
TRYPsik
(P2573)

DiaSorin

English	p. 1
Italiano.....	p. 10
Français	p. 19
Deutsch	p. 28
Español	p. 37

TRYPSIN RADIOIMMUNOASSAY KIT
Procedure for quantitative determination of
trypsin-like immunoreactivity (TLI)
in human serum or plasma samples

1. INTRODUCTION

Assayable species

The molecular species actually measured in a radioimmunoassay system employing trypsin as immunogen, calibrator and material to be labelled was initially believed to be trypsin. Further experiments brought about the eventual identification of the assayable species as cathodic trypsinogen, i.e. the inactive precursor of the enzyme involved in RIA setting-up. It must be noted that circulating trypsin, if any, should escape RIA detection due to formation of non-immunoreactive complexes with serum inhibitors (i.e. α_2 -macroglobulin).

The expression of analytical data as trypsin equivalent concentration (i.e. ng/mL trypsin or more precisely cathodic trypsin) has been used to date by all the researchers concerned, including the authors who first recognized the analyte as trypsinogen. This way of data expressing is maintained as being fully acceptable in terms of analytical self-consistency. Fig. 1 shows the linear correlation of the responses obtained using cathodic trypsinogen and trypsin as calibrator, proving the feasibility of a conversion between the two unit systems. The species measured is usually referred to as trypsin-like immunoreactivity (TLI).

The use of trypsin RIA to assay trypsinogen is justified by the fact that the enzyme can only be effectively purified by Trasylol affinity-chromatography.

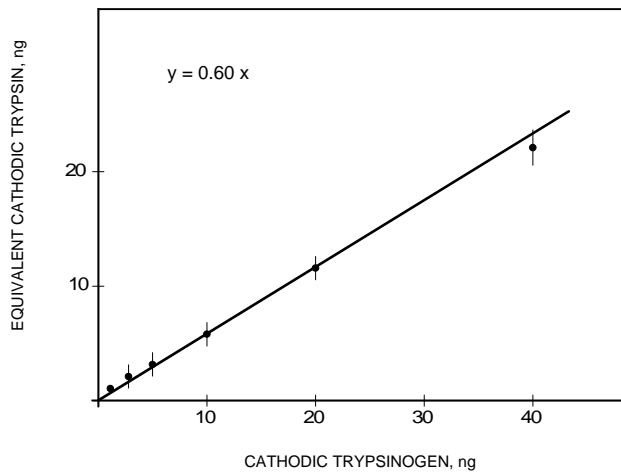


Fig. 1: Check for the immunological equivalence between cathodic trypsin and trypsinogen. The data refer to the mean \pm S.D. recorded in 5 independent experiments.

Biochemical features

Trypsinogen is a zymogen, which is synthesized in the exocrine acinar cells of the pancreas and accumulated in the nuclei of the pancreatic cells. Two forms of trypsinogen exist, giving origin to two distinct trypsin isoenzymes. These species are referred to as *cathodic* and *anodic* trypsinogen and trypsin, according to the respective electrophoretic behaviour.

Trypsinogen has a molecular weight of 24,000 daltons and it is formed by a single chain of 229 amino acid residues. When zymogens are secreted into the gastrointestinal tract, they are converted into their active forms by the selective hydrolytic cleavage of one or more specific peptide bonds in the zymogen molecule. Trypsinogen is converted into active trypsin in the intestinal lumen by removal of a hexapeptide from the N-terminal end through the action of the proteolytic enzyme enterokinase.

Clinical relevance

The clinical relevance of a serum TLI assay lies in the fact that, being synthesized only by the pancreatic acinar cells, it is considered a specific indicator of pancreatic damage, unlike enzymes alpha-amylase and lipase usually employed in pancreatic diagnosis. This remark is supported by the fact that totally pancreatectomized patients present zero TLI levels, but alpha-amylase values within the normal range.

As it is impossible to measure the enzymatic activity of TLI in serum, because of the presence of many inhibitors, the availability of a reliable RIA system for the determination of TLI in serum is of great interest.

In **acute pancreatitis**, TLI levels reach a maximum value of five to ten times higher than the upper normal limit and remain elevated for four to five days after the onset of abdominal pain. No overlap of these elevated levels with normal levels was ever observed, provided that patients affected by severe chronic renal failure (decreased TLI excretion) are not considered. Therefore, when interpreting high levels, the renal status of the patients should be evaluated.

Up to now no serum test has been available to diagnose **chronic pancreatitis**. As pancreatic acini atrophy occurs in this disease, about 50% of patients show a trypsin level below the lower normal limit.

The TLI assay has been proposed as a screening test for the early diagnosis of **cystic fibrosis in newborns**. TLI levels are significantly raised in early stages of cystic fibrosis and fall to subnormal levels as the disease progresses. Abnormally low TLI values have been reported in patients with **diabetes**.

Also, patients affected by **pancreatic carcinoma** seem to present abnormal TLI levels.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The principle of the assay is based on the competition between labelled TLI and TLI contained in calibrators or samples to be assayed for a fixed and limited number of antibody binding sites. After the incubation, the amount of labelled TLI bound to the antibody is inversely related to the concentration of unlabelled TLI present in calibrators or samples. The method adopted for B/F separation is based on the use of a precipitating reagent in which a second antibody is pre-precipitated and in excess.

3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

¹²⁵ I-labelled cathodic trypsin	1 vial
Cathodic trypsin antiserum	1 vial
Zero calibrator	1 vial
Cathodic trypsin calibrators	6 vials
Control serum	1 vial
Precipitating reagent	2 bottles
Number of tubes	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 4 assay runs when used throughout the day at room temperature and stored overnight at 2-8°C.

Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming.

Reagents from different batches must not be mixed.

3.1. ¹²⁵I-labelled cathodic trypsin: lyophilized reagent

The vial contains cathodic trypsin labelled with ¹²⁵I, BSA, phosphate buffer and preservatives. Radioactivity is 57 kBq (1.55 µCi) or less on the calibration date.

Reconstitute the vial contents with 10 mL distilled water. The resulting solution is stable for three weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

3.2. Cathodic trypsin antiserum: lyophilized reagent

The vial contains antiserum raised in rabbits to human cathodic trypsin, BSA, phosphate buffer and preservatives. Reconstitute the vial contents with 10 mL distilled water. The resulting solution is stable for three weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

3.3. Zero calibrator: ready-to-use reagent

The vial contains 10 mL bovine serum and preservatives.

3.4. Cathodic trypsin calibrators: lyophilized reagent

The vials contain increasing amounts of cathodic trypsin, BSA and preservatives.

Reconstitute the contents of the 1-6 calibrator vials with 1 mL zero calibrator. The resulting solutions contain 5 - 10 - 30 - 80 - 200 - 400 ng/mL trypsin and are stable for three weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage. *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends.*

3.5. Control serum: lyophilized reagent

The vial contains cathodic trypsin, human serum and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

Reconstitute the vial contents with 1 mL distilled water. Store the resulting solution in deep-frozen aliquots (-20°C or below).

3.6. Precipitating reagent: ready-to-use reagent

Each bottle contains 53 mL polyethylene glycol, TRIS buffer, antibody to rabbit IgG raised in goats, non-specific rabbit IgG and preservatives.

4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Disposable polystyrene tubes.
- Micropipettes with disposable tips (100, 1000 µL) (trueness ± 2%, precision 1%).
- Test tube rack.
- Vortex mixer.
- Multisample centrifuge capable of achieving 1500-2000 x g*.
- Water aspirator (optional).
- Gamma counter suitable for counting ¹²⁵I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Either human serum or plasma may be used. The anticoagulant EDTA has been tested and may be used with this assay (see §9.1 for heparin and citrate; do not use oxalate). Blood should be collected aseptically by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated from the clot as soon as possible. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is performed within 24 hours of sample collection, the samples should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles. *Decomplemented serum must not be used.*

6. ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature (20-25°C) before assaying. Perform the assay at least in duplicate. Calibrators must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Operate according to the following scheme:

reagents \ tubes	Total activity	Calibrators 0-6	Samples
Calibrators	-	100 µL	-
Samples	-	-	100 µL
Tracer	100 µL	100 µL	100 µL
Antiserum	-	100 µL	100 µL

- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **incubate for one hour at room temperature**.
If low values of TLI are expected (e.g. chronic pancreatitis), sensitivity can be enhanced by adding the tracer 30 min after the other reagents kept at room temperature (30 min preincubation + one hour incubation at room temperature). Conversely, if high values of TLI are expected (e.g. acute pancreatitis), it is suggested to dilute the samples 1:2 with the zero calibrator (50 µL sample + 50 µL zero calibrator).
- Let the bottle of **precipitating reagent reach room temperature** and **mix** well by repeatedly tilting end over end.
- **Dispense 1 mL precipitating reagent** into all the tubes (except for total activity).
- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **let stand for 15 min at room temperature**.
- **Centrifuge** all tubes for 15 min at 1500-2000 x g*.
- **Discard the supernatant** by aspiration or decantation. When aspirating, avoid disturbing the precipitate. When decanting, let the tubes drain mouth down on blotting paper.
- **Measure the radioactivity** of precipitate.

7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Evaluate the binding ability as follows:

$$(B/T)_0\% = \frac{\text{zero calibrator mean counts}}{\text{total activity mean counts}} \times 100$$

Express the mean counts for each calibrator and unknown sample as a percentage of zero calibrator mean counts:

$$B/B_0\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{zero calibrator mean counts}} \times 100$$

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

Plot in linear-linear or semilog coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of TLI concentration expressed as ng/mL on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 2). Directly from the calibration curve, read the TLI concentration of each sample expressed as ng/mL. If the sample was diluted, the TLI concentration value derived from the diluted specimen must be multiplied by the dilution factor.

Calculation example

The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.

Description	cpm	B/Bo x 100
Total activity	20,540	—
Zero calibrator	11,235	100
5 ng/mL	9,830	87.5
10 ng/mL	8,898	79.2
30 ng/mL	6,348	56.5
80 ng/mL	3,876	34.5
200 ng/mL	2,326	20.7
400 ng/mL	1,626	14.5
Sample	6,680	59.5

By interpolation from the calibration curve, the sample is found to contain 26 ng/mL TLI.

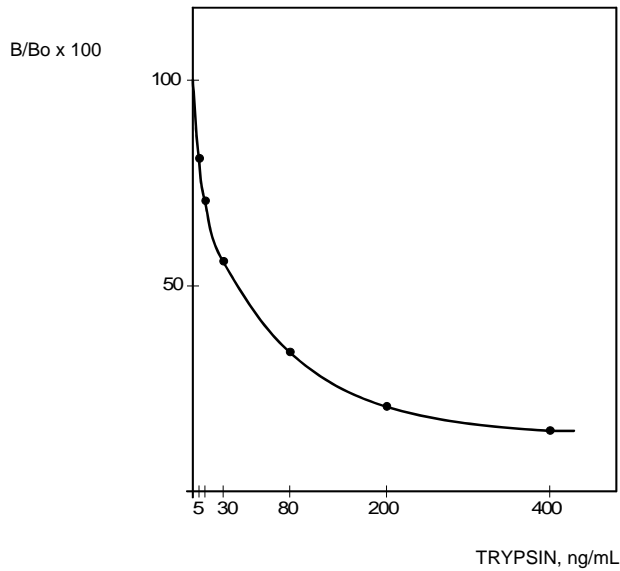


Fig. 2

8. EXPECTED VALUES

The ranges given below are merely indicative: each laboratory should establish its own reference ranges.

