



# Trypsin RIA

***KIRCE07***

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# **History**

---

## **Summary of change:**

<b>Current Version:</b>
<b>230123</b>
New logo

en

Read entire protocol before use.

# Trypsin RIA

## I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the quantitative determination of human trypsin (h trypsin) in serum.

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

## II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource Trypsin RIA Kit
- B. Catalog number : KIRCE07 : 100 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2 , 1348 Louvain-La-Neuve , Belgium

**For technical assistance or ordering information contact :**  
Tel : +32 (0) 10 84 99 00              Fax : +32 (0) 10 84 99 90

## III. BACKGROUND

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

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

Some trypsin appears to be excreted intact from the gut, as it can be detected and measured in stool. In addition, the trypsinogen, trypsin and probably trypsin bound to a pancreatic inhibitor may find their way from the pancreatic cells into the blood via the interstitial fluid. In blood all trypic activity is blocked by three specific inhibitors ( $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 2-macroglobulin and inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor). Nevertheless, normal serum still retains some proteolytic activity as shown by the hydrolysis of synthetic substrates, but this cannot be due solely to trypsin.

#### **IV. PRINCIPLES OF THE METHOD**

Trypsin can be measured in duodenal or pancreatic juice by spectrophotometric methods, which depend upon its ability to hydrolyze synthetic substrates. However, as the trypsins are inactive and the enzymatic activity of trypsin in serum is blocked by the inhibitors mentioned above, this approach cannot be used to determine blood levels of the enzyme.

If the immunological rather than the enzymatic properties of trypsin could be used in a method for its determination in serum, the foregoing problem would not arise.

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

During the first incubation, serum trypsin and  $^{125}\text{I}$ -labelled trypsin compete for highly specific antibodies against trypsin, with the result that  $^{125}\text{I}$ -labelled trypsin is bound to the antibodies in inverse proportion to the amount of serum trypsin present.

During the second incubation the trypsin or 125I-trypsin antibody complex reacts with an anti-rabbit-gamma globulin, causing precipitation. The precipitate can be centrifuged down, the supernatant decanted and the iodine-125 activity in the precipitate measured in a gamma scintillation counter. The activity measured is compared with a calibrator curve prepared under the same conditions and provides an indication of the trypsin concentration in the serum.

## V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Reconstitution		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>Ag</td><td><math>^{125}\text{I}</math></td></tr></table> $^{125}\text{I}$ odine labelled human trypsin	Ag	$^{125}\text{I}$	1 vial <95 kBq 22 ml	<b>Ready</b> for use
Ag	$^{125}\text{I}$			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrator 0: in horse serum and sodium azide.	CAL	0	1 vial Lyophilized	<b>Add</b> 0.5 ml distilled water
CAL	0			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators 1-6: in horse serum and sodium azide (see exact values on vial labels)	CAL	N	6 vials Lyophilized	<b>Add</b> 0.5 ml distilled water
CAL	N			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Control in human serum and sodium azide. (see exact value on vial label)	CONTROL	N	1 vial 0.5 ml	<b>Ready</b> for use
CONTROL	N			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>ANTISERUM</td><td></td></tr></table> Rabbit anti human trypsin in buffer with bovine albumin and sodium azide.	ANTISERUM		1 vial 10.5 ml	<b>Ready</b> for use
ANTISERUM				
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table> Precipitation reagent: buffer with goat anti-rabbit IgG , bovine albumin and sodium azide.	PREC	AGENT	1 vial 55 ml	<b>Ready</b> for use
PREC	AGENT			

#### **VI. SUPPLIES NOT PROVIDED**

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

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

  1. Distilled water: for reagents reconstitution and for washing step.
  2. Pipettes for delivery of 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l and 500 $\mu$ l (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended).
  3. Incubation tubes 3 to 5ml ; e.g.: polystyrene tubes 12 x 75 mm.
  4. Vortex mixer.
  5. 1 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing.
  6. Aspiration system.
  7. Centrifuge  $\geq$  1500 g.
  8. Any gamma counter capable of measuring  $^{125}\text{I}$  may be used (minimal yield 70%).

## VII. REAGENT PREPARATION

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

#### **VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS**

- Before opening, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
  - After its first use, tracer is stable, if kept in the original well-closed vial at 2-8°C until the tracer expiry date.
  - Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

## *IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION*

After blood sampling, serum is obtained by the usual methods. It is pipetted off, assayed directly or stored up to 3 days at 2-8°C for later use, or alternatively frozen at -20°C.

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

## X. PROCEDURE

#### A. Handling notes

**Handling note:**  
Do not use the kit or components beyond expiry date.  
Do not mix materials from different kit lots.

Do not mix materials from different kit lots.  
Bring all other reagents to room temperature (18-25 °C) prior to use.  
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.  
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.  
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

## B. Procedure

- 2. Procedure**

  - 1- It is recommended to perform the assays in duplicate for the calibrators, the control and the samples.
  - 2- Label sufficient incubation tubes (3-5 mL), as given in *VI. Supplies not provided*. (calibrators, control serum, serum samples and "total activity" tubes).
  - 3- Pipette 100 µL calibrators, control serum and serum samples into test tubes that have been prepared.
  - 4- Dispense 200 µL  $^{125}\text{I}$ -trypsin into each test tube (including "total activity" tubes).
  - 5- Dispense 100 µL Antiserum into each test tube (excluding "total activity" tubes), mix the contents of the tubes on the vortex mixer, and incubate for 3h (3-5h) at room temperature (18-25 °C) away from direct light.
  - 6- Dispense 500 µL Precipitation reagent into each test tube (excluding "total activity" tubes), mix the contents of the tubes on the vortex mixer, and incubate for 30 min (30-60 min) at room temperature (18-25 °C) away from direct light.
  - 7- Dispense 1 mL distilled water into each test tube (excluding "total activity" tubes), centrifuge the tubes at  $\geq 1500$  g for 15 min at 20 °C and decant the supernatants.
  - 8- Measure the test tubes for 1 minute in a gamma scintillation counter.

## XI CALCULATION OF RESULTS

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

The calibrators and control values are assigned against normalized reference controls and the value of previous batch of calibrators and control.

reference controls and the value of previous batch of calibrators and control. The trypsin control serum included in the kit provides an analytical means checking the accuracy of the assay procedure performed in the laboratory. In order to establish the calibration curve, the following procedure must be followed:

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
  2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Plot the (B/B<sub>0</sub>(%)) values for each calibrator point as a function of trypsin concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B<sub>0</sub> (%)) values, determine trypsin concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled trypsin (B<sub>0</sub>/T) must be checked.

