its determination in serum, the foregoing problem would not arise.

The Trypsin RIA kit permits radioimmunological determination of the enzyme trypsin in human serum and other biological fluids. The kit utilizes the principle of competitive protein binding analysis, using a double antibody radioimmunoassay method, free trypsin being separated from antibody-bound trypsin by an anti-rabbit precipitating serum.

During the first incubation, serum trypsin and <sup>125</sup>I-labelled trypsin compete for highly specific antibodies against trypsin, with the result that <sup>125</sup>I-labelled trypsin is bound to the antibodies in inverse proportion to the amount of serum trypsin present. During the second incubation the trypsin or <sup>125</sup>I-trypsin antibody complex reacts with an anti-rabbit-gammaglobulin, causing precipitation. The precipitate can be centrifuged down, the supernatant decanted and the iodine-125 activity in the precipitate measured in a gamma scintillation counter. The activity measured is compared with a calibrator curve prepared under the same conditions and provides an indication of the trypsin concentration in the serum.

The reagents supplied in one Trypsin RIA kit are sufficient for preparation of a calibrator curve and measurement of 42 patients' sera, in duplicate. The trypsin control serum included in the kit provides an analytical means of checking the accuracy of the assay procedure performed in the laboratory.

The assay has a range of 0-1,300 ng/mL serum, with greatest precision in the range 80-500 ng/mL. The reagents in the kit are ready for use, except the calibrators and the wash reagent, and should be stored at 2 - 8°C.

The Trypsin RIA radioimmunoassay kit permits measurement of trypsin as a protein in the serum, and is not affected by the presence of serum inhibitors. The radioimmunoassay is specific for trypsin, trypsinogen and the enzyme's inhibited forms.

There is no internationally accepted calibrator for trypsin at present. The Trypsin RIA values cannot be readily compared with the results of other trypsin assays.

#### 4. REAGENT PROVIDED

Ag	125I	1 vial of <sup>125</sup> I-trypsin (human), < 90 kBq, 22 mL buffer with bovine albumin, rabbit IgG, sodium azide and an orange red dye.
ANTISERUM		1 vial of rabbit anti-trypsin antiserum 10.5 mL buffer with bovine albumin and sodium azide.
CAL	N	7 vials of human trypsin calibrators, per 0.5 mL freeze dried horse serum and sodium azide, concentration in the nominal range of 0-1,300 ng trypsin/mL.*
CONTROL	N	1 vial of human trypsin control serum, 0.5 mL human serum and sodium azide, concentration stated.
PREC	AGENT	1 vial of precipitation reagent, 55 mL of buffer, goat anti-rabbit IgG serum, bovine albumin and sodium azide.
WASH	SOLN	1 tube of wash reagent (1 buffer tablet).
CONC		1 instruction for use.

\* The values shown above are the target values. The real values are indicated on the label.

The dissolved reagents contain sodium azide as preservative. Avoid swallowing and contact with the skin or mucous membranes. Sodium azide may react with lead or copper piping to form highly explosive metal azides. During waste disposal, flush the drains thoroughly to prevent a build-up of these products.

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Incubation tubes. Microlitre pipettes with disposable plastic tips (or Dispensettes) 100, 200, and 500 µL. Dispensers 1.0 mL. Measuring cylinders, beaker. Rotary mixer, centrifuge ≥ 1,500 g, gamma scintillation counter.

#### 6. REAGENTS PREPARATION

The kit components, which have been stored at 2 - 8 °C, are brought up to room temperature (RT, 18-25 °C).

##### Calibrators:

Carefully dissolve the calibrators in distilled water, proceeding as follows:

Gently tap the **vials of calibrator** to dislodge any particles which may be adhering to the stopper. Then carefully remove the stoppers, placing them upside down on the work surface. Using a suitable micropipette, dispense precisely 500 µL **distilled water** into each vial, replace the stoppers and allow approximately 10 minutes for the freeze-dried material to **dissolve completely**. Reconstitution and mixing may be accelerated by swirling the contents and/or rolling the vials between the hands.

##### Wash Buffer:

The wash buffer is prepared by dissolving the buffer tablet in 100 mL distilled water.

All the reagents should be stored at 2- 8°C.

On occasions where large numbers of samples are to be assayed, reagents have to be pooled from more than one kit bearing the sample lot number. Only one calibration curve should be employed to interpolate all samples. It is possible to prepare 2 calibration curves with the reagents provided, but a consequently smaller number of serum samples can be measured.

#### 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

After blood sampling, serum is obtained by the usual methods.

It is pipetted off, assayed directly or stored up to 3 days at 2 - 8°C for later use, or alternatively frozen at -20°C.

#### 8. PROCEDURE

1. Number sufficient incubation tubes (3-5 mL), as given in the Table (calibrators, control serum, serum samples and "total activity" tubes).
2. Pipette 100 µL **calibrator, control serum** and **serum samples** into test tubes that have been prepared.
3. Dispense 200 µL <sup>125</sup>I-**trypsin** into each test tube (including "total activity" tubes).
4. Dispense 100 µL **rabbit anti-trypsin serum** into each test tube (excluding "total activity" tubes), mix the contents of the tubes on the rotary mixer, and incubate for 3h (3-5h) at room temperature (18-25 °C) away from direct light
5. Dispense 500 µL **precipitation reagent** into each test tube (excluding "total activity" tubes), mix the contents of the tubes on the rotary mixer, and incubate for **30 min** (30-60 min) at room temperature away from direct light.

6. Dispense 1mL of **wash reagent** into each test tube (excluding "total activity" tubes), centrifuge the tubes at  $\geq 1,500$  g for 15 min at 20 °C and decant the supernatants.
7. Measure the test tubes for 1 minute in a gamma scintillation counter. 40,000 to 20,000 cpm are to be expected as total activity.

### 9. CALCULATION OF RESULTS

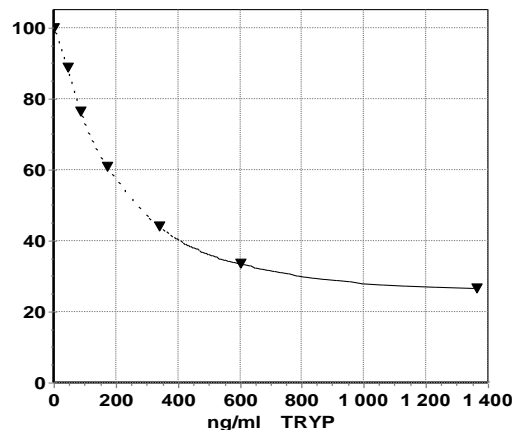
The radioactivity measured in counts per minute (cpm) of the calibrators  $S_0 - S_6$  is plotted against the relevant trypsin concentrations (ng/ml) on prepared graph paper. The "ideal" calibrator curve is constructed through these points. The mean value is calculated from the two measured values of the control serum and patients' sera and the trypsin concentration per millilitre of serum is read off from the calibrator curve.