Subjects	TLI, ng/mL	
	Mean \pm S.D.	Range
Normal controls	32.0 \pm 10.9	10 - 57
Chronic pancreatitis	16.5 \pm 12.9	< 1.5 - 47
Acute pancreatitis	350 \pm 260	92 - 850
Total pancreatectomy	< 1.5	–

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

Interference. Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by EDTA, haemolysis (up to 1000 mg/dL haemoglobin), lipaemia (up to 500 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 20 mg/dL bilirubin) or one freeze-thaw cycle of samples. TLI values determined in plasma samples obtained with heparin or citrate are about 10% lower than those determined in serum samples.

Cross-reactions. The RIA system was characterized for specificity to trypsin-related substances. Complete discrimination from bovine trypsin, negligible interference with anodic species and large cross-reactivity of cathodic trypsinogen are apparent.

9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 2.5 ng/mL at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator, that is, two standard deviations below zero.

9.3. Precision

Different sample pools, containing different concentrations of specific analyte, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	20	20	20
Mean (ng/mL)	10.10	45.10	97.60
Standard deviation	0.55	2.50	7.10
Coefficient of variation (%)	5.40	5.50	7.30

Reproducibility	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean (ng/mL)	10.70	46.20	101.20
Standard deviation	0.75	3.50	9.70
Coefficient of variation (%)	7.00	7.60	9.60

9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution test. The recovery test has little meaning in heterologous systems like this (calibrator and analyte are different). In this particular case, trypsin calibrator could not be recovered as it forms non-immunoreactive complexes with the inhibitory systems present in the unknown sample.

Dilution test. One serum with high trypsin concentration was tested after serially diluting with the zero calibrator.

Dilution	Expected concentration, ng/mL	Measured concentration, ng/mL	% Recovery
neat	–	226.9	–
1:2	113.5	119.8	105.6
1:4	56.7	61.7	108.8
1:8	28.4	34.7	122.3
1:16	14.2	19.2	135.4
1:32	7.1	9.4	132.6

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results.

A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration or decanting are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration or decanting of incubation mixture
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use.

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. As, however, no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an *overkill* approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 1.5 μCi (55 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories, or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - RECONSTITUTE THE REAGENTS.
- 2 - IDENTIFY ASSAY TUBES IN DUPLICATE.
- 3 - DISPENSE REAGENTS BY THE FOLLOWING SCHEME AND MIX THE INCUBATION MIXTURE:

REAGENTS	TUBES	T	CAL 0-6	SAMPLES
CALIBRATORS		-	100 µL	-
SAMPLES		-	-	100 µL
TRACER		100 µL	100 µL	100 µL
ANTISERUM		-	100 µL	100 µL

- 4 - INCUBATE FOR ONE HOUR AT ROOM TEMPERATURE.
- 5 - ADD 1 mL PRECIPITATING REAGENT TO ALL THE TUBES (except for total activity) AND MIX THOROUGHLY.
- 6 - LET STAND FOR 15 MIN AT ROOM TEMPERATURE.
- 7 - CENTRIFUGE FOR 15 MIN AT 1500-2000 x g*.
- 8 - DISCARD SUPERNATANT.
- 9 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF PRECIPITATE.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

KIT PER IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO DELLA TRIPSINA

Procedimento per l'analisi quantitativa delle sostanze immunoreattive tripsino-simili (TLI) in campioni di siero o plasma umano

1. INTRODUZIONE

Sostanze dosabili

Inizialmente si era ritenuto che la tripsina fosse la specie molecolare effettivamente misurata in un sistema radioimmunologico che usa la tripsina come immunogeno, come calibratore e come materiale per marcatura. Ulteriori esperimenti hanno identificato la sostanza dosata in questo sistema RIA nel tripsinogeno catodico, il precursore inattivo della tripsina catodica. Sembra infatti che la tripsina eventualmente presente in circolo sfugga alla determinazione radioimmunologica per la formazione di complessi non immuno-reattivi con i suoi inibitori sierici (ad es. α_2 -macroglobulina).

L'espressione dei dati analitici come concentrazione di tripsina-equivalente (ossia ng/mL di tripsina o, piú precisamente, tripsina catodica) è stata usata finora da tutti gli autori, compresi quelli che per primi hanno riconosciuto che la sostanza analizzata era tripsinogeno. Questo sistema di esprimere i dati è stato mantenuto in quanto completamente accettabile in termini di validità analitica. La Fig. 1 mostra la correlazione lineare delle risposte ottenute usando come calibratore nel sistema RIA o tripsinogeno catodico o tripsina catodica. Ciò prova che è corretta una conversione tra i due sistemi. Le sostanze dosabili sono perciò di solito espresse come sostanze immunoreattive tripsino-simili (TLI, trypsin-like immunoreactivity).

L'uso del dosaggio radioimmunologico della tripsina per dosare il tripsinogeno è giustificato dal fatto che solo l'enzima può essere purificato in maniera efficace per mezzo di una cromatografia di affinità con Trasylol.

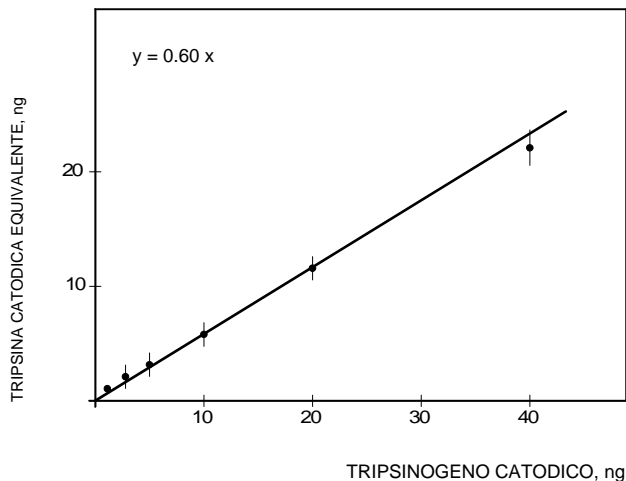


Fig. 1: Controllo dell'equivalenza immunologica tra tripsinogeno e tripsina catodica. I dati riportati si riferiscono alla media \pm D.S. ottenuta in 5 esperimenti indipendenti.

Caratteristiche biochimiche

Il tripsinogeno è uno zimogeno sintetizzato nelle cellule acinari del pancreas esocrino ed accumulato nel nucleo delle cellule pancreatiche. Esistono due forme di tripsinogeno, che danno origine a due distinti isoenzimi della tripsina. Queste specie sono chiamate tripsinogeno e tripsina *catodici* e *anodici* secondo il rispettivo comportamento elettroforetico.

Il tripsinogeno ha peso molecolare 24.000 dalton ed è formato da una singola catena di 229 residui aminoacidici. Quando gli zimogeni sono secreti nel tratto gastroenterico, sono convertiti negli enzimi corrispondenti per distacco di uno o più peptidi ad opera di un enzima proteolitico. Il tripsinogeno è convertito in tripsina attiva nel lume intestinale per eliminazione di un esapeptide dalla porzione N-terminale della molecola per azione di un enzima proteolitico, l'enterocinasi.

Importanza clinica

L'importanza clinica di un dosaggio sierico della TLI sta nel fatto che, essendo sintetizzata esclusivamente dalle cellule acinari pancreatiche, è considerata un indicatore specifico di danno pancreatico, diversamente dagli enzimi alfa-amilasi e lipasi, abitualmente usati nella diagnostica pancreatico. Questa osservazione è sostenuta dal fatto che pazienti totalmente pancreatectomizzati presentano livelli nulli di TLI, ma valori di alfaamylasi entro l'intervallo di normalità.

Dal momento che è impossibile misurare l'attività enzimatica della TLI nel siero a causa della presenza di molti inibitori, è di grande interesse un sistema radioimmunologico attendibile per la determinazione della TLI nel siero.

Nella **pancreatite acuta** i livelli di TLI raggiungono un valore massimo di cinque-dieci volte il limite superiore della norma e restano elevati per quattro-cinque giorni dopo l'instaurarsi del dolore addominale. I valori riscontrati nella pancreatite acuta sono chiaramente distinti dai valori normali, purché non vengano considerati i pazienti affetti da gravi deficienze renali croniche che presentano una diminuzione dell'escrezione della TLI. Perciò, quando si osservano valori elevati la condizione renale del paziente deve essere controllata.

Fino ad oggi, non è stata disponibile alcuna determinazione sierica per la diagnosi della **pancreatite cronica**. In questa malattia, si verifica atrofia degli acini pancreatici e perciò sembra ragionevole presumere che si osservino livelli di TLI al di sotto del limite inferiore della norma, come effettivamente si verifica in più del 50% dei casi. Il dosaggio della TLI è stato proposto come test di screening per la diagnosi precoce della **fibrosi cistica nei neonati**. I livelli di TLI sono significativamente elevati negli stadi precoci della fibrosi cistica e quindi cadono a valori subnormali con il progredire della malattia.

Sono riportati valori molto bassi di TLI anche nei **diabetici**.

Inoltre i pazienti affetti da **carcinoma pancreatico** sembrano presentare livelli anormali di TLI.

2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il principio del dosaggio consiste nella competizione tra TLI marcata e TLI contenuta nei calibratori o nei campioni per il numero fisso e limitato di siti anticorpali. Dopo l'incubazione, la quantità di TLI marcata legata all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di TLI non marcata presente nei calibratori o nei campioni. Il metodo adottato per la separazione libero/legato è basato sull'impiego di un reattivo precipitante in cui il secondo anticorpo è pre-precipitato ed in eccesso.

3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Tripsina catodica marcata con ¹²⁵ I	1 flacone
Antisiero anti-tripsina catodica	1 flacone
Calibratore zero	1 flacone
Calibratori di tripsina catodica	6 flaconi
Siero di controllo	1 flacone
Reattivo precipitante	2 flaconi
Numero di dosaggi	100

MODALITÀ DI CONSERVAZIONE: Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 4 serie analitiche se utilizzato durante il giorno a temperatura ambiente e conservato durante la notte a 2-8°C.

Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.

Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma. Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.

3.1. Tripsina catodica marcata con ¹²⁵I: reattivo liofilo

Il flacone contiene tripsina catodica marcata con ¹²⁵I, sieralbumina bovina, tampone fosfato e conservanti. La radioattività massima è 57 kBq (1,55 µCi) alla data di taratura.

Ricostituire il contenuto del flacone con 10 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per tre settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

3.2. Antisiero anti-tripsina catodica: reattivo liofilo

Il flacone contiene antisiero da coniglio anti-tripsina catodica umana, sieralbumina bovina, tampone fosfato e conservanti.

Ricostituire il contenuto del flacone con 10 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per tre settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

3.3. Calibratore zero: reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 10 mL di siero bovino e conservanti.

3.4. Calibratori di tripsina catodica: reattivo liofilo

I flaconi contengono quantità crescenti di tripsina catodica, sieralbumina bovina e conservanti.

Ricostituire il contenuto dei flaconi dei calibratori 1-6 con 1 mL del calibratore zero. Le soluzioni risultanti contengono 5 - 10 - 30 - 80 - 200 - 400 ng/mL di tripsina; esse sono stabili per tre settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione. *I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.*

3.5. Siero di controllo: reattivo liofilo

Il flacone contiene tripsina catodica, siero umano e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 1 mL di acqua distillata. Conservare la soluzione risultante in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori.

3.6. Reattivo precipitante: reattivo pronto per l'uso

Ogni flacone contiene 53 mL di glicole polietilenico, tampone TRIS, anticorpo da capra anti-IgG di coniglio, IgG di coniglio aspecifiche e conservanti.