## XII. TYPICAL CALIBRATION CURVE

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

Trypsin RIA		cpm	B/B <sub>0</sub> (%)
Total count		29722	
Calibrator	0.0 ng/ml	15091	100
	36 ng/ml	13067	86.6
	73 ng/ml	11503	76.2
	160 ng/ml	9242	61.2
	300 ng/ml	6904	45.7
	630 ng/ml	4900	32.5
	1560 ng/ml	3842	26.5

## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### B. Detection limit

The LoB (Limit of blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean + 1.65 standard deviation of the distribution of the test values . The LoB was calculated to be 4 ng/ml.

### B. Interferences

No interference has been observed :  
with haemoglobin up to 5 g/l ,  
with triglycerides up to 2.5 g/l ,  
with bilirubin non conjugated up to 1 g/l ,  
with conjugated bilirubin up to 0.5 g/l.

### C. Precision

INTRA ASSAY			
Sample	Replicate	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	$382.9 \pm 25.6$	6.7
B	20	$230.3 \pm 16.2$	7.0

INTER ASSAY			
Sample	Replicate	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)
1	10	$151.6 \pm 7.5$	4.9
2	10	$406 \pm 30.9$	7.6

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

## XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

If the results obtained for the kit control are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.

Acceptance criteria for the difference between the duplicates results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

## XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

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

## XVI. BIBLIOGRAPHY

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

**XVII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	TOTAL COUNTS	CALIBRATORS CONTROL	SAMPLES
	µl	µl	µl
Calibrators/control Samples	-	100	-
Tracer : $^{125}\text{I}$ human Trypsin:	200	200	200
Antiserum	-	100	100
Incubation	Vortex tubes. Incubate 3 hours at 18-25°C.		
Precipitation reagent	-	500	
Incubation	Vortex tubes. Incubate for 30 minutes at 18-25°C.		
Washing step	-	Add 1.0 ml distilled water	
Centrifugation	-	Centrifuge for 15 minutes at $\geq 1500\text{g}$ , at 20°C. Decant the supernatant.	
Counting	Count tubes for 1 minute		

Lire l'intégralité du protocole avant utilisation.

# Trypsin RIA

## I. UTILISATION PRÉVUE

Dosage radioimmunologique pour la détermination quantitative de la trypsine humaine (trypsine h) dans le sérum.  
**Réservé à la recherche uniquement. Ne convient pas pour les procédures de diagnostic.**

## II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

A. Nom de spécialité : Trousse DIAsource Trypsin RIA

B. Numéro de référence : KIRCE07 : 100 tests

C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgique

Pour une assistance technique ou des renseignements sur les commandes, contacter :

Tél. : +32 (0) 10 84 99 00                  Fax : +32 (0) 10 84 99 90

## III. CONTEXTE

La trypsine est l'une des enzymes impliquées dans la digestion des protéines alimentaires dans l'intestin grêle. Elle fonctionne comme une endopeptidase avec une spécificité préférentielle marquée vis-à-vis des liaisons peptidiques issues des groupements carbonyles des résidus L-arginyle et L-lysyle. Du point de vue chimique, la trypsine est une protéine composée de 201 acides aminés avec un poids moléculaire de 22 900 Da.

Comme d'autres enzymes protéolytiques d'origine pancréatique, la trypsine est synthétisée et sécrétée dans les cellules acineuses du pancréas exocrine sous forme de précurseur ou proenzyme inactive, le trypsinogène. Cela se produit sous deux formes, qui sont toutes deux converties en trypsine enzymatiquement active par l'action de l'entérokinase formée dans les cellules du duodénum. Cette kinase, en présence d'ions Ca<sup>++</sup>, détache l'hexapeptide Val-(Asp)4-Lys du trypsinogène, libérant ainsi le centre biologiquement actif de la molécule de trypsine masqué jusque-là. La trypsine peut en outre activer le trypsinogène par autocatalyse.

Une partie de la trypsine semble être excrétée telle quelle par l'intestin, car elle peut être détectée et mesurée dans les selles. De plus, le trypsinogène, la trypsine et probablement la trypsine liée à un inhibiteur pancréatique peuvent passer des cellules pancréatiques au sang par l'intermédiaire du liquide interstitiel. Dans le sang, toute activité trypsique est bloquée par trois inhibiteurs spécifiques ( $\alpha_1$ -antitrypsine,  $\alpha_2$ -macroglobuline et l'inhibiteur inter- $\alpha$ -trypsine). Une faible activité protéolytique se maintient toutefois dans le sérum normal, comme le révèle l'hydrolyse de substrat synthétique. Cette activité n'est cependant pas entièrement imputable à la trypsine.

#### IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

On peut doser la trypsine dans le suc duodénal ou pancréatique par des méthodes spectrophotométriques qui dépendent de sa capacité à hydrolyser les substrats synthétiques. Cependant, comme les trypsines sont biologiquement inactives et que l'activité enzymatique de la trypsine dans le sérum est bloquée par les inhibiteurs mentionnés ci-dessus, cette approche ne peut pas être utilisée pour déterminer les taux sanguins de l'enzyme.

Ce problème ne se pose néanmoins pas si l'on se sert des propriétés immunologiques de la molécule de trypsine au lieu de ses propriétés enzymatiques pour effectuer le dosage.

La trousse Trypsin permet le dosage radioimmunologique de l'enzyme trypsique dans le sérum humain et d'autres liquides biologiques. La trousse utilise le principe de l'analyse de la liaison protéique par compétition, en utilisant une méthode de dosage radioimmunologique par double anticorps, la trypsine libre étant séparée de la trypsine liée aux anticorps à l'aide d'un sérum précipitant anti-lapin.

Au cours de la première incubation, la trypsine sérique et la trypsine marquée au <sup>125</sup>I se fixent sur des anticorps hautement spécifiques de la trypsine, le degré de fixation de la trypsine marquée au <sup>125</sup>I aux anticorps étant inversement proportionnel à la trypsine sérique présente.

Au cours de la deuxième incubation, la trypsine ou le complexe d'anticorps <sup>125</sup>I-trypsine entre en réaction avec une globuline anti-lapin-gamma. Il se forme un précipité. Le précipité peut être centrifugé, le surnageant décanté et l'activité de l'iode-125 dans le précipité mesuré dans un compteur gamma à scintillation. L'activité mesurée est comparée à une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions et fournit une indication de la concentration de trypsine dans le sérum.