### 10. TYPICAL DATA

The Figure shows a typical calibrator curve obtained with Trypsin RIA assay.

#### Example of a calibration curve

Tube groups	Mean cpm	B/T x 100	B/Bo x 100	Concentration ng/mL
T	35000			
Calibrator 0	22225	63.5	100	0
Calibrator 1	19713	56.3	88.7	43
Calibrator 2	17002	48.5	76.5	85
Calibrator 3	13535	38.6	60.9	171
Calibrator 4	9779	27.9	44.0	341
Calibrator 5	7445	21.2	33.5	602
Calibrator 6	5929	16.9	26.6	1365
Control	12090	34.5	54.4	220



### 11. CLINICAL RESULTS

#### 11.1. Normal levels

The function of enzymatic inactivated serum trypsin is not known, but trypsin can be detected in the serum as long as the exocrine portion of the pancreas is active.

The serum trypsin concentration of 151 presumed healthy adults has been measured, it ranges from 160 to 600 ng/mL (5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentile respectively) with a median at 315 ng/mL.

#### 11.2. Chronic pancreatitis

The current methods available for the diagnosis of chronic pancreatitis include X-ray visualisation of calcification of the pancreas, determination of changes in amylase, lipase or bicarbonate levels in the duodenal fluid, or changes in the volume of fluid secreted. Some of these diagnostic procedures are very difficult to perform, are unreliable and unpleasant for the patient. The radioimmunoassay is therefore of great importance.

It has been shown that the serum trypsin levels of patients with chronic pancreatitis are lower than 140 ng trypsin/ml in 50 % of cases, which is probably a result of extensive destruction of the acinar cells of the pancreas.

On the other hand, in 20 % of patients with chronic pancreatitis, the serum trypsin level exceeds the normal upper limit of 400 ng/mL. This probably indicates an acute phase of the disease (see 11.3).

The severity of abdominal pain does not appear to correlate with trypsin serum levels, but steatorrhoea is frequently accompanied by a marked fall in serum trypsin.

In patients with chronic pancreatitis but "normal" trypsin basal levels, the serum trypsin increases markedly 20-120 minutes after stimulation with secretin followed by pancreozymin. This appears to be the result of increased permeability of the inflamed pancreatic tissue, since no such rise in serum trypsin is found in healthy patients undergoing the same test.

### 11.3. Acute pancreatitis

Patients with acute pancreatitis invariably have significantly increased serum trypsin concentration. The levels range between 600 and 6,500 ng trypsin/mL serum.

### 11.4. Carcinoma of pancreas

Patients with carcinoma of the pancreas may have moderately elevated serum trypsin levels (450-1,200 ng/mL) but generally there is no difference. If pancreatitis and/or renal insufficiency are excluded, other diagnostic procedures must be undertaken to confirm the diagnosis of carcinoma.

### 11.5. Cystic fibrosis of the pancreas

It is possible to use the radioimmunoassay of trypsin to diagnose cystic fibrosis of the pancreas.

#### Note:

It appears that the exocrine portion of the pancreas does not function as a unit after stimulation, as amylase, lipase and serum trypsin do not always correlate as expected. There may therefore be further possibilities for differential diagnosis. Normal serum trypsin concentrations (range 160-600 ng/mL) do not exclude the possibility of pancreatic impairment. High serum trypsin levels have also been found in renal insufficiency and the renal status of patients should therefore also be checked when interpreting trypsin levels. Bearing in mind the above limitation, trypsin levels below 160 ng/mL and above 600 ng/mL can be regarded as the lower and upper cut-off points of normality respectively when screening patients with abdominal symptoms.

## 12. PERFORMANCES AND LIMITATIONS

### 12.1. Imprecision

This was evaluated with 2 samples assayed 10 times in the same series and in 15 different series.

Within-run			Between-run		
Samples	Mean (ng/mL)	CV (%)	Samples	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	550	2.8	3	162	4.9
2	167	3.3	4	483	6.7

### 12.2. Detection limit

The detection limit is defined as being the smallest concentration different from 0 with a confidence interval of 95 %. It has been determined as being 8.0 ng/mL.

## 13. INTERFERENCE

The presence of bilirubin at concentrations of up to 250 mg/L, hemoglobin up to 10 g/L and triglycerides up to 20 g/L have no effect on the assay results. The immuno-assay is protected against heterophilic antibodies. However, we cannot guarantee that this protection is exhaustive.

## 14. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## 15. BIBLIOGRAPHY

1. Adrian TE, Bestermann HS, Mallinson CN, Galarotis C, Bloom SR. Clin Sci Mol Med. 1978;54:24.
2. Bray PT, Clark GCF, Moody GJ, Thomas JDR. Clin Chim. 1977;80:333.
3. Crossley JR, Smith PA, Elliott RB. Lancet. March 3. 1979;472.
4. Elias E, Redshaw M, Wood T. Lancet II. 1977;66.
5. Fedail SS, Salmon PR, Harvey RF, Brown PB, Read AE. Abstract. 1978;19:A445.
6. Goldberg JM. Clin Chem. 1976;22:638.
7. Lesser PB, Marshaw AL. Gastroenterology. 1975;68:630.
8. Nagasawa S, Han BH, Sugihari H, Suzuki T. J Biochem. 1970;67:821.
9. Temler RS, Felber JP. Biochim Biophys. 1976;445:720.

## 16. SUMMARY OF THE PROTOCOL

### Trypsin RIA assay:

Labelling of the test tubes	Calibrators (µL)							Control serum (µL)	Sera (µL)				Total activity (µL)
	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	C	1	2	3	etc.	T
Calibrators S <sub>0</sub>	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100						
CAL <sub>1</sub>													
CAL <sub>2</sub>													
CAL <sub>3</sub>													
CAL <sub>4</sub>													
CAL <sub>5</sub>													
CAL <sub>6</sub>													
Control serum								100/100					
Sera									100	100	100	etc.	
<sup>125</sup> I-trypsin	←-----200 µL -----→												
Anti-trypsin serum	←-----100 µL-----→												
	Mix ; incubate 3 h at 18-25 °C												
Precipitation reagent	←-----500 µL -----→												
	Mix ; incubate for 30 minutes at 18-25 °C												
Wash reagent	←-----1 mL -----→												
	Centrifuge for 15 min at ≥ 1,500 g, 20 °C, decant the supernatant												
	Measure the precipitate												
	Measure the solution												

Revision date : 2020-02-24

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





# TRYPsin RIA

DE

KIPCE07

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunoassay für die *in vitro* quantitative Messung von humanem Trypsin im Serum.