4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI

- Acqua distillata e deionizzata.
- Provette in plastica monouso.
- Micropipette con puntali monouso da 100, 1000 µL (esattezza ± 2%, precisione 1%).
- Portaprovette.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga multicampione in grado di raggiungere 1500-2000 gravità.
- Pompa aspirante (facoltativa).
- Contatore gamma per contare lo iodio ¹²⁵I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio può essere effettuato in campioni di siero o plasma umano. Può essere utilizzato EDTA come anticoagulante (vedi §9.1 per eparina e citrato; l'ossalato è sconsigliato). Prelevare il sangue per puntura venosa, lasciarlo coagulare e separare il siero dal coagulo al più presto. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio è eseguito nelle 24 ore successive al prelievo, i campioni possono essere conservati a 2-8°C. In caso contrario, devono essere suddivisi in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. *Non bisogna usare siero scomplementato.*

6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima del dosaggio. Prevedere determinazioni almeno in duplicato. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame.

Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni.

Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Operare secondo lo schema seguente:

reattivi \ provette	Attività totale	Calibratori 0-6	Campioni
Calibratori	-	100 µL	-
Campioni	-	-	100 µL
Tracciante	100 µL	100 µL	100 µL
Antisiero	-	100 µL	100 µL

- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex e **incubare per un'ora a temperatura ambiente**.
Se ci si aspettano valori bassi di TLI (p.es. pancreatite cronica), la sensibilità del dosaggio può essere aumentata aggiungendo il tracciante 30 min dopo gli altri reattivi mantenuti a temperatura ambiente (30 min di preincubazione + un'ora di incubazione a temperatura ambiente). Al contrario, se ci si aspettano valori elevati di TLI (p.es. pancreatite acuta), si suggerisce di diluire i campioni 1:2 con il calibratore zero (50 µL di campione + 50 µL di calibratore zero).
- Portare il **reattivo precipitante a temperatura ambiente** e **agitare** vigorosamente mediante ripetuti capovolgimenti.
- **Distribuire 1 mL di reattivo precipitante** in tutte le provette (eccetto attività totale).
- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex e **incubare per 15 min a temperatura ambiente**.
- **Centrifugare** le provette per 15 min a 1500-2000 gravità.
- **Eliminare il surnatante** per aspirazione o decantazione. Se si preferisce aspirare, evitare di toccare il precipitato. Se si preferisce decantare, capovolgere le provette e lasciarle scolare su carta da filtro.
- **Misurare la radioattività** del precipitato.

7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette dopo aver sottratto il valore del fondo. Calcolare la capacità legante come segue:

$$(B/T)_{0\%} = \frac{\text{conteggio medio calibratore zero}}{\text{conteggio medio attività totale}} \times 100$$

Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto al calibratore zero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio calibratore zero}} \times 100$$

Riportare su grafico lineare-lineare o semilog la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di TLI espressa in ng/mL sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 2). Direttamente dalla curva di taratura leggere la concentrazione di TLI di ciascun campione espressa in ng/mL. Se il campione è stato diluito, la concentrazione di TLI trovata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

Esempio di calcolo

I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

Descrizione	cpm	B/Bo x 100
Attività totale	20.540	–
Calibratore zero	11.235	100
5 ng/mL	9.830	87,5
10 ng/mL	8.898	79,2
30 ng/mL	6.348	56,5
80 ng/mL	3.876	34,5
200 ng/mL	2.326	20,7
400 ng/mL	1.626	14,5
Campione	6.680	59,5

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 26 ng/mL di TLI.

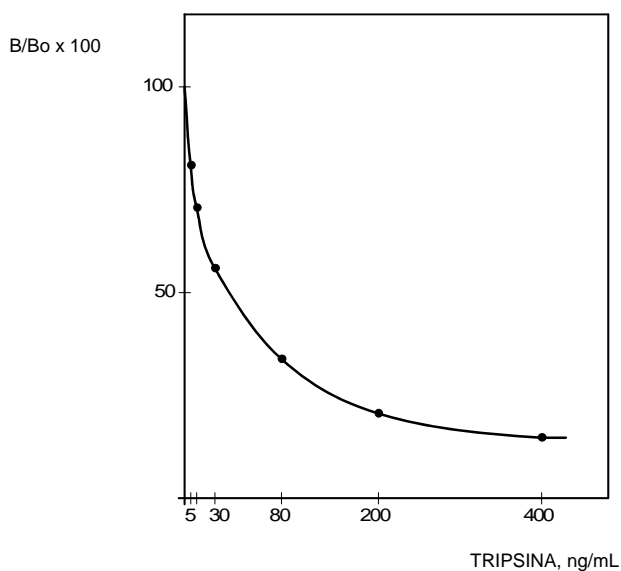


Fig. 2

8. DATI CLINICI

I valori riportati nella tabella seguente sono solamente indicativi. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

Soggetti	TLI, ng/mL	
	Media \pm D.S.	Intervallo
Normali	32,0 \pm 10,9	10 - 57
Pancreatite cronica	16,5 \pm 12,9	< 1,5 - 47
Pancreatite acuta	350 \pm 260	92 - 850
Pancreatectomia totale	< 1,5	-

9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, anticoagulanti, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

Interferenze. Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da EDTA, emolisi (fino a 1000 mg/dL di emoglobina), lipemia (fino a 500 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 20 mg/dL di bilirubina) o un congelamento dei campioni. I valori di TLI ottenuti con i campioni di plasma contenenti eparina o citrato risultano circa del 10% inferiori a quelli ottenuti con i campioni di siero.

Reazioni crociate. Il sistema radioimmunologico del kit è stato caratterizzato per la specificità verso sostanze correlate alla tripsina catodica. Se ne è dedotta l'esistenza di una discriminazione completa dalla tripsina bovina, di interferenze trascurabili con le specie anodiche e di una elevata reattività crociata con il tripsinogeno catodico.

9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 2,5 ng/mL al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero, ossia due deviazioni standard sotto lo zero.

9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diverse concentrazioni di analita.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	20	20	20
Media (ng/mL)	10,10	45,10	97,60
Deviazione standard	0,55	2,50	7,10
Coefficiente di variazione (%)	5,40	5,50	7,30

Riproducibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (ng/mL)	10,70	46,20	101,20
Deviazione standard	0,75	3,50	9,70
Coefficiente di variazione (%)	7,00	7,60	9,60

9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante il test di diluizione. Il test di recupero ha scarso significato in sistemi eterologhi come questo (diversità di specie tra calibratore e analita). In questo caso particolare, il calibratore di tripsina sfugge alla misura radioimmunologica dal momento che forma complessi non immunoreattivi con i sistemi inibitori presenti nel campione.

Test di diluizione. Sono state dosate diluizioni scalari di un siero a concentrazione elevata di tripsina effettuate nel calibratore zero.

Diluizione	Concentrazione attesa, ng/mL	Concentrazione misurata, ng/mL	% Recupero
in toto	–	226,9	–
1:2	113,5	119,8	105,6
1:4	56,7	61,7	108,8
1:8	28,4	34,7	122,3
1:16	14,2	19,2	135,4
1:32	7,1	9,4	132,6

10. LIMITI DEL DOSAGGIO

La diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelo dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere un'adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nelle fasi di ricostituzione e distribuzione dei reattivi e in quella d'aspirazione o decantazione.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti d'inquinamento batterico
- aspirazione o decantazione non adeguate della miscela di incubazione
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.

- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di overkill (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario di indicatori biologici.

13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 1,5 μCi (55 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1 - RICOSTITUIRE I REATTIVI.
- 2 - CONTRASSEGNARE LE PROVETTE IN DUPLICATO.
- 3 - DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE E AGITARE LA MISCELA DI REAZIONE:

REATTIVI \ PROVETTE	T	CAL 0-6	CAMPIONI
CALIBRATORI	-	100 µL	-
CAMPIONI	-	-	100 µL
TRACCIANTE	100 µL	100 µL	100 µL
ANTISIERO	-	100 µL	100 µL

- 4 - INCUBARE PER UN'ORA A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 5 - AGGIUNGERE 1 mL DEL REATTIVO PRECIPITANTE IN TUTTE LE PROVETTE (eccetto attività totale) E AGITARE VIGOROSAMENTE.
- 6 - INCUBARE PER 15 MIN A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 7 - CENTRIFUGARE PER 15 MIN A 1500-2000 GRAVITÀ.
- 8 - ELIMINARE IL SURNATANTE.
- 9 - MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DEL PRECIPITATO.

TROUSSE POUR LE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE LA TRYPSINE

Technique pour la détermination quantitative de l'activité trypsine-similaire (TLI) dans le sérum ou dans le plasma humain

1. INTRODUCTION

Substances dosables

On pensait initialement que la trypsine était l'espèce moléculaire effectivement mesurée dans un système radioimmunologique qui utilise la trypsine en tant qu'immunogène, comme étalon et comme le matériau de marquage. De nouvelles expériences ont identifié la substance dosée dans ce système RIA comme étant le trypsinogène cathodique, le précurseur inactif de la trypsine cathodique. Il semble en effet que la trypsine éventuellement présente dans la circulation échappe au dosage radioimmunologique du fait de la formation de complexes non immunoréactifs avec ses inhibiteurs sériques (par ex. alfa₂- macroglobuline).

Tous les auteurs ont employé jusqu'à présent l'expression des données analytiques comme concentration de trypsine équivalente (à savoir ng/mL de trypsine ou, plus précisément, de trypsine cathodique), y compris ceux qui ont reconnu en premier que la substance analysée était le trypsinogène. Cette manière d'exprimer les données a été conservée car elle est complètement acceptable en termes de validité analytique. La Fig. 1 illustre la corrélation linéaire des réponses obtenues en utilisant comme étalon dans le système RIA le trypsinogène cathodique ou bien la trypsine cathodique. Cela prouve que la conversion d'un système à l'autre est correcte. Les substances dosables sont donc généralement exprimées comme activité trypsine-similaire (TLI, trypsin-like immunoreactivity).

L'utilisation d'un dosage radioimmunologique de la trypsine pour mesurer le trypsinogène est justifiée par le fait que seule l'enzyme peut être purifiée de manière efficace au moyen d'une chromatographie d'affinité avec le Trasylol.

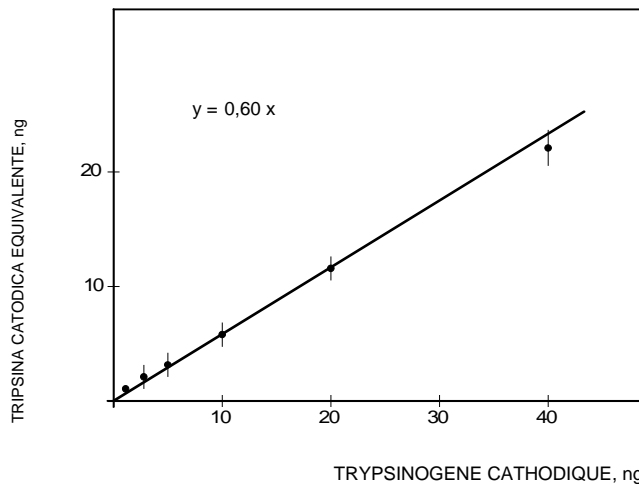


Fig. 1: Contrôle de l'équivalence immunologique entre le trypsinogène et la trypsine cathodique. Les données fournies se réfèrent à la moyenne \pm E.T. obtenue dans 5 expériences indépendantes.

Caractéristiques biochimiques

Le trypsinogène est un zymogène synthétisé dans les cellules centro-acineuses du pancréas exocrine et stocké dans les vésicules enzymatiques des cellules pancréatiques. Il existe deux formes de trypsinogène, qui donnent deux isoenzymes distincts de la trypsine. Ces espèces sont appelées trypsinogène et trypsine *cathodiques* et *anodiques* suivant leur comportement électrophorétique.

Le trypsinogène possède un poids moléculaire de 24.000 daltons et se compose d'une seule chaîne de 229 résidus d'acides aminés. Lorsque les zymogènes sont sécrétés dans le tractus gastro-entérique, ils sont convertis dans les enzymes correspondantes par détachement d'un ou de plusieurs peptides sous l'effet d'une enzyme protéolytique. L'activation du trypsinogène en trypsine active se fait dans la lumière intestinale par élimination d'un hexapeptide de la portion N-terminale de la molécule sous l'effet d'une enzyme protéolytique, l'entérokinase.