#### V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 100 tests	Reconstitution
Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">125I</span>	1 flacon <95 kBq 22 ml	Prêt à l'emploi
Trypsine humaine marquée à l'iode <sup>125</sup>		
CAL. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">0</span>	1 flacon Lyophilisé	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
Calibrateur 0 : dans un sérum de cheval et de l'azoture de sodium.		
CAL. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>	6 flacons Lyophilisé	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
Calibrateurs 1-6 : dans un sérum de cheval et de l'azoture de sodium (voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon)		
CONTROL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>	1 flacon 0,5 ml	Prêt à l'emploi
Contrôle dans un sérum humain et de l'azoture de sodium. (voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon)		
ANTISERUM	1 flacon 10,5 ml	Prêt à l'emploi
Sérum de lapin anti-trypsine humaine dans un tampon contenant de l'albumine bovine et de l'azoture de sodium.		
PREC <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AGENT</span>	1 flacon 55 ml	Prêt à l'emploi
Réactif précipitant : tampon avec IgG anti-lapin de chèvre, albumine bovine et azoture de sodium.		

#### VI. MATÉRIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis, mais non fourni avec la trousse :

1. Eau distillée : pour la reconstitution des réactifs et pour l'étape de lavage.
2. Pipettes pour distribuer 25 µL, 100 µL, 200 µL et 500 µL (l'utilisation de pipettes précises et d'embouts jetables en plastique est recommandée).
3. Éprouvettes d'incubation de 3 à 5 mL ; ex : tubes en polystyrène 12 x 75 mm.
4. Agitateur vortex.
5. Seringue automatique de 1 mL (type Cornwall) pour le lavage.

6. Système d'aspiration.

7. Centrifuge ≥ 1500 g.

8. Il est possible d'utiliser tout compteur gamma capable de doser le <sup>125</sup>I (rendement minimal 70 %).

#### VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Calibrateurs : Dissoudre soigneusement les calibrateurs dans de l'eau distillée en procédant comme suit : Tapoter doucement les flacons de calibrateur pour déloger toute particule pouvant adhérer au bouchon. Retirer ensuite délicatement les bouchons en les plaçant à l'envers sur le plan de travail. À l'aide d'une micropipette appropriée, verser précisément 500 µL d'eau distillée dans chaque flacon, replacer les bouchons et laisser environ 10 minutes pour que le matériau lyophilisé se dissolve complètement. La reconstitution et le mélange peuvent être accélérés en faisant tourbillonner le contenu et/ou en faisant rouler les flacons entre vos mains.

#### VIII. CONSERVATION ET DATES DE PÉREMPTION DES RÉACTIFS

- Avant ouverture, tous les composants des trousse sont stables jusqu'à leur date d'expiration mentionnée sur le flacon, s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C.
- Après sa première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est conservé entre 2 et 8 °C dans le flacon d'origine bien fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

#### IX. RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Lorsque des échantillons de sang ont été prélevés, le sérum est obtenu par les méthodes habituelles. Il est prélevé au moyen d'une pipette, dosé directement ou stocké jusqu'à 3 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C pour une utilisation ultérieure, ou bien congelé à -20 °C.

La trousse de dosage radioimmunologique Trypsin permet de mesurer la trypsine en tant que protéine dans le sérum et n'est pas affectée par la présence d'inhibiteurs sériques. Le dosage radioimmunologique est spécifique de la trypsine, du trypsinogène et des formes inhibées de l'enzyme.

#### X. MODE OPÉRATOIRE

##### A. Remarques concernant la manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants au-delà de la date d'expiration.

Ne pas mélanger de matériel provenant de trousse de lots différents.

Amener tous les autres réactifs à température ambiante (18-25 °C) avant utilisation.

Bien mélanger tous les réactifs et les échantillons en agitant ou en tournant doucement.

Utiliser un embout de pipette jetable propre pour l'ajout de chaque réactif et échantillon différent afin d'éviter toute contamination croisée. Des pipettes de grande précision ou un équipement de pipetage automatisé améliorent la précision.

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque passage ; ne pas utiliser les données de passages précédents.

##### B. Procédure

- 1- Il est recommandé d'effectuer les essais en double pour les calibrateurs, le contrôle et les échantillons.
- 2- Numéroter un nombre suffisant de tubes d'incubation (3 à 5 mL), comme indiqué dans VI. Matériel non fourni. (calibrateurs, sérum de contrôle, échantillons de sérum et tubes pour l'**« activité totale »**).
- 3- Prélever au moyen d'une pipette 100 µL de calibrateurs, de sérum de contrôle et d'échantillons de sérum dans des tubes préalablement préparés.
- 4- Distribuer 200 µL de <sup>125</sup>I-trypsiné dans chaque tube à essai (y compris ceux de l'activité totale).
- 5- Distribuer 100 µL d'antisérum dans chaque tube à essai (excepté ceux de l'activité totale), mélanger le contenu des tubes sur l'agitateur vortex, et incuber pendant 3 h (3 à 5 h) à température ambiante (18 à 25 °C) à l'abri de la lumière directe.
- 6- Distribuer 500 µL de réactif précipitant dans chaque tube à essai (excepté ceux de l'activité totale), mélanger le contenu des tubes sur l'agitateur vortex, et incuber pendant 30 min (30 à 60 min) à température ambiante (18 à 25 °C) à l'abri de la lumière directe.
- 7- Distribuer 1 mL d'eau distillée dans chaque tube à essai (excepté ceux de l'activité totale), centrifuger les tubes à ≥ 1 500 g pendant 15 min à 20 °C et décanté les surnageants.
- 8- Soumettre les tubes à essai au dosage pendant 1 minute dans un compteur gamma à scintillation.

## XI CALCUL DES RÉSULTATS

Il n'existe actuellement aucun calibrateur internationalement accepté pour la trypsin. Les valeurs de trypsin ne peuvent pas être facilement comparées avec les résultats d'autres dosages de trypsin. Les calibrateurs et les valeurs de contrôle sont attribués par rapport aux contrôles de référence normalisés et la valeur du lot précédent de calibrateurs et de contrôle. Le sérum de contrôle de la trypsin inclus dans la trousse fournit une moyenne analytique permettant de vérifier l'exactitude de la procédure de dosage effectuée en laboratoire.