## 2. EINFÜHRUNG

Eine Differentialdiagnose von Patienten mit akutem Bauchsyndrom ist oftmals schwierig, und zwar besonders dann, wenn es sich um die Symptome von Pankreaserkrankungen handelt. Analytische Mittel zur Erfassung von Pankreasfunktionen und deren « follow-up » sind deshalb diagnostisch von großem Interesse. Besonders wichtig sind hier die an der intestinalen Verdauung der Kohlenhydrate, Fette und Proteine beteiligten Enzyme des exokrinen Pankreas wie Amylase, Lipase und Trypsin. Von diesen Enzymen wird jedoch nur das Trypsin ausschließlich im Pankreas gebildet, so daß man mit der Erfassung dieses Enzyms eine spezifischen Test für das exokrine Pankreas in der Hand hat.

### 2.1 Chemische und biologische Daten des Trypsins

Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, eine sogenannte Endopeptidase mit einer Spezifität gegen Carboxylbindungen von L-Arginyl- und L-Lysylgruppierungen. Es ist an der Verdauung der Proteine im Darm beteiligt. Chemisch ist das Enzym Trypsin ein Protein, das sich aus 201 Aminosäuren zusammensetzt und ein Molekulargewicht von 22.900 hat.

Wie andere proteolytische Enzyme pankreatischen Ursprungs wird das Trypsin in den Azinarzellen des exokrinen Pankreas als inaktives Proenzym, das Trypsinogen, gebildet und über den Pankreasgang in das Duodenum sezerniert. Trypsinogen existiert in zwei Formen, die beide mittels Enterokinase, ein Enzym, das in den Zellen des Duodenums gebildet wird, in das enzymatisch aktive Trypsin gespalten werden. Die Enterokinase trennt in Gegenwart von  $Ca^{++}$ -Ionen das Hexapeptid Val-(Asp)<sub>4</sub>-Lys aus dem Trypsinogen und setzt damit das bisher maskierte biologisch aktive Zentrum des Trypsinmoleküls frei. Zusätzlich kann das Trypsin selbst durch Autokatalyse das Trypsinogen aktivieren.

Trypsin scheint zu geringem Teil vom Darm intakt ausgeschieden zu werden, wie durch Messung im Stuhl bewiesen werden konnte. Außerdem können die Trypsinogene, das Trypsin und wahrscheinlich auch das an pankreatischen Inhibitor gebundene Trypsin via interstitieller Flüssigkeit an das Blut abgegeben werden. Im Blut ist jedoch jede tryptische Aktivität durch drei spezifische Inhibitoren ( $\alpha_1$ -Anti-Trypsin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor) blockiert.

Trotzdem verbleibt eine geringe proteolytische Aktivität im Serum, wie durch Hydrolyse synthetischer Substrate gezeigt werden kann; sie ist nicht auf Trypsin zurückzuführen.

## 3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Trypsin kann im Duodenal- und Pankreassaft spektrophotometrisch mittels Hydrolyse synthetischer Substrate bestimmt werden. Da die Trypsinogene biologisch inaktiv sind und die enzymatische Aktivität von Trypsin durch Inhibitoren – wie schon oben erwähnt – blockiert ist, kann diese Methode zur Bestimmung des Trypsins im Blut jedoch nicht angewendet werden.

Wenn man dagegen die immunologischen Eigenschaften des Trypsinmoleküls statt der enzymatischen für eine Bestimmung nutzt, stellt sich das erwähnte Problem nicht.

Mit den DIAsource Trypsin RIA kann das Trypsin in Humansera und anderen biologischen Flüssigkeiten radioimmunologisch bestimmt werden. Das Besteck ist auf dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse aufgebaut, methodisch handelt es sich um einen Doppelantikörper-Radioimmunoassay, der mit Hilfe eines Anti-IgG-Antikörpers das freie von dem an spezifische Antikörper gebundenen Trypsin trennt.

Bei der ersten Inkubation reagieren Serumtrypsin und Iod-125-markiertes Trypsin mit hochspezifischen, gegen Trypsin gerichteten Antikörpern wobei Iod-125-markiertes Trypsin umgekehrt proportional zu der vorhandenen Menge Serumtrypsin an den Antikörpern gebunden ist.

Bei der zweiten Inkubation reagiert der Trypsin-bzw. <sup>125</sup>I-Trypsin-Antikörper-Komplex mit einem Anti-Kaninchen-Gammaglobulin. Dabei kommt es zur Bildung eines Präzipitates, das abzentrifugiert werden kann. Der Überstand wird dekantiert und die im Niederschlag vorhandene Iod-125-Aktivität im Gammazintillationszähler gemessen. Die Aktivität wird als Maß für

die im Serum vorhandene Trypsinkonzentration durch Vergleich mit unter den selben Bedingungen angesetzten Kalibratoren gewertet.

Die in dem Besteck DIASource Trypsin RIA vorhandenen Reagenzien erlauben bei Ausführung von Doppelbestimmungen unter Erstellung einer Kalibratorkurve die Messung von 42 Patientensera. Das beigefügte Trypsin-Kontrollserum ist für die analytische Kontrolle des Assays bestimmt.

Der Assay umfaßt den Bereich von 0-1300 ng Trypsin/mL Serum; seine höchste Präzision liegt zwischen 80 und 500 ng/mL.

Die Reagenzien des Bestecks sind bis auf die Kalibratoren und das Waschreagenz gebrauchsfertig, eine Lagerungstemperatur von +2/+8°C wird empfohlen.

Der DIASource Trypsin-Radioimmunoassay mißt das Trypsin im Serum als Protein, vorhandene Inhibitoren stören den Assay nicht. Sowohl das Trypsin, die Trypsinogene als auch die enzyminhibierten Formen werden erfaßt.

Ein international anerkannter Referenzkalibrator für Trypsin existiert derzeit nicht. Ein Vergleich der RIA-gnost® Trypsin-Werte mit den Ergebnissen anderer Trypsinassays ist nicht ohne weiteres möglich.

#### 4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Ag	125I	1 Flasche 125 I-hTrypsin Antikörper (human), < 90 kBq, 22 mL, Puffer, Kaninchen Anti-IgG serum, Rinderalbumin und Natriumazid, Farbe rot.
ANTISERUM		1 Flasche Kaninchen Anti-Trypsin-Antiserum, 10,5 mL, Puffer, Rinderalbumin und Natriumazid.
CAL	N	7 Flaschen hTrypsin-Kalibratoren, je 0,5 mL lyophilisiertes Pferdeserum und Natriumazid, Trypsinkonzentration im Bereich von nominell 0-1300 ng hTrypsin/mL*.
CONTROL	N	1 Flasche hTrypsin-Kontrollserum, 0,5 mL Humanserum und Natriumazid, Konzentration deklariert.
PREC	AGENT	1 Flasche Fällungsreagenz, 55 mL, Puffer, Anti-Kaninchen IgG-Serum, Rinderalbumin und Natriumazid.
WASH	SOLN	1 Röhrchen Waschreagenz (1 Puffertablette).
CONC		1 instruction for use.

\* Die oben angegebenen Werte sind die Zielwerte. Die aktuellen Werte werden auf dem Etikett angegeben.