Importance clinique

L'importance clinique d'un dosage sérique de la TLI réside dans le fait qu'elle est synthétisée exclusivement par les cellules centro-acineuses du pancréas et qu'elle est donc considérée comme un indicateur spécifique de dommage pancréatique, contrairement aux enzymes α -amylase et lipase, généralement utilisées dans le diagnostic pancréatique. Ceci est confirmé par le fait que les patients ayant subi une pancréatectomie totale présentent des niveaux nuls de TLI, alors que les valeurs d' α -amylase restent dans la norme.

Etant donné qu'il est impossible de mesurer l'activité enzymatique de la TLI dans le sérum à cause de la présence de nombreux inhibiteurs, un système radioimmunologique valable pour la détermination de la TLI dans le sérum présente un grand intérêt.

Dans la **pancréatite aiguë**, les niveaux de TLI atteignent une valeur maximum de cinq à dix fois la limite supérieure de la norme et restent élevés pendant quatre à cinq jours après l'apparition de la douleur abdominale. Les valeurs détectées dans la pancréatite aiguë se distinguent clairement des valeurs normales, à condition de ne pas considérer les patients atteints de grave insuffisance rénale chronique, qui présentent une diminution de l'excrétion de la TLI. Lorsque des valeurs élevées sont détectées, la condition rénale du patient doit donc être contrôlée.

Jusqu'à ce jour, aucune détermination sérique pour le diagnostic de la **pancréatite chronique** n'est disponible. Cette pathologie entraîne une atrophie des cellules centroacineuses du pancréas; il semble donc raisonnable de penser que les niveaux de TLI sont au-dessous de la limite inférieure de la norme, comme c'est effectivement le cas dans plus de 50% des cas.

Le dosage de la TLI a été proposé comme test de dépistage pour le diagnostic précoce de la **mucoviscidose** (fibrose kystique) **chez les nouveau-nés**. Les niveaux de TLI sont significativement élevés dans les stades précoces de la mucoviscidose puis baissent jusqu'à des valeurs inférieures à la norme alors que la maladie progresse.

Des valeurs très basses de TLI sont également présentes chez les **diabétiques**.

Enfin, les patients atteints de **carcinome pancréatique** semblent présenter des niveaux anormaux de TLI.

2. PRINCIPE DU DOSAGE

Le principe du dosage repose sur la compétition entre, d'une part, la TLI marquée et, de l'autre, la TLI contenue dans les étalons ou les échantillons vis-à-vis des sites d'anticorps, en nombre limité et fixe. Après l'incubation, la quantité de TLI marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration de TLI non marquée présente dans les étalons ou les échantillons. Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi d'un réactif précipitant dans lequel un second anticorps en excès est précipité.

3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Trypsine cathodique marquée à l' ¹²⁵ I	1 flacon
Antisérums anti-trypsine cathodique	1 flacon
Etalon zéro	1 flacon
Etalons de trypsine cathodique	6 flacons
Sérum de contrôle	1 flacon
Réactif précipitant	2 flacons
Nombre de dosages	100

STOCKAGE: Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 4 séries analytiques si elle est utilisée pendant le jour à température ambiante et conservée pendant la nuit à 2-8°C.

Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.

Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu afin d'éviter la formation de mousse. Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

3.1. Trypsine cathodique marquée à I¹²⁵I: réactif lyophilisé

Le flacon contient de la trypsine cathodique marquée à I¹²⁵I, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté et des conservateurs. La radioactivité maximale est de 57 kBq (1,55 µCi) à la date d'étalonnage.

Reconstituer le contenu du flacon avec 10 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C pendant trois semaines. La congeler divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

3.2. Antisérum anti-trypsine cathodique: réactif lyophilisé

Le flacon contient de l'antisérum de lapin anti-trypsine cathodique humaine, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté et des conservateurs.

Reconstituer le contenu du flacon avec 10 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C pendant trois semaines. La congeler divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

3.3. Etalon zéro: réactif prêt à l'emploi

Le flacon contient 10 mL de sérum bovin et des conservateurs.

3.4. Etalons de trypsine cathodique: réactif lyophilisé

Les flacons contiennent des quantités croissantes de trypsine cathodique, de la sérumalbumine bovine et des conservateurs.

Reconstituer le contenu des flacons des étalons 1-6 avec 1 mL d'étalon zéro. Les solutions obtenues contiennent 5 - 10 - 30 - 80 - 200 - 400 ng/mL de trypsine; elles restent stables à 2-8°C pendant trois semaines. Les congeler divisées en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé. *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés, s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

3.5. Sérum de contrôle: réactif lyophilisé

Le flacon contient de la trypsine cathodique, du sérum humain et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables.

Reconstituer le contenu du flacon avec 1 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue se conserve congelée divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses.

3.6. Réactif précipitant: réactif prêt à l'emploi

Chaque flacon contient 53 mL de polyéthylène-glycol, du tampon TRIS, des anticorps anti-IgG de lapin obtenus en chèvre, des IgG de lapin non spécifiques et des conservateurs.

4. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Seulement pour usage diagnostique *in vitro*.

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

Réactifs contenant de l'iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 1,5 µCi (55 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPRI⁽¹⁾ et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants.

⁽¹⁾ O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les troussees conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

7. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Tubes en polystyrène à usage unique.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 100, 1000 µL (justesse ± 2%, fidélité 1%).
- Portoir pour tubes.
- Mélangeur Vortex.
- Centrifugeuse multi-échantillons capable d'atteindre 1500-2000 x g*.
- Trompe à vide (facultative).
- Compteur gamma pour compter l'iode ¹²⁵I (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le dosage peut être effectué sur du sérum ou du plasma humain. On peut employer l'EDTA comme anticoagulant (Cfr. §9.1 pour l'héparine et le citrate; l'oxalate est déconseillé). Pour obtenir le sérum prélever le sang par piqûre intraveineuse, le laisser coaguler et séparer le sérum du caillot dès que possible. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage est exécuté dans les 24 heures suivant le prélèvement, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être aliquotés et congelés à -20°C ou à des températures plus basses. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage. Il faut éviter les cycles de congélation/décongélation répétés. *Ne pas utiliser de sérum décomplémenté.*

9. MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant le dosage. Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption.

Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Procéder d'après le schéma suivant:

réactifs \ tubes	Activité totale	Etalons 0-6	Echantillons
Etalons	-	100 µL	-
Echantillons	-	-	100 µL
Traceur	100 µL	100 µL	100 µL
Antisérum	-	100 µL	100 µL

- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber pendant une heure à température ambiante**. *Si l'on s'attend à des valeurs basses de TLI (par ex. pancréatite chronique), la sensibilité du dosage peut être augmentée en ajoutant le traceur 30 min après les autres réactifs conservés à température ambiante (30 min de pré-incubation + une heure d'incubation à température ambiante). Au contraire, si l'on s'attend à des valeurs élevées de TLI (par ex. pancréatite aiguë), nous conseillons de diluer les échantillons au 1/2 avec l'étalon zéro (50 µL d'échantillon + 50 µL d'étalon zéro).*
- Amener le **réactif précipitant à température ambiante** puis **agiter** énergiquement par retournements successifs.

*g = (1118 x 10⁻⁸) (rayon en cm) (tr/min)²

- **Distribuer 1 mL de réactif précipitant** dans tous les tubes (sauf dans ceux réservés à l'activité totale).
- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber pendant 15 min à température ambiante**.
- **Centrifuger** les tubes à 1500-2000 x g* pendant 15 min.
- **Éliminer le surnageant** par aspiration ou décantation. Dans le cas de l'aspiration, éviter de toucher le précipité. Si l'on préfère procéder à la décantation, il faut renverser les tubes et les laisser égoutter sur un papier buvard.
- **Mesurer la radioactivité** du précipité.

10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes, après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la capacité de liaison comme suit:

$$(B/T)_{0\%} = \frac{\text{moyenne des coups par minute de l'étalon zéro}}{\text{moyenne des coups par minute de l'activité totale}} \times 100$$

Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'étalon zéro:

$$B/Bo\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'activité totale}} \times 100$$

Reporter sur du papier bi-linéaire ou semi-logarithmique le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration de TLI exprimée en ng/mL sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 2 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue. Lire la concentration de TLI de chaque échantillon exprimée en ng/mL directement de la courbe d'étalonnage. Si l'échantillon a été dilué, la concentration obtenue doit être multipliée par le facteur de dilution.

Exemple de calcul

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/Bo x 100
Activité totale	20.540	–
Etalon zéro	11.235	100
5 ng/mL	9.830	87,5
10 ng/mL	8.898	79,2
30 ng/mL	6.348	56,5
80 ng/mL	3.876	34,5
200 ng/mL	2.326	20,7
400 ng/mL	1.626	14,5
Echantillon	6.680	59,5

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 26 ng/mL de TLI.

*g = (1118 x 10⁻⁸) (rayon en cm) (tr/min)²

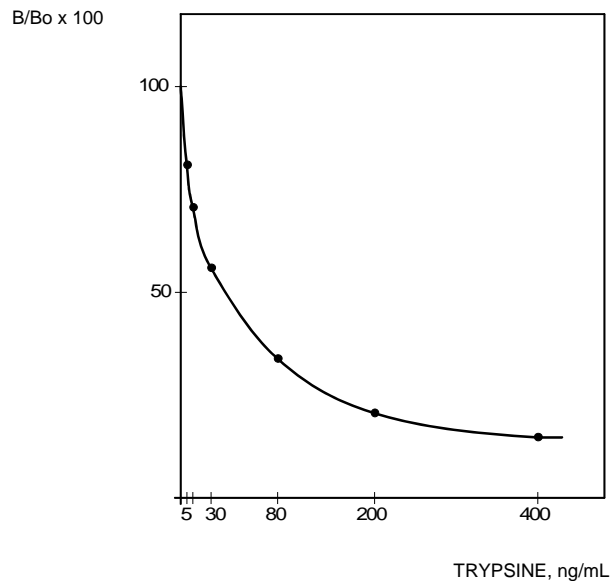


Fig. 2

11. VALEURS DE REFERENCE

Les valeurs fournies dans le tableau ci-dessous ne sont données qu'à titre indicatif; chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.

Sujets	TLI, ng/mL	
	Moyenne \pm E.T.	Intervalle
Normaux	32,0 \pm 10,9	10 - 57
Pancréatite chronique	16,5 \pm 12,9	< 1,5 - 47
Pancréatite aiguë	350 \pm 260	92 - 850
Pancréatectomie totale	< 1,5	-

12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple anticoagulants, hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

Interférences. Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par de l'EDTA, par une hémolyse (jusqu'à 1000 mg/dL d'hémoglobine), une lipémie (jusqu'à 500 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine) ou par une congélation des échantillons. Les valeurs de TLI obtenues avec des échantillons de plasma sur héparine ou citrate sont inférieures d'environ 10% aux valeurs obtenues avec des échantillons de sérum.

Réactions croisées. Le système radioimmunologique de la trousse a été caractérisé pour la spécificité vis-à-vis des substances corrélées à la trypsine cathodique. On en déduit l'existence d'une discrimination complète de la trypsine bovine, d'interférences négligeables avec les espèces anodiques et d'une réactivité croisée élevée avec le trypsinogène cathodique.

12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité minimum d'analyte que le test peut détecter. La limite de détection est de 2,5 ng/mL avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro, c'est-à-dire deux écarts type au-dessous de zéro.