Afin d'établir la courbe d'étalonnage, la procédure suivante doit être suivie :

1. Calculer la moyenne des déterminations réalisées en double.
2. Calculer la radioactivité liée sous forme de pourcentage des liaisons déterminées au point de l'étalon zéro (0) en utilisant la formule suivante :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Indiquer les valeurs ( $B/B_0 [\%]$ ) pour chaque point de l'étalon en fonction de la concentration en trypsin de chaque point de l'étalon. Écarter les valeurs aberrantes.
4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système automatique de traitement des résultats est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. Déterminer les concentrations en trypsin des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage, par interpolation des valeurs ( $B/B_0 [\%]$ ) des échantillons.
6. Pour chaque dosage, le pourcentage de traceur total lié en l'absence de trypsin non marquée ( $B_0/T$ ) doit être vérifié.

## XII. COURBE D'ÉTALONNAGE TYPE

Les données suivantes sont fournies uniquement à titre d'illustration et ne devront jamais être utilisées à la place de la courbe d'étalonnage en temps réel.

Trypsin RIA		CPM	B/B <sub>0</sub> (%)
Comptage total		29722	
Calibrateur	0,0 ng/ml	15091	100
	36 ng/ml	13067	86,6
	73 ng/ml	11503	76,2
	160 ng/ml	9242	61,2
	300 ng/ml	6904	45,7
	630 ng/ml	4900	32,5
	1560 ng/ml	3842	26,5

## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

### A. Limite de détection

La limite du blanc (LOB) a été calculée en mesurant le blanc à plusieurs reprises et est égale à la moyenne + 1,65 écart-type de la distribution des valeurs de test. La LOB calculée est égale à 4 ng/ml.

### B. Interférence

Aucune interférence n'a été observée :  
à l'hémoglobine jusqu'à 5 g/l,  
aux triglycérides jusqu'à 2,5 g/l,  
à la bilirubine non conjuguée jusqu'à 1 g/l,  
à la bilirubine conjuguée jusqu'à 0,5 g/l.

### C. Précision

INTRA-ESSAI			
Échantillon	Réplicat	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	$382,9 \pm 25,6$	6,7
B	20	$230,3 \pm 16,2$	7,0

INTER-ESSAI			
Échantillon	Réplicat	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)
1	10	$151,6 \pm 7,5$	4,9
2	10	$406 \pm 30,9$	7,6

E-T : écart-type ; CV : coefficient de variation

## XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Si les résultats obtenus pour le contrôle avec la trousse ne se trouvent pas dans la plage spécifiée sur l'étiquette du flacon, ils ne peuvent pas être utilisés à moins de pouvoir expliquer l'incohérence d'une manière satisfaisante. Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler/décongeler plus de deux fois. Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les bonnes pratiques de laboratoire.

## XV. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

### Sécurité

Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l' $I^{125}$  (demi-vie : 60 jours) émettant des radiations ionisantes X (28 keV) et  $\gamma$  (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut être uniquement transféré à des personnes habilitées qui sont les seules à pouvoir l'utiliser ; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la loi du pays de l'utilisateur final. En aucun cas, le produit ne peut être administré à l'être humain ou à des animaux.

Toute manipulation de produits radioactifs doit être effectuée dans une zone désignée, à l'écart des zones de passages réguliers. Un registre de la réception et du stockage de matériaux radioactifs doit être conservé dans le laboratoire. L'équipement et la verrerie de laboratoire susceptibles d'avoir été contaminés par des substances radioactives doivent être isolés afin d'éviter une contamination croisée de différents radio-isotopes.

Toute fuite radioactive doit être immédiatement nettoyée conformément aux procédures relatives à la radio-sécurité. Les déchets radioactifs doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et aux directives des autorités ayant compétence sur le laboratoire. Le respect des règles élémentaires de sûreté radiologique permet une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans cette trousse ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et se sont avérés négatifs pour HBsAg, l'anti-VHC, l'anti-VIH-1 et 2. Aucune méthode connue ne permet de garantir à 100 % que les dérivés de sang humain ne transmettront pas l'hépatite, le SIDA ou d'autres infections. Par conséquent, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été prélevés sur des animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Éviter tout contact de la peau avec les réactifs (azoture de sodium en tant que conservateur). L'azoture présent dans cette trousse peut réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et former ainsi des azotures métalliques fortement explosifs. Pendant l'étape de lavage, rincer les canalisations avec une grande quantité d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.

Ne pas fumer, boire, manger, ni appliquer de produits cosmétiques dans la zone de travail. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements de protection et des gants jetables.

## XVI. BIBLIOGRAPHIE

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

## XVII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	NOMBRE TOTAL μl	CALIBRATEURS CONTRÔLE μl	ÉCHANTILLONS μl
Calibrateurs/contrôle Échantillons	- -	100 -	- 100
Traceur : Trypsine humaine marquée au <sup>125</sup> I :	200	200	200
Antisérum	-	100	100
Incubation	Tubes vortex. Laisser incuber 3 heures à une température comprise entre 18 et 25 °C.		
Réactif précipitant	-	500	
Incubation	Tubes vortex. Laisser incuber 30 minutes à une température comprise entre 18 et 25 °C.		
Étape de lavage	-	Ajouter 1,0 ml d'eau distillée	
Centrifugation	-	Centrifuger pendant 15 minutes à $\geq 1\ 500$ g, à 20 °C. Décanter le surnageant.	
Comptage	Compter les tubes pendant 1 minute		

nl

Neem het volledige protocol door vóór gebruik.

# Radio-immunologische bepaling van trypsine

## I. BEOOGD GEBRUIK

Radio-immunologische bepaling voor de kwantitatieve bepaling van menselijke trypsine (m trypsine) in serum.  
**Alleen voor gebruik in het kader van onderzoek. Niet voor gebruik bij diagnoseprocedures.**

## II. ALGEMENE INFORMATIE

**A. Handelsnaam:** DIAsource Trypsin RIA Kit

**B. Catalogusnummer:** KIRCE07 : 100 tests

**C. Vervaardigd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2, 1348 Louvain-La-Neuve, België

Neem voor technische bijstand of bestelinformatie contact op met:

Tel.: +32 (0) 10 84 99 00                      Fax: +32 (0) 10 84 99 90

## III. ACHTERGROND

Trypsine is een van de enzymen die zijn betrokken bij de vertering van voedingseiwitten in de dunne darm. Dit enzym werkt als een endopeptidase met een uitgesproken voorkeurspecificiteit voor peptidebindingen die afkomstig zijn van de carbonylgroepen van L-arginyl- en L-lysylresiduen. Chemisch gezien is trypsine een eiwit dat uit 201 aminozuren met een molecuulmassa van 22 900 Da bestaat.