Die gelösten Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Verschlucken, Berührung mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden! Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Beseitigung sollte mit großen Wassermengen nachgespült werden, um diese Bildung zu verhindern.

#### 5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Inkubationsröhrchen. Mikroliterpipetten mit austauschbarer Kunststoffspitze (oder Dispensetten) 100, 200 und 500 µL. Dispenser 1,0 mL. Meßzylinder, Becherglas. Mischrotor, Zentrifuge ≥ 1500 g, Gammazähler.

#### 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Vor Gebrauch die bei +2/+8°C gelagerten Besteckkomponenten auf Raumtemperatur (RT, 18-25°C) bringen.

##### Kalibrator:

Die Kalibratoren werden wie folgt in destilliertem Wasser gelöst:

Die **Kalibrator-Flaschen** werden kurz aufgestoßen, um eventuell am Stopfen haftende Partikel abzulösen. Dann erst werden die Gummistopfen vorsichtig entfernt und umgekehrt auf die Arbeitsplatte gelegt. Nach Zugabe von genau **500 µL destilliertem Wasser** (geeignete Mikropipette) setzt man die entsprechenden Stopfen wieder auf und wartet bis zum **vollständigen Lösen** der Lyophilisate (ca. 10 min). Durch kreisende Bewegung und/oder Rollen der Flaschen zwischen den Händen wird der Lösungsvorgang unterstützt und die erhaltene Lösung gemischt.

##### Waschpuffers:

Zur Herstellung des Waschpuffers die Puffertabletten in 100 mL dest. Wasser lösen.

Alle Reagenzien bei +2/+8°C aufbewahren.

Reagenzien der selben Charge aus mehr als einem Besteck müssen gepoolt werden, um einen größeren Assay auszuführen. Alle zu messenden Serumproben werden dann auf eine Kalibratorkurve bezogen. Die Erstellung von zwei Kalibratorkurven mit einer entsprechend geringeren Anzahl Serumproben ist möglich.

## 7. PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG

Aus dem entnommenen Blut wird nach den üblichen Verfahren Serum gewonnen.

Das Serum wird abpipettiert, direkt in den Assay eingesetzt oder zur späteren Verwendung bei +2/+8°C bis zu 3 Tage aufbewahrt oder bei –20°C eingefroren.

## 8. DURCHFÜHRUNG

1. Eine genügende Anzahl von Inkubationsröhrchen (3-5 mL) wird, wie in der Tabelle angegeben, numeriert (Kalibratoren, Kontrollserum, Serumproben und Gesamtaktivität).
2. 100 µL **Kalibrator**, **Kontrollserum** und **Serumproben** in die dafür vorbereiteten Röhrchen pipettieren.
3. 200 µL <sup>125</sup>I-hTrypsin in jedes Röhrchen (einschließlich Gesamtaktivität) dispensieren.
4. 100 µL **Kaninchen Anti-hTrypsin-Serum** in jedes Röhrchen (ausschließlich Gesamtaktivität) dispensieren, die Röhrchen auf dem Mischrotor mixen, danach 3 h (3-5 h) bei RT (18-25°C) geschützt vor direktem Licht inkubieren.
5. 500 µL **Fällungsreagenz** in jedes Röhrchen (ausschließlich Gesamtaktivität) dispensieren, die Röhrchen auf dem Mischrotor mixen, **30 min** (30-60 min) bei RT geschützt vor direktem Licht inkubieren.
6. 1 mL **Waschreagenz** in jedes Röhrchen (ausschließlich Gesamtaktivität) dispensieren, die Röhrchen 15 min bei 20°C mit 1500 g zentrifugieren und die Überstände dekantieren.
7. Die Röhrchen im Gammazähler 1 min messen. Als Gesamtaktivität sind 40.000 bis 20.000 lpm zu erwarten.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die Impulse pro Minute der Kalibratoren S<sub>0</sub>-S<sub>6</sub> werden als % der Gesamtaktivität gegen die zugehörige Trypsin-Konzentration (ng/mL) in ein entsprechend vorbereitetes Millimeterpapier eingetragen. Durch diese Punkte wird die « ideale » Kalibratorkurve gezeichnet.

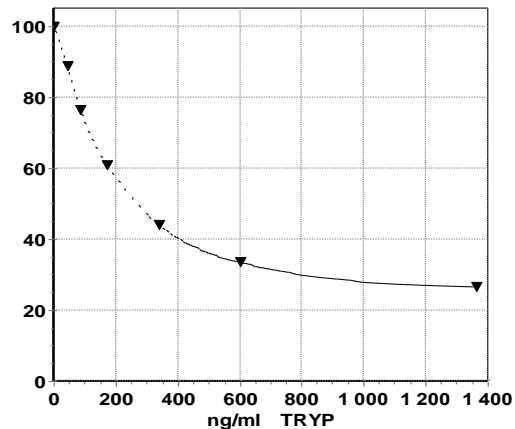
Aus den beiden Meßwerten des Kontrollserums und der Patientensera werden die Mittelwerte gebildet und hierfür aus der Kalibratorkurve die gesuchte Trypsinkonzentration pro Milliliter Serum abgelesen.

## 10. TYPISCHE WERTE

Eine typische Kalibratorkurve, gemessen mit DIAsource Trypsin RIA ist in der Abbildung dargestellt.

### Beispiel einer Kalibratorkurve

Röhrchen- gruppen	cpm im Mittel	B/T x 100	B/Bo x 100	Konzentration ng/mL
T	35000			
Kalibrator 0	22225	63.5	100	0
Kalibrator 1	19713	56.3	88.7	43
Kalibrator 2	17002	48.5	76.5	85
Kalibrator 3	13535	38.6	60.9	171
Kalibrator 4	9779	27.9	44.0	341
Kalibrator 5	7445	21.2	33.5	602
Kalibrator 6	5929	16.9	26.6	1365
Kontrolle	12090	34.5	54.4	220



## **11. KLINISCHE ERGEBNISSE**

### **11.1. Normalwerte**

Die Funktion des enzymatisch inaktivierten Serumtrypsins ist nicht bekannt. Jedoch läßt sich Trypsin in Serum nachweisen, solange das exokrine Pankreas Aktivität aufweist.

Die Trypsinkonzentration im Serum wurde bei 151 offensichtlich gesunden Erwachsenen gemessen. Die Werte lagen zwischen 160 und 600 ng/ml (5. bzw. 95. Perzentil) mit einem Medianwert von 315 ng/ml.

### **11.2. Chronische Pankreatitis**

Bei chronischer Pankreatitis können mit den heute möglichen diagnostischen Methoden Veränderungen des Duodenalsaftes in der Konzentration von Trypsin, Amylase, Lipase und des Bicarbonats bzw. seines Volumens erfaßt oder auch eine Verkalkung des Pankreas durch Röntgenaufnahmen sichtbar gemacht werden. Diese diagnostischen Verfahren sind teilweise recht schwierig auszuführen, unzuverlässig und für den Patienten unangenehm. Es kommt deshalb der radioimmunologischen Bestimmung eine große Bedeutung zu.

Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis sind die Trypsinkonzentrationen des Serums in 50 % aller Fälle kleiner als 140 ng Trypsin/mL, was wahrscheinlich auf eine beträchtliche Zerstörung der Azinarzellen des Pankreas zurückzuführen ist.

In 20 % der Fälle mit chronischen Pankreatitiden liegen dagegen die Trypsinkonzentrationen des Serums oberhalb der Norm-Grenzwerte von 400 ng/mL, was wahrscheinlich eine akute Phase der Pankreatitis (s. 2.3) demonstriert.

Die Heftigkeit abdominaler Schmerzen korreliert nicht mit dem Trypsin-Serumspiegel, jedoch ist eine Statorrhoe häufig mit einer bemerkenswerten Verminderung der Trypsinkonzentration des Serums verknüpft.

Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis, aber « normalen » Trypsin-Basalwerten steigt im Stimulationstest mit Sekretin und folgend Pankreozymin zwischen 20 und 120 Minuten p. a. die Trypsinkonzentration des Serums bemerkenswert an. Eine zunehmende Permeabilität des entzündeten Pankreasgewebes scheint für den Verlauf des Trypsin-Serumspiegels hier verantwortlich, da gesunde Patienten im gleichen Stimulationstest keinen Anstieg aufweisen.

### **11.3. Akute Pankreatitis**

Patienten mit akuter Pankreatitis haben immer eine signifikant erhöhte Trypsinkonzentration des Serums. Die Werte liegen zwischen 600 und 6.500 ng Trypsin/mL.

### **11.4. Pankreaskarzinom**

Bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom wurden mäßig erhöhte Trypsin-Serumspiegel (450-1.200 ng/mL) gefunden, aber im allgemeinen besteht diese Differenz nicht. Bei Ausschluß von Pankreatitis und/oder Niereninsuffizienz sind daher weitere diagnostische Untersuchungen erforderlich.

### **11.5. Zystische Pankreasfibrose**

Es besteht die Möglichkeit, die radioimmunologische Bestimmung des Trypsins zur Erkennung zystischer Pankreasfibrose einzusetzen, weitere Informationen dazu s. DIASource Trypsin RIA neonatal.

#### **Bemerkung:**

Es scheint offensichtlich, daß der exokrine Teil des Pankreas nach Stimulation nicht als Einheit funktioniert, da Amylase-, Lipase- und Trypsin-Serumspiegel nicht immer wie erwartet korrelieren. So bieten sich möglicherweise hier Ansätze zur weiteren Differentialdiagnose.

Normale Trypsinkonzentrationen in Serum (range 160-600 ng/mL) schließen die Möglichkeit einer Pankreaserkrankung nicht aus. Bei Niereninsuffizienz sind erhöhte Trypsin-Serumspiegel berichtet worden, deshalb sollte bei der Interpretation von Trypsinwerten der Nierenstatus des Patienten immer berücksichtigt werden.

Unter oben erwähnter Limitierung können bei einem Diagnose-Screening von Patienten mit abdominalen Symptomen Trypsinwerte unter 160 ng/mL und über 600 ng/mL als cut-off-Werte für die untere und obere Grenze der « Normalität » gewertet werden.

## 12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### 12.1. Präzision

Sie wurde mit Hilfe von 2 Proben 10-mal in der selben Serie und in 15 verschiedenen Serien ermittelt.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Proben	Mittelwert (ng/mL)	CV (%)	Proben	Mittelwert (ng/mL)	CV (%)
1	550	2,8	3	162	4,9
2	167	3,3	4	483	6,7

### 12.2. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist definiert als die kleinste, von 0 abweichende Konzentration mit einem Vertrauensfaktor von 95 %. Wert : 8,0 ng/mL.

## 13. INTERFERENZEN

Das Vorhandensein von Bilirubin in Konzentrationen bis zu 250 mg/L, von Hämoglobin bis zu 10 g/L und Triglyceriden bis zu 20 g/L haben keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Verabreichung. Die Immunisierung ist gegen heterophile Antikörper geschützt, jedoch kann keine Garantie für vollständigen Schutz gegeben werden.

## 14. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abfließrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriffe den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

## 15. BIBLIOGRAPHY

1. Adrian TE, Bestermann HS, Mallinson CN, Galarotis C, Bloom SR. Clin Sci Mol Med. 1978;54:24.
2. Bray PT, Clark GCF, Moody GJ, Thomas JDR. Clin Chim. 1977;80:333.
3. Crossley JR, Smith PA, Elliott RB. Lancet. March 3. 1979;472.
4. Elias E, Redshaw M, Wood T. Lancet II. 1977;66.
5. Fedail SS, Salmon PR, Harvey RF, Brown PB, Read AE. Abstract. 1978;19:A445.
6. Goldberg JM. Clin Chem. 1976;22:638.
7. Lesser PB, Marshaw AL. Gastroenterology. 1975;68:630.
8. Nagasawa S, Han BH, Sugihari H, Suzuki T. J Biochem. 1970;67:821.
9. Temler RS, Felber JP. Biochim Biophys. 1976;445:720.

## 16. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

### Trypsin RIA assay:

Beschriftung der Teströhrchen	Kalibratoren µL						Kontroll Serum µL	Sera µL				Gesamt- aktivität µL	
	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	C	1	2	3	etc.	T
Kalibratoren CAL <sub>0</sub> CAL <sub>1</sub> CAL <sub>2</sub> CAL <sub>3</sub> CAL <sub>4</sub> CAL <sub>5</sub> CAL <sub>6</sub>	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100						
Kontrollserum								100/100					
Sera									100	100	100	etc.	
<sup>125</sup> I-Trypsin	←-----200 µL -----→												
Anti-hTrypsinserum	←-----100 µL -----→												
	Mischen ; inkubieren 3 h bei 18-25 °C												
Fällungsreagenz	←-----500 µL -----→												
	Mischen ; inkubieren 30 min bei 18-25 °C												
Waschreagenz	←-----1 mL -----→												
	Zentrifugieren 15 min bei 1 500 g, 20 °C, dekantieren des Überstandes												
	Messen des Niederschlages											Messen der Lösung	

Revision date : 2020-02-24



# TRYP SIN RIA

es

KIPCE07

USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1. INSTRUCCIONES DE USO

Equipo para la determinación radioinmunológica de la tripsina humana.

## 2. INTRODUCCIÓN

Suele ser difícil establecer un diagnóstico diferencial en los pacientes que presentan un síndrome abdominal, especialmente cuando se trata de afecciones pancreáticas. Los medios analíticos que permiten examinar las funciones pancreáticas y los controles posteriores a estos últimos son de gran interés desde el punto de vista diagnóstico. Los enzimas del páncreas exocrino, como la amilasa, la lipasa y la tripsina, que participan en la digestión intestinal de los hidratos de carbono, de las grasas y las proteínas, revisten en este caso una gran importancia. Sin embargo, de estos enzimas, sólo la tripsina se segrega únicamente en el páncreas. Así pues, la detección de este enzima constituye un test específico en lo relativo al páncreas exocrino.