12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes concentrations d'analyte ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire la variabilité intra- essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	20	20	20
Moyenne (ng/mL)	10,10	45,10	97,60
Ecart type	0,55	2,50	7,10
% de coefficient de variation	5,40	5,50	7,30

Reproductibilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (ng/mL)	10,70	46,20	101,20
Ecart type	0,75	3,50	9,70
% de coefficient de variation	7,00	7,60	9,60

12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide du test de dilution. Dans des systèmes hétérologues comme celui-ci (diversité d'espèce entre étalon et analyte), le test de surcharge n'a pas grande valeur. Dans ce cas particulier, l'étalon de trypsine échappe à la détection radioimmunologique puisqu'il forme des complexes non immunoréactifs avec les systèmes d'inhibition présents dans l'échantillon.

Test de dilution. Le test de dilution a été réalisé sur un sérum de concentration élevée en trypsine dilué en série à l'aide de l'étalon zéro.

Dilution	Concentration attendue, ng/mL	Concentration mesurée, ng/mL	% Récupération
pur	–	226,9	–
1/2	113,5	119,8	105,6
1/4	56,7	61,7	108,8
1/8	28,4	34,7	122,3
1/16	14,2	19,2	135,4
1/32	7,1	9,4	132,6

13. LIMITES DU DOSAGE

Le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/ décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration ou de décantation sont indispensables à la fiabilité du test.

Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne

- aspiration ou décantation inadéquates du mélange d'incubation
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - RECONSTITUER LES RÉACTIFS.
- 2 - IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPÈRE LES TUBES EN DOUBLETS.
- 3- DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

RÉACTIFS \ TUBES	T	ÉTALONS 0-6	ÉCHANTILLONS
ÉTALONS	-	100 µL	-
ÉCHANTILLONS	-	-	100 µL
TRACEUR	100 µL	100 µL	100 µL
ANTISÉRUM	-	100 µL	100 µL

- 4 - INCUBER PENDANT UNE HEURE À TEMPÉRATURE AMBIANTE.
- 5 - AJOUTER 1 mL DE RÉACTIF PRÉCIPITANT DANS TOUS LES TUBES (sauf dans ceux réservés à l'activité totale) PUIS AGITER VIGOREUSEMENT.
- 6 - INCUBER PENDANT 15 MIN À TEMPÉRATURE AMBIANTE.
- 7 - CENTRIFUGER PENDANT 15 MIN À 1500-2000 x g*.
- 8 - ÉLIMINER LE SURNAGEANT.
- 9 - MESURER LA RADIOACTIVITÉ DU PRÉCIPITÉ.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

TRYPsin RIA

Methode zur quantitativen radioimmunologischen Bestimmung der Trypsin-ähnlichen Aktivität (TLI) in Humanserum oder -plasma

1. EINLEITUNG

Bestimmbare Substanzen

Anfänglich dachte man, dass Trypsin die Molekularsorte war, die in einem radioimmunologischen System tatsächlich gemessen wurde, das Trypsin als Immunogen, als Kalibrator und als Material zur Markierung verwendete. Weitere Versuche haben die in diesem RIA-System bestimmte Substanz als kathodisches Trypsinogen identifiziert, den inaktiven Vorläufer des kathodischen Trypsins. Es scheint nämlich, dass sich das im Kreislauf eventuell vorhandene Trypsin der radioimmunologischen Bestimmung wegen der Bildung von nicht-immunreaktiven Komplexen mit seinen Serum-Inhibitoren (z.B. Alpha₂-Makroglobulin) entzieht.

Der Ausdruck der analytischen Daten als Konzentration von Trypsin-Äquivalent (d.h. ng/ mL Trypsin oder, genauer, kathodisches Trypsin) wurde bis jetzt von allen Autoren verwendet, einschließlich derjenigen, die als erste erkannt haben, dass es sich bei der analysierten Substanz um Trypsinogen handelte. Dieses System, die Daten auszudrücken, wurde erhalten, da es in Bezug auf analytische Gültigkeit vollkommen akzeptabel ist. Die Abb. 1 zeigt die lineare Korrelation der Antworten, die mit Anwendung von entweder kathodischem Trypsinogen oder kathodischem Trypsin als Kalibrator im RIA-System erreicht wurden. Das beweist, dass eine Umwandlung zwischen den beiden Systemen korrekt ist. Daher werden die bestimmbar Substanzen gewöhnlich als Trypsinähnliche Aktivität (TLI, trypsin-like immunoreactivity) ausgedrückt.

Die Anwendung der radioimmunologischen Bestimmung von Trypsin für die Bestimmung von Trypsinogen wird von der Tatsache gerechtfertigt, dass nur das Enzym, mittels einer Affinitäts-Chromatographie mit Trasylol, wirkungsvoll gereinigt werden kann.

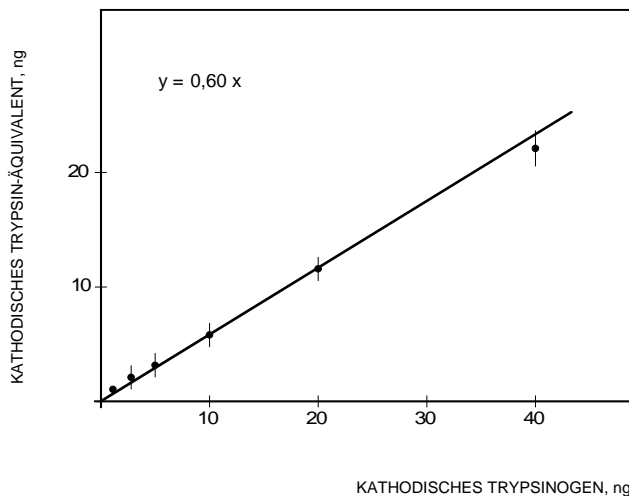


Abb. 1: Kontrolle der immunologischen Äquivalenz von Trypsinogen mit kathodischem Trypsin. Die angegebenen Daten beziehen sich auf den Mittelwert \pm Standardabweichung, in 5 voneinander unabhängigen Versuchen erreicht.

Biochemische Eigenschaften

Trypsinogen ist ein Zymogen, das in den zentroazinären Zellen des exokrinen Pankreas synthetisiert und im Kern der Pankreaszellen angesammelt wird. Es gibt zwei Trypsinogen-Formen, die den Ursprung von zwei verschiedenen Isoenzymen des Trypsins darstellen. Diese Formen heißen *anodisches* und *kathodisches* Trypsinogen und Trypsin, je nach dem entsprechenden Verhalten bei der Elektrophorese.

Trypsinogen hat ein Molekulargewicht von 24.000 Daltons und besteht aus einer einzelnen Kette von 229 Aminosäurenresten. Wenn die Zymogene im gastrointestinalen Apparat abgesondert werden, werden sie in die entsprechenden Enzyme nach Trennung von einem oder mehreren Peptiden durch ein proteolytisches Enzym umgewandelt. Trypsinogen wird im intestinalen Lumen durch Elimination eines Hexapeptids vom N-Endteil des Moleküls unter der Wirkung eines proteolytischen Enzyms, Enterokinase, zu aktivem Trypsin umgewandelt.

Klinische Bedeutung

Da TLI ausschließlich von den zentroazinären Zellen des Pankreas synthetisiert wird, besteht die klinische Bedeutung einer Serum-Bestimmung von TLI in der Tatsache, dass es als einen klinischen Indikator eines Pankreas-Schadens betrachtet wird, unterschiedlich von den Enzymen Alpha-Amylase und Lipase, die gewöhnlich in der Pankreas-Diagnostik verwendet werden. Diese Betrachtung wird von der Tatsache unterstützt, dass total pankreatektomierte Patienten Null-Werte von TLI, aber Alpha-Amylase-Werte innerhalb des Normalbereichs zeigen.

Da die Bestimmung der Enzymaktivität von TLI im Serum wegen der Anwesenheit vieler Inhibitoren unmöglich ist, ist ein zuverlässiges radioimmunologisches System für die Bestimmung von TLI im Serum von großem Interesse.

Bei der **akuten Pankreatitis** erreichen die TLI-Niveaus einen Höchstwert, der 5-/10-mal größer als der obere normale Grenzwert ist, und bleiben hoch für vier-fünf Tage nach dem Beginn der Abdominalschmerzen. Die bei der akuten Pankreatitis befundenen Werte sind deutlich verschieden von den normalen Werten, wenn aber die Patienten mit schweren chronischen Niereninsuffizienzen nicht in Betracht gezogen werden, die eine Verminderung der TLI-Absonderung zeigen. Wenn man also hohe Werte beobachtet, ist die Nierenfunktion des Patienten zu kontrollieren.

Bis heute stand keine Serum-Bestimmung für die Diagnose der **chronischen Pankreatitis** zur Verfügung. Bei dieser Erkrankung ereignet sich eine Atrophie der zentroazinären Zellen des Pankreas, und deswegen scheint die Vermutung vernünftig zu sein, dass man TLI-Niveaus unterhalb der unteren normalen Grenze beobachtet, wie es tatsächlich in über 50% der Fälle geschieht.

Die TLI-Bestimmung wurde als Screening-Verfahren-Test für die frühzeitige Diagnose der **Mukoviszidose bei Neugeborenen** vorgeschlagen. Die TLI-Niveaus sind in den frühzeitigen Stadien der Mukoviszidose bedeutend hoch und sinken dann unterhalb der normalen Werte mit dem Fortschritt der Erkrankung.

Sehr niedrige TLI-Werte werden auch bei **Diabetikern** berichtet.

Die an **Pankreaskarzinom** leidenden Patienten scheinen außerdem, anormale TLI-Werte zu zeigen.

2. TESTPRINZIP

Die Bestimmung basiert auf der Konkurrenz um eine feste und begrenzte Anzahl der Antikörperbindungsstellen zwischen markiertem TLI und in den Kalibratoren oder in den Proben enthaltenem TLI. Nach der Inkubation ist die Menge des mit dem Antikörper gebundenen, markierten TLI umgekehrt proportional zur Konzentration des in den Kalibratoren oder in den Proben anwesenden, nicht markierten TLI. Die Trennmethode basiert auf der Anwendung eines Präzipitierungsmittels, wobei der zweite Antikörper vor-präzipitiert und im Übermaß vorliegt.

3. IM KIT MITGELIEFERTER REAGENZIEN

¹²⁵ J-markiertes kathodisches Trypsin	1 Fläschchen
Antiserum gegen kathodisches Trypsin	1 Fläschchen
Nullkalibrator	1 Fläschchen
Kalibratoren von kathodischem Trypsin	6 Fläschchen
Kontrollserum	1 Fläschchen
Präzipitierungsmittel	2 Fläschchen
Anzahl der Bestimmungen	100

LAGERUNG: Die Testpackung bei 2-8°C lagern! Nicht einfrieren. Nach dem Öffnen sind alle Reagenzien des Kits bei entsprechender Lagerung bis zum Verfalldatum des Kits stabil. Der Kit wurde für die Durchführung von 4 analytischen Testserien entworfen, wenn er tagsüber bei Raumtemperatur verwendet und nachtsüber bei 2-8°C aufbewahrt wird.

Die Reagenzien sind nicht nach dem Verfalldatum zu benutzen. Das Verfalldatum des Kits befindet sich auf der Verpackung und ist identisch mit dem Verfalldatum des Tracers. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind jeweils auf den Fläschchenetiketten angegeben.

Die Reagenzien unter Vermeidung von Schaum auflösen.

Nie unterschiedliche Reagenzienchargen miteinander mischen!

3.1. ¹²⁵J-markiertes kathodisches Trypsin (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält mit ¹²⁵J markiertes kathodisches Trypsin, Rinderserumalbumin, Phosphatpuffer und Konservierungsmittel. Die Radioaktivität beträgt max. 57 kBq (1,55 µCi) am Tag der Kalibration.