Net als andere proteolytische enzymen van pancreasoorsprong wordt trypsine gesynthetiseerd en uitgescheiden uit de acinaire cellen van de exocriene pancreas als een inactieve precursor of inactief pro-enzym, trypsinogen. Dit komt voor in twee vormen, die beide worden omgezet in enzymatisch actieve trypsine door de werking van enterokinase dat wordt geproduceerd door cellen in de twaalfvingerige darm. Dit kinase verwijderd in aanwezigheid van Ca++-ionen het hexapeptide Val-(Asp)4-Lys uit trypsinogen, waardoor het actieve centrum van de trypsinemolecule wordt blootgelegd. Bovendien kan trypsine zelf het trypsinogen activeren door autokatalyse.

Een deel van de trypsine blijkt intact uit het darmkanaal te worden uitgescheiden, aangezien het in de ontlasting kan worden opgespoord en gemeten. Bovendien kunnen trypsinogen, trypsine en waarschijnlijk aan een pancreasinhibitor gebonden trypsine vanuit de pancreascellen via de interstitiële vloeistof in het bloed terechtkomen. In het bloed wordt alle trypische activiteit geblokkeerd door drie specifieke inhibitoren ( $\alpha$ 1-antitrypsine-,  $\alpha$ 2-macroglobuline- en inter- $\alpha$ -trypsine-inhibitor). Niettemin behoudt normaal serum nog enige proteolytische activiteit, zoals blijkt uit de hydrolyse van synthetische substraten, maar dit kan niet alleen aan trypsine te wijten zijn.

#### IV. PRINCIPES VAN DE METHODE

Trypsine kan worden gemeten in duodenum- of pancreassap met behulp van spectrofotometrische methodes, die afhankelijk zijn van het vermogen om synthetische substraten te hydrolyseren. Aangezien de trypsines echter inactief zijn en de enzymatische activiteit van trypsine in serum wordt geblokkeerd door de bovengenoemde inhibitoren, kan deze aanpak niet worden gebruikt om de bloedspiegels van het enzym te bepalen.

Indien de immunologische en niet de enzymatische eigenschappen van trypsine zouden kunnen worden gebruikt in een methode voor de bepaling ervan in serum, zou het bovengenoemde probleem zich niet voordoen.

Met de trypsinikit kan het enzym trypsine radio-immunologisch worden bepaald in menselijk serum en andere biologische vloeistoffen. De kit maakt gebruik van het principe van competitieve eiwitbindingsanalyse, met behulp van een radio-immunologische bepaling met twee antilichamen, waarbij vrije trypsine wordt gescheiden van antilichaamgebonden trypsine door een antikonijn-immuunserum. Tijdens de eerste incubatie concurreren serumtrypsine en met 125I gelabelde trypsine om zeer specifieke antilichamen tegen trypsine, met als gevolg dat met 125I gelabelde trypsine omgekeerd evenredig aan de hoeveelheid aanwezige serumtrypsine aan de antilichamen wordt gebonden.

Tijdens de tweede incubatie reageert de trypsine of het 125I-trypsine-antilichaamcomplex met een antikonijn-gammaglobuline, waardoor precipitaat ontstaat. Het precipitaat kan naar beneden worden gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof kan worden overgeheveld en de activiteit van jodium-125 in het precipitaat kan worden gemeten in een gammascintillatieteller. De gemeten activiteit wordt vergeleken met een onder dezelfde omstandigheden opgestelde kalibratiecurve en geeft een indicatie van de trypsineconcentratie in het serum.

#### V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 100 tests	Reconstitutie
Ag   <sup>125</sup> I	1 ampul < 95 kBq 22 ml	Klaar voor gebruik
Met jodium-125 gelabelde menselijke trypsine		
CAL   0	1 ampul Gelyofiliseerd	Voeg 0,5 ml gedistilleerd water toe
Kalibrator 0: in paardenserum en natriumazide.		
CAL   N	6 ampullen Gelyofiliseerd	Voeg 0,5 ml gedistilleerd water toe
Kalibratoren 1-6: in paardenserum en natriumazide (zie exacte waarden op de labels van de ampullen)		
CONTROL   N	1 ampul 0,5 ml	Klaar voor gebruik
Controle in menselijk serum en natriumazide. (Zie exacte waarde op het label van de ampul)		
ANTISERUM	1 ampul 10,5 ml	Klaar voor gebruik
Konijnen-antimenseptrypsine in buffer met runderalbumine en natriumazide.		
PREC   AGENS	1 ampul 55 ml	Klaar voor gebruik
Precipitatiereagens: buffer met geit-antikonijn-IgG, runderalbumine en natriumazide.		

#### VI. NIET-GELEVERDE MATERIALEN

Het volgende benodigde materiaal wordt niet met de kit geleverd:

1. Gedistilleerd water: voor reconstitutie van de reagentia en voor de spoelstap.
2. Pipetten voor levering van 100 µl, 200 µl en 500 µl (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic punten voor eenmalig gebruik is aanbevolen).
3. Incubatiebuisjes van 3 tot 5 ml; bv. polystyreenbuisjes van 12 x 75 mm.
4. Vortexmixer.
5. Automatische spuit van 1 ml (type Cornwall) voor het spoelen.
6. Aanzuigsysteem.
7. Centrifuge ≥ 1500 g.

8. Eender welke gammateller die <sup>125</sup>I kan meten, kan worden gebruikt (minimumrendement 70%).

#### VII. VOORBEREIDING VAN DE REAGENTIA

**Kalibratoren:** los de kalibratoren zorgvuldig op in gedistilleerd water en ga daarbij als volgt te werk: tik zachtjes op de ampullen met kalibrator om eventuele deeltjes die aan de stop vastzitten, los te maken. Verwijder vervolgens voorzichtig de stoppen en leg ze ondersteboven op het werkvlak. Doe er met een geschikte micropipet precies 500 µl gedistilleerd water in elke ampul, plaats de stoppen terug en wacht ongeveer 10 minuten tot het gevriesdroogde materiaal volledig is opgelost. U kunt de reconstitutie en het mengen versnellen door de inhoud te doen wervelen en/of de ampullen tussen uw handen te rollen.