### 2.1 Datos químicos y biológicos de la tripsina

La tripsina es un enzima proteolítico, una endopeptidasa específica para las uniones carboxílicas de los grupos L-arginilo y L-lisilo. Participa en la digestión de las proteínas en el intestino. Desde un punto de vista químico, la tripsina es una proteína compuesta por 201 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 22.900 D.

Al igual que otros enzimas proteolíticos de origen pancreático, la tripsina se segrega en las células acinares del páncreas exocrino en forma de tripsinógeno, proenzima inactivo, y se vierte en el duodeno pasando por el canal pancreático. El tripsinógeno existe en dos formas que se convierten en tripsina enzimáticamente activa por la acción de la enteroquinasa, un enzima formado en las células del duodeno. La enteroquinasa separa del tripsinógeno el hexapéptido Val-(Asp)<sup>4</sup>-Lys en presencia de iones de Ca<sup>++</sup>, liberando así el centro biológicamente activo de la molécula de tripsina que esconde. La tripsina también puede activar el tripsinógeno por autocatálisis.

Una pequeña parte de la tripsina parece eliminarse por el intestino, como han puesto de manifiesto pruebas coprológicas. Además, los tripsinógenos, la tripsina y, probablemente, también la tripsina unida a un inhibidor pancreático, pueden pasar a la sangre a través del líquido intersticial. Sin embargo, tres inhibidores específicos bloquean la actividad tripsina en sangre:  $\alpha$ 1 -anti-tripsina,  $\alpha$ 2 -macroglobulina y el inhibidor inter- $\alpha$ -tripsina. No obstante, se mantiene una leve actividad proteolítica en suero, como indica la hidrólisis de sustrato sintético. Esta actividad no es imputable a la tripsina.

## 3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Puede determinarse la cantidad de tripsina existente en el jugo duodenal y pancreático por espectrofotometría mediante la hidrólisis de sustrato sintético. Sin embargo, no puede utilizarse este método para determinar la tripsina en sangre, puesto que los tripsinógenos son biológicamente inactivos y que la actividad enzimática de la tripsina queda bloqueada por los inhibidores, como se ha indicado antes.

Este problema se evita utilizando las propiedades inmunológicas de la molécula de tripsina en lugar de sus propiedades enzimáticas para efectuar la determinación.

El equipo Trypsin RIA permite la determinación radioinmunológica del enzima tripsina en suero humano y en otros líquidos biológicos según el principio del análisis por competición. Se trata de una determinación radioinmunológica con doble anticuerpo. La tripsina libre se separa de la unida a anticuerpos específicos con un anticuerpo anti-IgG.

Durante la primera incubación, la tripsina sérica y el trazador para tripsina marcado radioactivamente con <sup>125</sup>I se unen a anticuerpos altamente específicos para tripsina. El grado de unión del trazador tripsina <sup>125</sup>I a los anticuerpos es inversamente proporcional a la tripsina sérica presente.

Con la segunda incubación, el complejo tripsina y tripsina <sup>125</sup>I con el anticuerpo entra en reacción con una gammaglobulina anti-conejo. Se forma un precipitado. Después del centrifugado, el sobrenadante debe decantarse y determinarse la actividad del trazador marcado con yodo <sup>125</sup>I presente en el precipitado con un contador de centelleo gamma. La actividad que sirve para determinar la concentración sérica de tripsina se evalúa por comparación con calibradores preparados en las mismas condiciones.

Cada equipo Trypsin RIA contiene la cantidad de reactivos suficiente para la preparación de una curva calibrador y analizar 42 muestras de pacientes por duplicado. El suero de control incluido en el equipo sirve para realizar el control analítico del ensayo.

El intervalo de medida abarca de 0 a 1.300 ng/mL de suero, con un máximo de precisión de entre 80 y 500 ng/mL. Con la excepción de los calibradores y del reactivo de lavado, los reactivos del equipo están listos para su uso.

Deben conservarse entre + 2° C y + 8° C.

El equipo inmunoradiométrico Trypsin RIA permite la determinación cuantitativa de la tripsina sérica como proteína. Así pues, los inhibidores presentes no interfieren en el ensayo. Se detecta tanto la tripsina como los tripsinógenos y las formas inhibidas por enzimas.

No existe por el momento ningún calibrador de referencia reconocido a escala internacional para la tripsina. Así pues, sólo es posible comparar los resultados obtenidos a partir de Trypsin RIA con los de otras pruebas para tripsina de forma aproximada.

#### 4. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Ag	125I	1 vial de <b>tripsina humana</b> <sup>125</sup> I, < 90 kBq, que contiene 22 mL de tampón, albúmina bovina, inmunoglobulina de conejo, azida sódica y un colorante rojo anaranjado.
ANTISERUM		1 vial de <b>suero</b> de conejo <b>anti-tripsina</b> , que contiene 10,5 mL de tampón, albúmina bovina y azida sódica.
CAL	N	7 viales de <b>calibrador</b> de tripsina liofilizado, cada uno contiene 0,5 mL de suero de caballo y azida sódica, la concentración de tripsina humana oscila entre 0 y 1.300 ng/mL*.
CONTROL	N	1 vial de <b>suero de control</b> de tripsina, que contiene 0,5 mL de suero humano y azida sódica, la concentración se indica en la etiqueta.
PREC	AGENT	1 vial de <b>reactivo precipitante</b> , que contiene 55 mL de tampón, suero de cabra anti-IgG de conejo, albúmina bovina y azida sódica.
WASH	SOLN	1 tubo de <b>reactivo de lavado</b> (1 comprimido).
		1 instrucciones de empleo.

\* Los valores indicados son los valores objetivo. Los valores reales se indican en la etiqueta.

Algunos reactivos contienen azida sódica como conservante. Evite inspirar cualquier reactivo así como todo contacto con la piel o las mucosas. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y de cobre y formar nitruros altamente explosivos. Al desechar los residuos, vierta agua abundante en el desagüe.

#### 5. MATERIAL NO SUMINISTRADO

Tubos de ensayo. Micropipetas con punta de plástico intercambiable (o microdispensadores) de 100, 200 y 500 µL. Dispensador de 1,0 mL. Probeta graduada, vaso de precipitado. Agitador, centrifugadora ≥ 1 500 g, contador de centelleo gamma ajustado para la determinación del yodo <sup>125</sup>I.

#### 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antes de uso, lleve a temperatura ambiente (de + 18° C a + 25° C) los componentes del equipo conservados entre + 2° C y + 8° C.