Den Inhalt des Fläschchens mit 10 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung ist drei Wochen bei 2-8°C haltbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

3.2. Antiserum gegen kathodisches Trypsin (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält Antiserum (Kaninchen) gegen kathodisches Human-Trypsin, Rinderserumalbumin, Phosphatpuffer und Konservierungsmittel.

Den Inhalt des Fläschchens mit 10 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung ist drei Wochen bei 2-8°C haltbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

3.3. Nullkalibrator (gebrauchsfertige Lösung)

Das Fläschchen enthält 10 mL Rinderserum und Konservierungsmittel.

3.4. Kalibratoren von kathodischem Trypsin (lyophilisiert)

Die Fläschchen enthalten kathodisches Trypsin in steigenden Mengen, Rinderserumalbumin und Konservierungsmittel.

Den Inhalt der Fläschchen der Kalibratoren 1-6 mit 1 mL Nullkalibrator auflösen. Die so erhaltenen Lösungen enthalten 5 - 10 - 30 - 80 - 200 - 400 ng/mL Trypsin. Sie sind drei Wochen bei 2-8°C haltbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). *Die Kalibratoren des Kits sind mit den untersuchten Proben umschaltbar, wenn sie mit den Reagenzien und der Testdurchführung dieses In-vitro diagnostischen Tests verwendet werden, gemäß den Anweisungen des Herstellers.*

3.5. Kontrollserum (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält kathodisches Trypsin, Humanserum und Konservierungsmittel. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

Den Inhalt des Fläschchens mit 1 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

3.6. Präzipitiermittel (gebrauchsfertige Lösung)

Jedes Fläschchen enthält 53 mL Polyäthylenglykol, TRIS-Puffer, gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper (Ziege), unspezifisches Kaninchen-IgG und Konservierungsmittel.

4. ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

- Aqua dest. und deionisiertes Wasser.
- Plastik-Röhrchen für den einmaligen Gebrauch.
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (100, 1000 µL) (Richtigkeit ± 2%, Präzision 1%).
- Röhrchen-Ständer.
- Vortex-Mischer.
- Multiprobenzentrifuge (1500-2000 x g*).

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

- ggf. Absaugvorrichtung.
- Gammacounter um das ¹²⁵J-Jod zu zählen (Anlegen der Counter-Öffnung: 15-80 keV - Counter-Leistungsfähigkeit: 70% - Zählungszeit: 1 Min.). Wenn die Counter-Leistungsfähigkeit kleiner als 60% ist, muss die Zählungszeit verlängert werden (2 Min.).

5. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es kann Humanserum oder -plasma verwendet werden. EDTA kann als Antikoagulant verwendet werden (siehe §9.1 für Heparin und Zitrat; Oxalat wird abgeraten). Blut aus der Vene entnehmen, koagulieren lassen und das Serum so schnell wie möglich vom Koagulat trennen. Die Proben, die Teilchen in Suspension aufweisen, trüb oder lipämisch sind, oder Erythrozytenreste aufweisen, durch Filtern oder Zentrifugieren klären. Weder stark hämolytische oder lipämische Proben, noch Proben mit Teilchen in Suspension oder eindeutiger Mikrobenkontamination verwenden! Werden die Bestimmungen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8°C aufbewahrt werden; andernfalls portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Sind die Proben aufgetaut worden, vor der Bestimmung vorsichtig schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! *Kein komplementloses Serum verwenden!*

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Mindestens Doppelbestimmungen durchführen. Die Bestimmung der Kalibratoren ist für jede Probenreihe durchzuführen. Kalibratoren und Proben unter den gleichen Bedingungen testen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerungen zwischen den einzelnen Versuchsschritten durchführen.

Für jede Pipettierung der Kalibratoren und der Proben saubere Einmalspitzen benutzen.

- Der Testverlauf erfolgt nach folgendem Schema:

Röhrchen \ Reagenzien	Totalaktivität	Kalibratoren 0-6	Proben
Kalibratoren	-	100 µL	-
Proben	-	-	100 µL
Tracer	100 µL	100 µL	100 µL
Antiserum	-	100 µL	100 µL

- Mit dem Vortex-Mischer vorsichtig den Inhalt der Röhrchen **schütteln** und **eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren**.

Werden niedrige TLI-Werte erwartet (z.B. bei chronischer Pankreatitis), so kann die Sensitivität der Bestimmung durch Hinzufügen des Tracers 30 Minuten nach den anderen, bei Raumtemperatur aufbewahrten (30 Min. Vorinkubation + eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur) Reagenzien erhöht werden. Werden dagegen hohe TLI-Werte erwartet (z.B. bei akuter Pankreatitis), so empfiehlt man, die Proben 1:2 mit dem Nullkalibrator zu verdünnen (50 µL Probe + 50 µL Nullkalibrator).

- Das **Präzipitiermittel auf Raumtemperatur** bringen und durch wiederholtes Umkehren stark **schütteln**.
- **1 mL Präzipitiermittel** in alle Röhrchen (mit Ausnahme der Totalaktivität) **pipettieren**.
- Mit dem Vortex-Mischer vorsichtig den Inhalt der Röhrchen **schütteln** und **15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren**.
- Die Röhrchen bei 1500-2000 x g* 15 Min. **zentrifugieren**.
- **Den Überstand** durch Absaugen oder Dekantieren **eliminieren**. Wenn Absaugen vorgezogen wird, vermeiden, das Präzipitat zu berühren. Wird Dekantieren vorgezogen, so sind die Röhrchen umzukehren und auf Filterpapier abtropfen zu lassen.
- **Die Radioaktivität** des Präzipitats **messen**.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (\text{U/min})^2$$

7. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mittlere Nettozählrate für jede Röhren-Gruppe ausrechnen. Die Bindungsfähigkeit nach folgender Formel ausrechnen:

$$(B/T)_0\% = \frac{\text{Mittlere Zählrate des Nullkalibrators}}{\text{Mittlere Zählrate der Totalaktivität}} \times 100$$

Die mittlere Nettozählrate von Proben und Kalibratoren ausrechnen. Den B/Bo%-Quotienten nach folgender Formel ausrechnen:

$$B/Bo\% = \frac{\text{Mittlere Zählrate von Kalibratoren oder Proben}}{\text{Mittlere Zählrate des Nullkalibrators}} \times 100$$

Auf linear-linearem oder halblogarithmischem Papier die mittlere Prozentwerte jedes Kalibrators auf der Ordinate (y-Achse) in Funktion zur TLI-Konzentration ausgedrückt in ng/ mL auf der Abszisse (x-Achse) auftragen. Durch Verbinden der Punkte wird eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 2). Die Konzentrationen von TLI von jeder Probe, ausgedrückt in ng/mL, direkt von der Kalibrationskurve ablesen. Werte verdünnter Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Berechnungsbeispiel

Nachfolgende Daten gelten lediglich als Beispiel und dürfen nicht zur Ermittlung der tatsächlichen Ergebnisse benutzt werden.

Beschreibung	cpm	B/Bo x 100
Totalaktivität	20.540	–
Nullkalibrator	11.235	100
5 ng/mL	9.830	87,5
10 ng/mL	8.898	79,2
30 ng/mL	6.348	56,5
80 ng/mL	3.876	34,5
200 ng/mL	2.326	20,7
400 ng/mL	1.626	14,5
Probe	6.680	59,5

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die Probe einen TLI-Wert von 26 ng/mL gefunden.

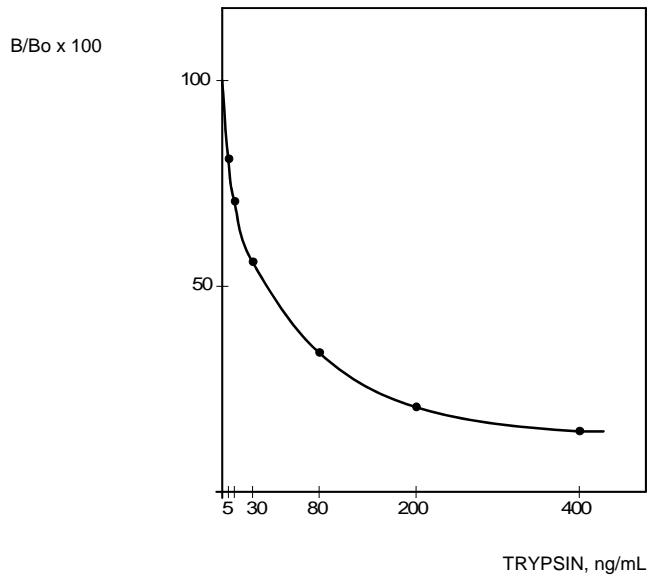


Abb. 2

8. ERWARTETE WERTE

Die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte besitzen ausschließlich indikativen Charakter. Jedem Laboratorium wird empfohlen, eigene Referenzbereiche festzusetzen.

Gruppe	TLI, ng/mL	
	Mittelwert \pm Standardabweichung	Intervall
Normal	32,0 \pm 10,9	10 - 57
Chronische Pankreatitis	16,5 \pm 12,9	< 1,5 - 47
Akute Pankreatitis	350 \pm 260	92 - 850
Totale Pankreatektomie	< 1,5	–

9. TESTMERKMALE

9.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potentiellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix (z.B. Antikoagulanten, Hämolyse, Effekte der Proben-Behandlung) oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Analyten.

Interferenzen. Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch EDTA, Hämolyse (bis 1000 mg/dL Hämoglobin), Lipämie (bis 500 mg/dL Triglyzeride), Bilirubinämie (bis 20 mg/dL Bilirubin) oder einmaliges Tiefgefrieren der Proben beeinflusst werden. TLI-Werte, die mit Heparin oder Zitrat gewonnenen Proben erzielt wurden, sind etwa 10% niedriger als TLI-Werte, die mit Serumproben erzielt wurden.

Kreuzreaktionen. Das radioimmunologische System des Kits wurde dank der Spezifität gegenüber Substanzen charakterisiert, die mit dem kathodischen Trypsin in Beziehung stehen. Das Bestehen einer kompletten Diskriminierung von Rindertrypsin, von unerheblichen Interferenzen mit den anodischen Sorten und einer hohen Kreuzreaktion mit kathodischem Trypsinogen wurde abgeleitet.

9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität kann auch als Nachweisgrenze ausgedrückt werden, d.h. die minimale Quantität des Analyten, die durch den Test bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze ist 2,5 ng/mL bei einer Konfidenz-Grenze von 95%. Sie wurde als die scheinbare Analyt-Konzentration berechnet, die man vom Nullkalibrator unterscheiden kann, d.h. zwei Standardabweichungen unter dem Nullkalibrator.

9.3. Präzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision des Tests (d.h. Intra- und Inter-Assay) wurden verschiedene Probenpools unterschiedlicher Analyt-Konzentrationen untersucht.

Wiederholpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	20	20	20
Mittelwert (ng/mL)	10,10	45,10	97,60
Standardabweichung	0,55	2,50	7,10
Variationskoeffizient (%)	5,40	5,50	7,30

Vergleichpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (ng/mL)	10,70	46,20	101,20
Standardabweichung	0,75	3,50	9,70
Variationskoeffizient (%)	7,00	7,60	9,60

9.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde mit dem Verdünnungstest geprüft. Der Wiederfindungstest hat in heterologischen Systemen, wie dieses (Sortenunterschied zwischen dem Kalibrator und dem Analyten), geringe Bedeutung. In diesem besonderen Fall entzieht sich der Trypsin-Kalibrator der radioimmunologischen Messung, da er mit in der Probe vorhandenen Inhibitorsystemen nicht-immunreaktive Komplexe bildet.