#### VIII. OPSLAG EN BEPALING VAN DE VERVALDATUM VAN DE REAGENTIA

- Vóór opening zijn alle componenten van de kits stabiel tot de vervaldatum die op het label is vermeld, mits bewaard bij 2 tot 8 °C.
- Na het eerste gebruik is de tracer stabiel, mits bij 2 tot 8 °C bewaard in de goed gesloten originele ampul, tot de vervaldatum van de tracer.
- Wijzigingen in het fysieke uiterlijk van reagentia kunnen wijzen op instabiliteit of achteruitgang.

#### IX. VERZAMELING EN VOORBEREIDING VAN HET SPECIMEN

Na de bloedafname wordt volgens de gebruikelijke methodes serum verkregen. Het wordt afgepipetted, direct geanalyseerd of tot 3 dagen bewaard bij 2-8 °C voor later gebruik, of anders ingevroren bij -20 °C.

Met de kit voor radio-immunologische bepaling van trypsine kan trypsine als eiwit in het serum worden gemeten, zonder beïnvloeding door de aanwezigheid van seruminhibitoren. De radio-immunologische bepaling is specifiek gericht op trypsine, trypsinogen en de geïnhibeerde vormen van het enzym.

#### X. PROCEDURE

##### A. Opmerkingen over het gebruik

Gebruik de kit of de componenten niet na de vervaldatum.

Meng materialen van verschillende kitpartijen niet met elkaar.

Breng alle andere reagentia vóór gebruik op kamertemperatuur (18-25 °C).

Meng alle reagentia en stalen zorgvuldig met elkaar door zachtjes te schudden of te wervelen.

Gebruik een schone pipetpunt voor eenmalig gebruik om elk ander reagens en staal toe te voegen, en zo kruisbesmetting te voorkomen. Hogeprecisiepipetten of geautomatiseerde pipetten bieden extra precisie.

Bereid voor elke reeks een kalibratiecurve voor; gebruik geen gegevens uit eerdere reeksen.

##### B. Procedure

1. Het is raadzaam om de analyses in tweevoud uit te voeren voor de kalibratoren, de controle en de stalen.
2. Label voldoende incubatiebuisjes (3-5 ml), zoals wordt aangegeven in VI. Niet-geleverde materialen. (kalibratoren, controleserum, serumstalen en 'totale activiteit'-buisjes).
3. Pipetteer 100 µl kalibratoren, controleserum en serumstalen in gerepareerde proefbuisjes.
4. Doe er 200 µl <sup>125</sup>I-mtrypsine in elk proefbuisje (ook in 'totale activiteit'-buisjes).
5. Doe er 100 µl antiserum in elk proefbuisje (met uitzondering van 'totale activiteit'-buisjes), meng de inhoud van de buisjes op de vortexmixer en incubeer gedurende 3 u (3-5 u) bij kamertemperatuur (18-25 °C) en uit de buurt van rechtstreeks licht.
6. Doe er 500 µl precipitatiereagens in elk proefbuisje (met uitzondering van 'totale activiteit'-buisjes), meng de inhoud van de buisjes op de vortexmixer en incubeer gedurende 30 min (30-60 min) bij kamertemperatuur (18-25 °C) en uit de buurt van rechtstreeks licht.
7. Doe er 1 ml gedistilleerd water in elk proefbuisje (met uitzondering van 'totale activiteit'-buisjes), centrifugeer de buisjes bij ≥ 1500 g gedurende 15 min op 20 °C en hevel de bovenstaande vloeistoffen over.
8. Meet de proefbuisjes gedurende 1 minuut in een gammascintillatieteller.

#### XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

Er bestaat momenteel geen internationaal aanvaarde kalibrator voor trypsine. De trypsinewaarden kunnen niet gemakkelijk worden vergeleken met de resultaten van andere trypsinebepalingen.

De kalibrator- en controlewaarden worden getoetst aan genormaliseerde referentiecontroles en de waarde van de vorige partij kalibratoren en controles.

Het trypsincontroleserum in de kit is een analytisch middel om de nauwkeurigheid van de in het laboratorium uitgevoerde analyseprocedure te controleren.

Om de kalibratiecurve op te stellen, moet de volgende procedure worden volgt:

1. Bereken het gemiddelde van de dubbele bepalingen.
2. Bereken de gebonden radioactiviteit als percentage van de op het nukalibratiepunt (0) bepaalde binding aan de hand van de volgende formule:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Zet de waarden ( $B/B_0 (\%)$ ) voor elk kalibratiepunt uit als functie van de trypsinconcentratie van elk kalibratiepunt. Verwerp duidelijke uitschieters.
4. Er kunnen ook computerondersteunde methodes worden gebruikt om de kalibratiecurve op te stellen. Indien wordt gebruikgemaakt van automatische resultaatverwerking, is een logistische functiecurve met 4 parameters aanbevolen.
5. Interpolate de staalwaarden ( $B/B_0 (\%)$ ) om de trypsinconcentraties van de stalen op basis van de kalibratiecurve te bepalen.
6. Voor elke analyse moet het percentage van de totale gebonden tracer in afwezigheid van ongelabelde trypsin ( $B_0/T$ ) worden gecontroleerd.

## XII. TYPISCHE KALIBRATIECURVE

De volgende gegevens zijn enkel ter illustratie en mogen nooit in de plaats van de daadwerkelijke kalibratiecurve worden gebruikt.

Radio-immunologische bepaling van trypsin		cpm	B/B <sub>0</sub> (%)
Totaaltelling		29722	
Kalibrator	0,0 ng/ml	15091	100
	36 ng/ml	13067	86,6
	73 ng/ml	11503	76,2
	160 ng/ml	9242	61,2
	300 ng/ml	6904	45,7
	630 ng/ml	4900	32,5
	1560 ng/ml	3842	26,5

## XIII. PRESTATIES EN BEPERKINGEN

### A. Detectiegrens

De LoB (Limit of Blank, blancogrens) werd berekend door de blanco meerdere malen te meten en werd berekend als de gemiddelde + 1,65 standaardafwijking van de distributie van de testwaarden. De berekende LoB was 4 ng/ml.

### B. Interferenties

Er werd geen interferentie geobserveerd:  
met hemoglobine tot 5 g/l,  
met triglyceriden tot 2,5 g/l,  
met niet-conjugeerde bilirubine tot 1 g/l,  
met geconjugeerde bilirubine tot 0,5 g/l.