##### Calibradores:

Despegue las partículas de liofilizado que podrían adherirse al tapón golpeando los **viales** de calibradores sobre una superficie dura. Abra los viales con cuidado y deje los tapones boca arriba sobre la mesa de laboratorio. Reconstituya con exactamente **500 µL de agua destilada** (con una micropipeta adecuada), tape los viales y espere a que los liofilizados se reconstituyan por completo (10 min. aproximadamente). Para ayudar a disolver y homogeneizar la solución, dé al vial un movimiento circular y/o hágalo rodar entre las manos.

Para preparar el tampón de lavado, disuelva el comprimido de tampón en 100 mL de agua destilada..

Conserve todos los reactivos entre + 2° C y + 8° C.

Para realizar una prueba con mayor número de muestras, debe mezclar reactivos procedentes de varios estuches de un mismo lote. Una única curva calibrador bastará para todas las muestras de un ensayo. Generalmente es posible establecer dos curvas calibrador con un número inferior de muestras de suero.

##### Tampón de lavado:

Para preparar el tampón de lavado, disuelva el comprimido de tampón en 100 mL de agua destilada..

Conserve todos los reactivos entre + 2° C y + 8° C.

Para realizar una prueba con mayor número de muestras, debe mezclar reactivos procedentes de varios estuches de un mismo lote. Una única curva calibrador bastará para todas las muestras de un ensayo. Generalmente es posible establecer dos curvas calibrador con un número inferior de muestras de suero.



## 7. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Prepare el suero siguiendo el procedimiento habitual a partir de la extracción sanguínea.

Aspire Separe el suero y utilícelo de inmediato, en caso contrario, consérvelo a una temperatura de entre + 2° C y + 8 ° C durante 3 días como máximo, o congélelo a -20° C.

## 8. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO (véase tabla)

- 1 Se recomienda efectuar los ensayos por duplicado para los calibradores, el control y las muestras.
- 2 Numere una cantidad suficiente de tubos de ensayo (de 3 a 5 mL) como se indica en la tabla (calibradores, suero de control, muestras de suero y actividad total).
- 3 Pipetee 100 µL de **calibradores**, de **suero control** o de **muestras de suero** en el fondo de los tubos de ensayo preparados a tal efecto.
- 4 Pipetee 200 µL de **tripsina** <sup>125</sup>I en todos los tubos (incluidos los de actividad total).
- 5 Pipetee 100 µL de suero de conejo anti-tripsina en cada tubo (excepto en los de actividad total), agite para homogeneizar e incube durante 3 h (de 3 a 5 h) a temperatura ambiente (de 18° C a 25° C) protegiéndolo de la luz directa.
- 6 Pipetee 500 µL de reactivo precipitante en cada tubo (excepto en los de actividad total), agite para homogeneizar e incube durante 30 min. (de 30 a 60 min.) a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz directa.
- 7 Pipetee 1 mL de reactivo de lavado en cada tubo (excepto en los de actividad total), centrifugue durante 15 min. a  $\geq 1\,500$  g y a 20° C, a continuación decante el sobrenadante.
- 8 Mida la radioactividad de los tubos durante 1 minuto con un contador de centelleo gamma. Los tubos de actividad total dan en general entre 40.000 y 20.000 c.p.m.

## 9. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Compute los recuentos medios de cada grupo de tubos. Calcule los valores B/Bo. Trace la curva de calibración representando los valores B/Bo de los calibradores frente a las concentraciones. Lea los valores de las muestras directamente en la curva de calibración.

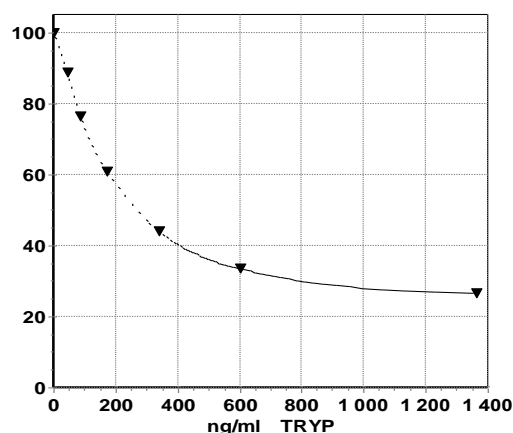
Para la curva de calibración se recomienda el modelo matemático de ajuste hiperbólico. Otras funciones de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente distintos.

## 10. EJEMPLO DE RESULTADOS

La figura muestra una curva de calibración típica obtenida con el ensayo de tripsin RIA.

### Ejemplo de curva calibrador

Grupos de tubos	Medias de cpm	B/T x 100	B/Bo x 100	Concentración ng/mL
T	35000			
CAL 0	22225	63.5	100	0
CAL 1	19713	56.3	88.7	43
CAL 2	17002	48.5	76.5	85
CAL 3	13535	38.6	60.9	171
CAL 4	9779	27.9	44.0	341
CAL 5	7445	21.2	33.5	602
CAL 6	5929	16.9	26.6	1365
Contrôle	12090	34.5	54.4	220



## 11. RESULTADOS CLÍNICOS

### 11.1. Valores normales

Se desconoce la función de la tripsina sérica inactivada enzimáticamente, pero puede detectarse tripsina en suero mientras el páncreas exocrino está activo.

La concentración de tripsina sérica medida en 151 adultos supuestamente sanos osciló entre 160 y 600 ng/ml (percentiles 5 y 95, respectivamente) con una mediana de 315 ng/ml.

### 11.2. Pancreatitis crónica

En las pancreatitis crónicas, los métodos diagnósticos de los que disponemos hoy en día permiten observar variaciones en la concentración de tripsina, de amilasa, de lipasa, de bicarbonato en el jugo duodenal o en el volumen del mismo. Además, puede detectarse la calcificación del páncreas por radiografía. Las pruebas diagnósticas son bastante difíciles de practicar, desagradables para el paciente y, además, poco fiables. Por otra parte, la determinación radioinmunológica es de un interés considerable.

En los pacientes afectados de pancreatitis crónica, se observan unos valores de tripsina sérica inferiores a 140 ng/mL en el 50 % de los casos. Este hecho se debe seguramente a una lesión importante en las células acinosas del páncreas.

En cambio, en un 20 % de los casos de pancreatitis crónica, los valores han sido superiores al límite de valores normales de 400 ng/mL, lo cual parece indicar una fase aguda de la pancreatitis (véase párrafo 2.3).

La violencia de los dolores abdominales no se corresponde con la concentración de tripsina sérica. Sin embargo, una esteatorrea a menudo va acompañada de una disminución sensible de la concentración de tripsina sérica.

En los pacientes que presentan pancreatitis crónica cuyos valores de tripsina basal son "normales", la concentración de tripsina sérica aumenta considerablemente durante los 20-120 minutos siguientes a la estimulación con secretina seguida de pancreocimina. Este aumento parece imputable a una mayor permeabilidad de los tejidos del páncreas debida a la inflamación. No ha podido observarse ningún aumento de la tripsina sérica en los sujetos sanos sometidos a la misma prueba de estimulación.