Verdünnungstest. Es wurde eine Probe mit hoher Trypsin-Konzentration nach serieller Verdünnung mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	Erwartete Konzentration, ng/mL	Erhaltene Konzentration, ng/mL	% Wiederfindung
leer	–	226,9	–
1:2	113,5	119,8	105,6
1:4	56,7	61,7	108,8
1:8	28,4	34,7	122,3
1:16	14,2	19,2	135,4
1:32	7,1	9,4	132,6

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Diagnose darf nicht auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden, sondern muss zusammen mit anderen klinischen Untersuchungen, Diagnoseverfahren und nach dem Urteil des Arztes erfolgen.

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholte Tiefgefrieren- und Auftauen-Zyklen können die Ergebnisse der Bestimmung ändern.

Die einwandfreie Beherrschung der Arbeitstechnik und die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung sind Voraussetzung für die Erzielung zuverlässiger Ergebnisse. Auf präzise Herstellung und Verteilung der Reagenzien und gutes Pipettieren und gründliches Absaugen oder Dekantieren ist zu achten.

Nicht wiederholbare Proben können folgende Ursachen haben:

- Vertauschen der Fläschchenverschlüsse.
- Verwendung derselben Pipettenspitze beim Pipettieren aus verschiedenen Reagenzfläschchen oder beim Pipettieren unterschiedlicher Proben.
- Aufbewahren der Reagenzien oder Proben bei hohen Temperaturen ($> 25^{\circ}\text{C}$) und bakterielle Kontamination.
- Bakterielle Kontamination durch zu langes Offenlassen der Fläschchen.
- Unzureichendes Absaugen oder Dekantieren der Inkubationsmischung.
- Kontamination der Röhrchenränder durch Tracer oder Proben.
- Schlechte Detektorstandardisierung und fehlerhafte Bedienung des Counters.
- Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.

11. WARNUNGEN

Nur für *In-vitro* Diagnostik.

Alle für die Herstellung der Kit-Komponenten benutzten Serum- und Plasmaproben wurden analysiert und als nichtreaktiv für HBsAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 befunden. Da jedoch kein Prüfverfahren Keimfreiheit wirklich garantieren kann, sollten alle Präparate menschlicher Herkunft als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend vorsichtig behandelt werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind im Labor verboten.
- Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.
- Der direkte Kontakt mit potentiell infiziertem Material ist durch das Tragen von Laborkitteln, Schutzbrille und Einweghandschuhen zu vermeiden. Nach Beendigung des Tests sollten die Hände gründlich gewaschen werden.
- Verspritzen oder Bildung von Aerosol sind zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien sollten mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lösung entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um potentiell infektiöses Material handeln kann.
- Alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Die Beseitigung des Abfalls ist nach den Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörde sowie nach den Anweisungen des verantwortlichen Amtes durchzuführen. Abfall sollte verbrannt werden. Flüssigkeiten müssen mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Dabei sollte das Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5% im Endgemisch vorliegen und mindestens 30 Minuten auf die zu beseitigenden Materialien einwirken. Alle Materialien, die wieder verwendet werden sollen, müssen mit einer übertriebenen (*overkill*) Methode (USP 24, 2000, S. 2143) autoklaviert werden. Im Allgemeinen wird eine Stunde bei 121°C als angebrachte Sterilisationszeit angesehen, dennoch wird jedem Benutzer empfohlen, die Wirksamkeit des Dekontaminationszyklus anfangs zu überprüfen und routinemäßig biologische Indikatoren einzusetzen.

13. GRUNDREGELN DES STRAHLENSCHUTZES

Reagenzien mit Jod-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens $1,5 \mu\text{Ci}$ (55 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische *In-vitro*-Tests oder *In-vitro*-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unter-liegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

TRYPSTIK PIPETTIERSCHEMA

BITTE SORGFÄLTIG DIE GEBRAUCHSANLEITUNG BEACHTEN.

KALIBRATOREN, PROBEN, TRACER, ANTISERUM	100 µL
---	--------



INKUBATION: EINE Std. BEI RAUMTEMPERATUR.



PRÄZIPITIERMITTEL	1 mL
-------------------	------



INKUBATION: 15 Min. BEI RAUMTEMPERATUR.



15 Min. ZENTRIFUGIEREN.



ÜBERSTAND ELIMINIEREN.



RADIOAKTIVITÄT DES PRÄZIPITATS MESSEN.

KIT PARA LA DETERMINACIÓN RADIOINMUNOLÓGICA DE LA TRIPSINA

Procedimiento para el análisis cuantitativo de la tripsina inmunorreactiva (TLI) en muestras de suero o plasma humano

1. INTRODUCCIÓN

Sustancias mensurables

En un principio, se creía que la tripsina era el tipo de molécula que se medía realmente en un sistema de análisis radioinmunológico que utiliza tripsina como inmunógeno, calibrador y material para marcar. Otros ensayos han identificado finalmente la sustancia analizada en este sistema RIA como tripsinógeno catódico, es decir, el precursor inactivo de la enzima. Cabe destacar que la tripsina circulante, en caso de que la hubiera, escaparía a la detección del RIA debido a la formación de complejos no inmunorreactivos con inhibidores del suero (es decir, alfa₂-macroglobulina).

La expresión de los datos analíticos como concentración equivalente de tripsina (es decir, ng/mL de tripsina o, en concreto, de tripsina catódica) ha sido utilizada hasta ahora por todos los investigadores implicados, incluyendo los autores que identificaron por primera vez el analito como tripsinógeno. Esta forma de expresar los datos continúa considerándose totalmente aceptable en términos de coherencia analítica. La Fig. 1 muestra la correlación lineal de las respuestas obtenidas utilizando el tripsinógeno catódico y la tripsina como calibrador, ofreciendo la posibilidad de realizar una conversión entre los dos sistemas unitarios. Normalmente, la sustancia medida se denomina tripsina inmunorreactiva (TLI).

El uso del sistema RIA de la tripsina para determinar el tripsinógeno está justificado por el hecho de que la enzima sólo puede ser purificada de forma efectiva mediante una cromatografía de afinidad con Trasylol.

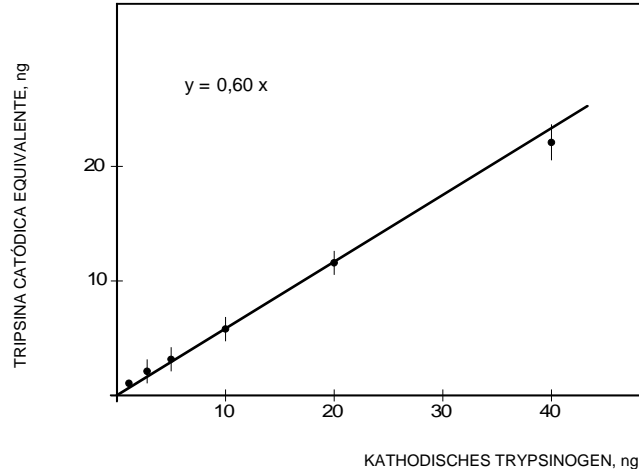


Fig. 1: Comprobación de la equivalencia inmunológica entre la tripsina y el tripsinógeno catódicos. Los datos hacen referencia a la media \pm D.E. registrada en los 5 ensayos independientes.

Características bioquímicas

El tripsinógeno es una proenzima que se sintetiza en las células acinares exocrinas del páncreas y se acumula en el núcleo de las células pancreáticas. Existen dos formas de tripsinógeno que dan lugar a dos isoenzimas distintas de la tripsina. Estas sustancias se denominan tripsinógeno *catódico* y *anódico* y tripsina *catódica* y *anódica*, según sus respectivos comportamientos electroforéticos.

El tripsinógeno tiene un peso molecular de 24.000 daltons y está compuesto por una única cadena de 229 residuos de aminoácidos. Cuando las proenzimas son secretadas en el tracto gastrointestinal, éstas pasan a sus formas activas mediante una escisión hidrolítica selectiva de uno o más enlaces peptídicos en la molécula de la proenzima. El tripsinógeno se convierte en tripsina activa en el lumen intestinal mediante la eliminación de un hexapéptido del extremo N-terminal a través de la acción de la enzima proteolítica enterocinasa.

Importancia clínica

La importancia clínica de un ensayo de la TLI en el suero reside en el hecho de que, siendo sintetizada únicamente por las células acinares pancreáticas, se considera un indicador específico de un daño pancreático, a diferencia de las enzimas alfa-amilasa y lipasa utilizadas habitualmente en los diagnósticos pancreáticos. Esta observación está respaldada por el hecho de que los pacientes que han sido sometidos a una pancreatometomía total presentan niveles de TLI iguales a cero, aunque sus valores de alfa-amilasa se encuentran dentro de los intervalos normales.

Dado que resulta imposible medir la actividad enzimática de la TLI en el suero, debido a la presencia de muchos inhibidores, la disponibilidad de un sistema RIA fiable para la determinación de la TLI en el suero resulta de gran interés.

En el caso de la **pancreatitis aguda**, los niveles de TLI alcanzan un valor máximo de cinco a diez veces mayor que el límite normal superior y permanecen así durante cuatro o cinco días después de la aparición del dolor abdominal. No se ha observado nunca un solapamiento de estos niveles elevados con los niveles normales, considerando que los pacientes afectados por una falla renal crónica grave (excreción disminuida de TLI) no se tienen en cuenta. Por lo tanto, a la hora de interpretar los valores altos se valora el estado renal de los pacientes.

Hasta ahora no se disponía de ningún test en el suero para diagnosticar la **pancreatitis crónica**. Dado que aparece la atrofia de células acinares pancreáticas en esta enfermedad, aproximadamente el 50% de los pacientes muestran un nivel de tripsina por debajo del nivel normal inferior.

El ensayo de la TLI ha sido propuesto como test de selección para el diagnóstico precoz de la **fibrosis quística en neonatos**. Los niveles de TLI aumentan de forma significativa en las primeras fases de la fibrosis quística y caen hasta niveles por debajo de lo normal a medida que la enfermedad avanza.

Se han observado niveles de TLI anormalmente bajos en pacientes con **diabetes**.

Asimismo, los pacientes que sufren un **carcinoma pancreático** parecen presentar niveles de TLI anormales.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El principio del ensayo está basado en la competición entre TLI marcada y TLI contenida en los calibradores o en las muestras a analizar para un número fijo y limitado de sitios de enlace en los anticuerpos. Después de la incubación, la cantidad de TLI marcada enlazada al anticuerpo está inversamente relacionada con la concentración de TLI no marcada presente en los calibradores o en las muestras. El método adoptado para la separación libre/enlazado está basado en el empleo de un reactivo precipitante en el que un segundo anticuerpo se precipita previamente y está presente en exceso.

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Tripsina catódica marcada con ¹²⁵ I	1 vial
Antisuero de tripsina catódica	1 vial
Calibrador cero	1 vial
Calibradores de tripsina catódica	6 viales
Suero de control	1 vial
Reactivo precipitante	2 viales
Número de ensayos	100

MODO DE CONSERVACIÓN: A su llegada, conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 4 sesiones analíticas si se utiliza a lo largo del día a temperatura ambiente y si se conserva durante la noche a 2-8°C.

No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.

Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma.

No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.

3.1. Tripsina catódica marcada con ¹²⁵I: reactivo liofilizado

El vial contiene tripsina catódica marcada con ¹²⁵I, albúmina sérica bovina, tampón fosfato y conservantes. La radioactividad máxima es de 57 kBq (1,55 µCi) en la fecha de calibración.

Reconstituya el contenido del vial con 10 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante tres semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

3.2. Antisuero de tripsina catódica: reactivo liofilizado

El vial contiene antisuero producido en conejos anti-tripsina catódica humana, albúmina sérica bovina, tampón fosfato y conservantes.

Reconstituya el contenido del vial con 10 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante tres semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

3.3. Calibrador cero: reactivo listo para el uso

El vial contiene 10 mL de suero bovino y conservantes.