### 11.3. Pancreatitis aguda

En el caso de los pacientes que presentan pancreatitis aguda, siempre se observa un aumento considerable en la concentración de tripsina sérica. Los valores obtenidos van de 600 a 6.500 ng/mL.

### 11.4. Carcinoma de páncreas

En pacientes con carcinoma de páncreas se han detectado concentraciones de tripsina sérica ligeramente altas (de 450 a 1.200 ng/mL), aunque generalmente esta diferencia no se observa. En ausencia de pancreatitis y/o de insuficiencia renal, es preciso realizar otras pruebas diagnósticas.

### 11.5. Fibrosis quística de páncreas

Puede utilizarse el ensayo inmunoradiométrico de tripsina para detectar una fibrosis quística de páncreas. Para más información, véase Trypsin RIA neonatal.

#### Nota:

Parece cierto que después de la estimulación la parte exocrina del páncreas no funciona como una unidad, ya que la correlación entre las concentraciones de amilasa, lipasa y tripsina sérica no siempre se corresponden con lo esperado. Esto ofrece posibilidades para otros diagnósticos diferenciales.

La obtención de concentraciones de tripsina sérica normales (intervalo: de 160 a 600 ng/mL) no excluye la posibilidad de una afección de páncreas.

Se ha observado un aumento en la concentración de tripsina sérica en casos de insuficiencia renal. Así pues, debe tenerse en cuenta el estado funcional del riñón del paciente antes de interpretar las concentraciones de tripsina.

Teniendo en cuenta esta limitación, unos valores inferiores a 160 ng/mL o superiores a 600 ng/mL obtenidos en pacientes que presenten síntomas abdominales pueden ser valores extremos de la "normalidad".

## 12. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LA DETERMINACIÓN

### 12.1. Imprecisión

La imprecisión ha sido calculada utilizando 2 muestras analizadas 10 veces en la misma serie y en 15 series distintas.

Intra-ensayo			Inter-ensayo		
Muestras	Media (ng/mL)	C.V. (%)	Muestras	Media (ng/mL)	C.V. (%)
1	550	2,8	3	162	4,9
2	167	3,3	4	483	6,7

### 12.2. Límite de detección

El límite de detección se define como la concentración mínima detectable distinta de cero con una probabilidad del 95 %. Se ha calculado que es de 8,0 ng/mL.

## 13. INTERFERENCIA

La presencia de bilirrubina en concentraciones de hasta 250 mg / L, hemoglobina hasta 10 g / L y triglicéridos hasta 20 g / L no tienen ningún efecto en los resultados del ensayo. La inmuno-ensayo está protegido contra anticuerpos heterófilos. Sin embargo, no podemos garantizar que esta protección es exhaustiva.

## **14. PRECAUTIONS AND WARNINGS**

### **Seguridad**

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I125 (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35.5 keV) ionizantes.

Las materias primas de origen humano que contienen los reactivos de este equipo han sido sometidas a pruebas con equipos autorizados y han dado resultados negativos para los anticuerpos anti-VIH 1, anti-VIH 2, anti-VHC y para el antígeno de superficie de HB. Sin embargo, puesto que aún no existe ningún método de análisis que garantice íntegramente que un producto de origen humano no puede transmitir la hepatitis, el VIH o cualquier otra infección vírica, todas las materias primas de origen humano, incluidas las muestras a analizar, deben tratarse como potencialmente infecciosas.

Sólo pueden recibir, comprar, almacenar o utilizar este producto radioactivo las personas autorizadas al efecto y en los laboratorios cubiertos por dicha autorización. Bajo ningún concepto debe administrarse esta solución a personas ni animales.

La adquisición, almacenamiento, uso o intercambio de productos radioactivos están sujetos a la legislación vigente en el país del usuario.

El cumplimiento de las reglas básicas de radioprotección garantiza una seguridad adecuada.

Presentamos a continuación un breve resumen de estas normas:

Los productos radioactivos deben conservarse en los contenedores originales y en una zona adecuada.

Debe llevarse un registro actualizado de la recepción y el almacenamiento de productos radioactivos.

La manipulación de productos radioactivos debe realizarse en una zona adecuada y de acceso restringido (zona controlada).

No se debe comer, beber, fumar ni aplicar cosméticos en una zona controlada.

No se deben pipetear con la boca soluciones radioactivas.

Debe evitarse todo contacto directo con los productos radioactivos utilizando batas de laboratorio y guantes de protección.

El material de laboratorio y de vidrio contaminado debe desecharse inmediatamente después de la contaminación para evitar la contaminación cruzada de diferentes isótopos.

Ante cualquier tipo de contaminación o de pérdida de sustancia radioactiva debe actuarse de conformidad con los procedimientos establecidos.

Toda evacuación de desechos radioactivos debe llevarse a cabo siguiendo la normativa en vigor.

## **15. BIBLIOGRAFIA**

1. Adrian TE, Bestermann HS, Mallinson CN, Galarotis C, Bloom SR. Clin Sci Mol Med. 1978;54:24.
2. Bray PT, Clark GCF, Moody GJ, Thomas JDR. Clin Chim. 1977;80:333.
3. Crossley JR, Smith PA, Elliott RB. Lancet. March 3. 1979;472.
4. Elias E, Redshaw M, Wood T. Lancet II. 1977;66.
5. Fedail SS, Salmon PR, Harvey RF, Brown PB, Read AE. Abstract. 1978;19:A445.
6. Goldberg JM. Clin Chem. 1976;22:638.
7. Lesser PB, Marshaw AL. Gastroenterology. 1975;68:630.
8. Nagasawa S, Han BH, Sugihari H, Suzuki T. J Biochem. 1970;67:821.
9. Temler RS, Felber JP. Biochim Biophys. 1976;445:720.

**16. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

**Procedimiento de ensayo Trypsin RIA:**

N° de los tubos de ensayo	Calibradores μL						Suero de control μL	Sueros μL				Actividad total μL	
	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	C	1	2	3	etc.	T
Calibradores S <sub>0</sub>  S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> S <sub>3</sub> S <sub>4</sub> S <sub>5</sub> S <sub>6</sub>	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100						
Suero de control								100/100					
Sueros									100	100	100	etc.	
Tripsina <sup>125</sup> I	←-----200 μL ----->												
Suero anti-tripsina	←-----100 μL ----->												
	Mezcle; incube durante 3 h entre 18° C y 25° C												
Reactivo precipitante	←-----500 μL ----->												
	Mezcle; incube durante 30 min. entre 17° C y 27° C												
Reactivo de lavado	←-----1 mL ----->												
	Centrifugue 15 min. a 1 500 g, a 20° C, decante el sobrenadante												
	Mida la radioactividad de los tubos.											Contaje de la solución	

Revision date : 2020-02-24