3.4. Calibradores de tripsina catódica: reactivo liofilizado

Los viales contienen cantidades crecientes de tripsina catódica, albúmina sérica bovina y conservantes. Reconstituya el contenido de los viales de los calibradores 1-6 con 1 mL de calibrador cero. Las soluciones que resultan contienen 5 - 10 - 30 - 80 - 200 - 400 ng/mL de tripsina respectivamente y son estables durante tres semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada. *Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.*

3.5. Suero de control: reactivo liofilizado

El vial contiene tripsina catódica, suero humano y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 1 mL de agua destilada. Conserve la solución que resulta en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores.

3.6. Reactivo precipitante: reactivo listo para el uso

Cada vial contiene 53 mL de polietilenglicol, tampón TRIS (tris-hidroximetil-aminometano), anticuerpos contra la IgG de conejo producidos en cabras, IgG de conejo no específica y conservantes.

4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Tubos de poliestireno desechables.
- Micropipetas con puntas desechables de 100 y 1000 µL (veracidad ± 2%, precisión 1%).
- Gradillas para tubos.
- Agitador Vórtex.
- Centrifugadora para múltiples muestras capaz de llegar a las 1500-2000 x g*.
- Aspirador de agua (facultativo).

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

- Contador gamma para contar el yodo ^{125}I (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo se puede efectuar en muestras de suero o plasma humano. Se puede utilizar el anticoagulante EDTA (consulte el apartado 9.1 para obtener más información sobre la heparina y el citrato. No utilice oxalato). Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de las 24 horas sucesivas a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones. *No debe utilizar suero descomplementado.*

6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen. Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción.

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Actúe según el siguiente esquema:

reactivos \ tubos	Actividad total	Calibradores 0-6	Muestras
Calibradores	-	100 µL	-
Muestras	-	-	100 µL
Trazador	100 µL	100 µL	100 µL
Antisuero	-	100 µL	100 µL

- **Agite** el contenido de los tubos en el Vórtex e **incube durante una hora a temperatura ambiente**. *Si espera obtener niveles bajos de TLI (por ejemplo, en el caso de la pancreatitis crónica), se puede aumentar la sensibilidad añadiendo el trazador 30 min después del resto de los reactivos conservados a temperatura ambiente (30 min de preincubación + una hora de incubación a temperatura ambiente). A la inversa, si se espera obtener niveles altos de TLI (por ejemplo, en el caso de la pancreatitis aguda), se sugiere que diluya las muestras en una proporción 1:2 con el calibrador cero (50 µL de muestra + 50 µL de calibrador cero).*
- Deje que el vial del **reactivo precipitante alcance la temperatura ambiente** y **agítelo** bien inclinándolo repetidas veces hacia atrás y hacia adelante.
- **Distribuya 1 mL del reactivo precipitante** en todos los tubos (excepto de los tubos para la actividad total).
- **Agite** el contenido de los tubos en el Vórtex y **incube durante 15 min a temperatura ambiente**.
- **Centrifugue** todos los tubos durante 15 min a 1500-2000 x g*.
- **Deseche el sobrenadante** mediante aspiración o decantación. A la hora de aspirar, evite mover el precipitado. A la hora de decantar, permita que los tubos se vacíen colocándolos hacia abajo sobre un papel secante.
- **Mida la radioactividad** del precipitado.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber sustraído el valor del fondo. Evalúe la capacidad de enlace de la siguiente manera:

$$(B/T)_0\% = \frac{\text{cómputo medio del calibrador cero}}{\text{cómputo medio de la actividad total}} \times 100$$

Expresé la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje del cómputo medio del calibrador cero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{cómputo medio de calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio del calibrador cero}} \times 100$$

Indique en un gráfico lineal-lineal o semilog el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de TLI expresada en ng/mL en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 2). Lea directamente de la curva de calibración la concentración de TLI de cada muestra expresada en ng/mL. Si la muestra ha sido diluida, la concentración de TLI encontrada debe ser multiplicada por el factor de dilución.

Ejemplo de cálculo

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/Bo x 100
Actividad total	20.540	–
Calibrador cero	11.235	100
5 ng/mL	9.830	87,5
10 ng/mL	8.898	79,2
30 ng/mL	6.348	56,5
80 ng/mL	3.876	34,5
200 ng/mL	2.326	20,7
400 ng/mL	1.626	14,5
Muestra	6.680	59,5

Interpolando de la curva de calibración, la muestra contiene 26 ng/mL de TLI.

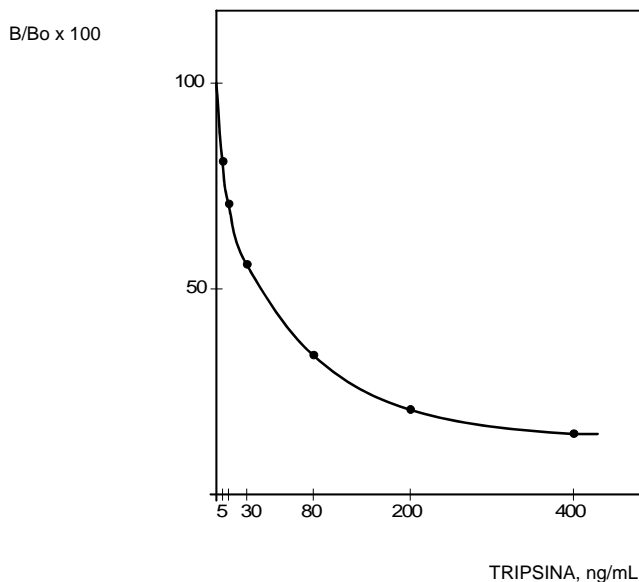


Fig. 2

8. DATOS CLÍNICOS

Los valores que se indican a continuación son exclusivamente indicativos. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.

Sujetos	TLI, ng/mL	
	Media \pm D.E.	Intervalo
Controles normales	32,0 \pm 10,9	10 - 57
Pancreatitis crónica	16,5 \pm 12,9	< 1,5 - 47
Pancreatitis aguda	350 \pm 260	92 - 850
Pancreatectomía total	< 1,5	-

9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemólisis, efectos de tratamientos de la muestra), o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

Interferencias. Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por EDTA, hemólisis (hasta 1000 mg/dL de hemoglobina), lipemia (hasta 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina) o por una congelación de las muestras. Los valores de TLI hallados en las muestras de plasma obtenidas con heparina o citrato son aproximadamente un 10% inferior a los valores hallados en las muestras de suero.

Reacciones cruzadas. El sistema RIA se caracteriza por su especificidad con respecto a sustancias relacionadas con la tripsina. Se observa una discriminación completa de la tripsina bovina, interferencias insignificantes con las sustancias anódicas y una gran reactividad cruzada con el tripsinógeno catódico.

9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 2,5 ng/mL al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero, es decir, dos desviaciones estándar por debajo de cero.

9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes concentraciones de analito.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	20	20	20
Media (ng/mL)	10,10	45,10	97,60
Desviación estándar	0,55	2,50	7,10
Coefficiente de variación (%)	5,40	5,50	7,30

Reproducibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media (ng/mL)	10,70	46,20	101,20
Desviación estándar	0,75	3,50	9,70
Coefficiente de variación (%)	7,00	7,60	9,60

9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante el test de dilución. El test de recuperación no tiene mucho sentido en sistemas heterólogos (el calibrador y el analito son diferentes). En este caso en particular, el calibrador de tripsina no puede recuperarse, dado que forma complejos no inmunorreactivos con los sistemas inhibidores presentes en la muestra desconocida.

Test de dilución. Se han determinado diluciones en serie de un suero de concentración elevada de tripsina realizadas en el calibrador cero.

Dilución	Concentración esperada, ng/mL	Concentración medida, ng/mL	% Recuperación
no diluido	–	226,9	–
1:2	113,5	119,8	105,6
1:4	56,7	61,7	108,8
1:8	28,4	4,7	122,3
1:16	14,2	19,2	135,4
1:32	7,1	9,4	132,6

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración y trasvase son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración o trasvase inadecuado de la mezcla de incubación
- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

12. NORMAS DE SEGURIDAD

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 1,5 μCi (55 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

ESQUEMA DEL ENSAYO

- 1 - RECONSTITUYA LOS REACTIVOS.
- 2 - MARQUE LOS TUBOS DE ENSAYO POR DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS	TUBOS	T	CAL 0-6	MUESTRAS
CALIBRADORES		–	100 µL	–
MUESTRAS		–	–	100 µL
TRAZADOR		100 µL	100 µL	100 µL
ANTISUERO		–	100 µL	100 µL

- 4 - INCUBE DURANTE UNA HORA A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 5 - AÑADA 1 mL DE REACTIVO PRECIPITANTE A TODOS LOS TUBOS (excepto de los tubos para la actividad total) Y AGÍTELO BIEN.
- 6 - INCUBE DURANTE 15 MIN A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 7 - CENTRIFUGUE DURANTE 15 MIN A 1500-2000 x g*.
- 8 - DESECHE EL SOBRENADANTE.
- 9 - MIDA LA RADIOACTIVIDAD DEL PRECIPITADO.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA

T.E. ADRIAN et al.

Plasma trypsin in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma.
Clin. Chim. Acta, 97 : 205 (1979).

A. ANDRIULLI et al.

Clinical evaluation of serum cationic trypsin-like immunoreactivity in patients with different pancreatic diseases.
Ital. J. Gastroenterol., 12 : 260 (1980).

A. ANDRIULLI et al.

Circulating trypsin-like immunoreactivity in chronic pancreatitis.
Dig. Dis. Sci., 26 : 532 (1981).

J.R. CROSSLEY, R.B. ELLIOT, P.A. SMITH

Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots.
Clin. Chim. Acta, 113 : 111 (1981).

P. DANDONA, E. ELIAS, A.G. BECKETT

Serum trypsin concentrations in diabetes mellitus.
Brit. Med. J., 2 : 1125 (1978).

D.R. GAMBLE, A. MOFFAT, V. MARKS

Serum immunoreactive trypsin concentrations in infectious and non-infectious illnesses and in juvenile diabetes.
J. Clin. Path., 32 : 897 (1979).

M.C. GEOKAS et al.

Determination of human pancreatic cathodic trypsinogen in serum by radioimmunoassay.
Am. J. Physiol., 236 : E77 (1979).

A.F. HEELEY

Screening for cystic fibrosis in the newborn using a dried blood disc I.R.T. assay.
The Proceedings of the First U.K. Symposium on Neonatal Screening for Cystic Fibrosis, held at the Royal Society of Medicine, London, on 5th November 1980, p. 21.

L.T. KIRBY et al.

Use of a dried blood spot in immunoreactive trypsin assay for detection of cystic fibrosis.
Clin. Chem., 27 (5) : 678 (1981).

G. LAKE-BAKAAR, S. MCKAVANAGH, J.A. SUMMERFIELD

Urinary immunoreactive trypsin excretion: a non-invasive screening test for pancreatic cancer.
Lancet, ii : 878 (1979).

G. LAKE-BAKAAR

Measurement of trypsin in duodenal juice by radioimmunoassay.
Gut, 21 : 402 (1980).

R. MALVANO

Radioimmunoassay of circulating trypsin-like immunoreactivity: methodological aspects.
The Proceedings of the First U.K. Symposium on Neonatal Screening for Cystic Fibrosis, held at the Royal Society of Medicine, London, on 5th November 1980, p. 6.

S. RECCHIA et al.

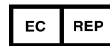
A comparative evaluation of two commercial RIA kits for trypsin-like immunoreactivity.
J. Nucl. Med. All. Sci., 24 (3-4) : 197 (1980).

Serum Immunoreactive Trypsin

Reports from the International Symposium Advances in the Diagnosis and in the Therapy of Pancreatic Diseases, G. Labò, P. Vezzadini eds.
Scand. J. Gastroenterol., 15 : Suppl. 62 (1980).



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.
Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

APM0137

34664 7/10