### C. Precisie

INTRA-ASSAY			
Staal	Replicatie	$\bar{X} \pm SA$ (ng/ml)	VC (%)
A	20	$382.9 \pm 25.6$	6.7
B	20	$230.3 \pm 16.2$	7.0

INTER-ASSAY			
Staal	Replicatie	$\bar{X} \pm SA$ (ng/ml)	VC (%)
1	10	$151.6 \pm 7.5$	4.9
2	10	$406 \pm 30.9$	7.6

SA: Standaardafwijking; VC: Variatiecoëfficiënt

## XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

Indien de voor de kitcontrole verkregen resultaten niet binnen de waarden vallen die op het etiket van de ampul vermeld staan, kunnen de resultaten niet worden gebruikt tenzij een bevredigende verklaring is gevonden voor deze afwijking. Indien gewenst kan elk laboratorium zijn eigen verzameling controlestalen aanmaken. Die moeten bewaren in aliquots worden bewaard. Bevries en ontdooi de controlestalen niet meer dan twee keer. De acceptatiecriteria voor het verschil tussen dubbele staalresultaten moeten gebaseerd zijn op goede laboratoriumpraktijken.

## XV. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

### Veiligheid

Uitsluitend bestemd voor *in vitro* diagnostiek.

Deze kit bevat  $^{125}\text{I}$  (halfwaardetijd: 60 dagen) die ioniserende X- (28 keV) en y-straling (35,5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag alleen aan bevoegde personen worden overgedragen en alleen door hen worden gebruikt; aankoop, opslag, gebruik en uitwisseling van radioactieve producten is onderworpen aan de wetgeving in het land van de eindgebruiker. Het product mag in geen geval aan mensen of dieren worden toegediend.

Alle radioactieve hantering moet plaatsvinden in een daarvoor aangewezen zone, verwijderd van algemeen verkeer. In het lab moet een logboek worden bijgehouden van de ontvangst en opslag van radioactieve materialen. Laboratoriumuitrustingen en glaswerk dat met radioactieve stoffen besmet kan zijn, moet apart worden gehouden om kruisbesmetting met verschillende radio-isotopen te vermijden.

Eventuele lekkages van radioactief materiaal moeten onmiddellijk worden opgeruimd in overeenstemming met de procedures voor stralingsbescherming. Het radioactieve afgval moet worden verwijderd in overeenstemming met de plaatselijke wettelijke bepalingen en de richtlijnen van de autoriteiten die bevoegd zijn voor het laboratorium. Opvolging van de basisregels voor stralingsbescherming volstaat voor toereikende bescherming.

De menselijke bloedcomponenten in deze kit zijn getest volgens door Europa en/of de FDA goedgekeurde methodes en zijn negatief bevonden voor HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en anti-HIV-2. Geen enkele bekende methode kan volledige zekerheid bieden dat van menselijk bloed afgelide producten geen hepatitis, AIDS of andere infecties zullen overbrengen. Daarom moet het hanteren van reagentia, serum of plasmaspuitenplaatsvinden in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle dierlijke producten en afgelide producten zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten zijn afkomstig van landen waar geen BSE is gemeld. Desalniettemin moeten componenten die dierlijke bestanddelen bevatten, als potentieel infectieus worden beschouwd.

Vermijd huidcontact met reagentia (natriumazide als conservermiddel). Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in afvoerleidingen en kan zo uiterst explosieve metaalaziden vormen. Spoel tijdens de spoelstap de afvoer door met een grote hoeveelheid water om opbouw van azide te voorkomen.

In de werkzone moet niet worden gerookt, gedronken of cosmetica worden aangebracht. Pipetteer niet met de mond. Gebruik beschermende kleding en wegwerphandschoenen.

## XVI. BIBLIOGRAFIE

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

**XVII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL**

	TOTALE TELLINGEN µl	KALIBRATORENC ONTROLE µl	STALEN µl
Kalibratoren/controle	-	100	-
Stalen	-	-	100
Tracer: met $^{125}\text{I}$ gelabelde menselijke trypsine:	200	200	200
Antiserum	-	100	100
Incubatie	Vortexbuisjes. Incubeer gedurende 3 uur bij 18-25 °C.		
Precipitatiereagens	-	500	
Incubatie	Vortexbuisjes. Incubeer gedurende 30 minuten bij 18-25 °C.		
Spoelstap	-	Voeg 1,0 ml gedistilleerd water toe	
Centrifugering	-	Centrifugeer gedurende 15 minuten bij $\geq 1500$ g, op 20 °C. Hevel de bovenstaande vloeistof over.	
Telling	Tel de buisjes gedurende 1 minuut		

de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

# Trypsin-RIA

## I. VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Trypsin (h-Trypsin) in Serum.  
**Nur zur Verwendung in der Forschung. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.**

## II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource Trypsin RIA Kit
- B. **Katalognummer:** KIRCE07: 100 Tests
- C. **Hersteller:** DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet, 2, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:  
Tel.: +32 (0) 10 84 99 00                  Fax: +32 (0) 10 84 99 90

## III. HINTERGRUND

Trypsin ist eines der Enzyme, die an der Verdauung von Protein aus der Nahrung im Dünndarm beteiligt sind. Es fungiert als Endopeptidase mit einer ausgeprägten vorrangigen Spezifität für Peptidbindungen, die aus den Carbonylgruppen der L-Arginyl- und L-Lysyl-Rückstände entstehen. Chemisch gesehen ist Trypsin ein Protein, das aus 201 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 22,9 kDa aufweist.

Wie andere proteolytische pankreatische Enzyme wird Trypsin von den Azinuszellen der exokrinen Bauchspeicheldrüse als inaktiver Präkursor oder Proenzym, dem Trypsinogen, synthetisiert und sezerniert. Es kommt in zwei Formen vor, die beide durch die Wirkung von Enterokinase, die von Zellen im Duodenum produziert wird, in enzymatisch aktives Trypsin umgewandelt werden. Diese Kinase spaltet bei Vorhandensein von Ca++-Ionen das Hexapeptid Val-(Asp)4-Lys aus dem Trypsinogen ab, wodurch das aktive Zentrum des Trypsinmoleküls zugänglich gemacht wird. Darüber hinaus kann Trypsin selbst das Trypsinogen durch Autokatalyse aktivieren.

Ein Teil des Trypsins scheint intakt aus dem Darm ausgeschieden zu werden, da es im Stuhl nachgewiesen und gemessen werden kann. Darüber hinaus können das Trypsinogen, das Trypsin und wahrscheinlich das an einen Pankreasinhibitor gebundene Trypsin aus den Pankreaszellen über die interstitielle Flüssigkeit ins Blut gelangen. Im Blut wird die gesamte tryptische Aktivität durch drei spezifische Inhibitoren ( $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor) blockiert. Dennoch behält normales Serum eine gewisse proteolytische Aktivität, wie die Hydrolyse synthetischer Substrate zeigt, die jedoch nicht ausschließlich auf Trypsin zurückzuführen sein kann.

#### IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE

Trypsin kann im Dueodenum- oder Pankreassaft mit spektralphotometrischen Methoden gemessen werden, die von seiner Fähigkeit abhängen, synthetische Substrate zu hydrolysieren. Da die Trypsine jedoch inaktiv sind und die enzymatische Aktivität von Trypsin im Serum durch die oben genannten Inhibitoren blockiert wird, kann dieser Ansatz nicht zur Bestimmung der Blutwerte des Enzyms herangezogen werden.

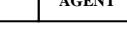
Könnte man die immunologischen und nicht die enzymatischen Eigenschaften von Trypsin in einer Methode zur Bestimmung des Trypsinspiegels im Serum nutzen, würde sich das oben beschriebene Problem nicht stellen.

Der Trypsin-Kit ermöglicht die radioimmunoassay-Methode mit zwei Antikörpern zunutze, wobei freies Trypsin von antikörpergebundenem Trypsin durch Präzipitation eines Serums mit Kaninchen-Antigen getrennt wird.

Während der ersten Inkubation konkurrieren Serum-Trypsin und  $^{125}\text{I}$ -markiertes Trypsin um hochspezifische Antikörper gegen Trypsin, mit dem Ergebnis, dass  $^{125}\text{I}$ -markiertes Trypsin im umgekehrten Verhältnis zur Menge des vorhandenen Serum-Trypsins an die Antikörper gebunden wird.

Während der zweiten Inkubation reagiert der Trypsin- oder  $^{125}\text{I}$ -Trypsin-Antikörperkomplex mit einem Gamma-Globulin-Kaninchen-Antigen, was zu einer Ausfällung führt. Das Präzipitat kann abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Jod-125-Aktivität im Präzipitat in einem Szintillationszähler zur Untersuchung der Gamma-Spektren gemessen werden. Die gemessene Aktivität wird mit einer unter denselben Bedingungen erstellten Kalibrierkurve verglichen und liefert einen Hinweis auf die Trypsinkonzentration im Serum.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	100 Tests Kit	Rekonstitution
  $^{125}\text{I}$ Jod-markiertes humanes Trypsin	1 Fläschchen < 95 kBq 22 ml	Gebrauchsfertig
  Kalibrator 0: in Pferdeserum und Natriumazid.	1 Fläschchen Lyophilisiert	0,5 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>
  Kalibratoren 1-6: in Pferdeserum und Natriumazid (siehe genauer Wert auf den Fläschchenetiketten)	6 Fläschchen Lyophilisiert	0,5 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>
  Kontrolle in menschlichem Serum und Natriumazid. (siehe genauer Wert auf dem Fläschchenetikett)	1 Fläschchen 0,5 ml	Gebrauchsfertig
	1 Fläschchen 10,5 ml	Gebrauchsfertig
Kaninchen-Anti-Human-Trypsin in Puffer mit Rinderalbumin und Natriumazid.		
  Ausfällungsreagenz: Puffer mit Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper der Ziege, Rinderalbumin und Natriumazid.	1 Fläschchen 55 ml	Gebrauchsfertig

#### VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

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

- Destilliertes Wasser: für die Rekonstitution der Reagenzien und für den Waschschnitt.
- Pipetten für 100 µl, 200 µl, 500 µl (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen aus Kunststoff wird empfohlen).
- Inkubationsröhren 3 ml bis 5 ml; z. B.: Polystyrolröhren 12 x 75 mm.
- Vortexmixer.
- 1 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen.
- Aspirationssystem.
- Zentrifuge ≥ 1500 g.

- Jeder Gammazähler, der  $^{125}\text{I}$  messen kann, kann verwendet werden (minimale Ausbeute 70 %).

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Kalibratoren: Die Kalibratoren vorsichtig in destilliertem Wasser auflösen und dabei wie folgt vorgehen: Vorsichtig auf die Kalibratorfläschchen klopfen, um eventuell am Stöpsel haftende Partikel zu lösen. Dann vorsichtig den Stöpsel abnehmen und umgedreht auf die Arbeitsfläche legen. Mit einer geeigneten Mikropipette genau 500 µl destilliertes Wasser in jedes Fläschchen geben, die Stöpsel wieder aufsetzen und etwa 10 Minuten warten, bis sich das gefriergetrocknete Material vollständig aufgelöst hat. Die Rekonstitution und Durchmischung kann durch Schwenken des Inhalts und/oder Rollen der Fläschchen zwischen den Händen beschleunigt werden.

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Lagerung im dicht verschlossenen Original-Fläschchen und bei 2 bis 8 °C bis zum Verfallsdatum des Tracers stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

#### IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Nach der Blutentnahme wird das Serum mit den üblichen Methoden gewonnen. Es wird abpipettiert, direkt untersucht oder bis zu 3 Tage lang bei 2 bis 8 °C zur späteren Verwendung gelagert oder alternativ bei -20 °C eingefroren.

Der Trypsin-Radioimmunoassay-Kit ermöglicht die Messung von Trypsin als Protein im Serum und wird durch das Vorhandensein von Serum inhibitoren nicht beeinträchtigt. Der Radioimmunoassay ist spezifisch für Trypsin, Trypsinogen und die inhibitierten Formen des Enzyms.

#### X. DURCHFÜHRUNG

##### A. Hinweise zur Handhabung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Verfallsdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle anderen Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18–25 °C).

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.

Verwenden Sie für die Zugabe der verschiedenen Reagenzien und Proben jeweils eine saubere Einwegpipettenspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrierkurve. Verwenden Sie keine Daten von früheren Durchläufen.

##### B. Verfahren

- Es wird empfohlen, die Assays für die Kalibratoren, die Kontrolle und die Proben in doppelter Ausführung durchzuführen.
- Beschreiben Sie eine ausreichende Anzahl von Inkubationsröhren (3–5 ml), wie in VI angegeben. *Nicht mitgeliefertes Material.* (Kalibratoren, Kontrollserum, Serumproben und Röhren für die „Gesamtaktivität“).
- Pipettieren Sie 100 µl Kalibratoren, Kontrollserum und Serumproben in die vorbereiteten Teströhren.
- Geben Sie 200 µl  $^{125}\text{I}$ -Trypsin in jedes Teströhren (einschließlich der Röhren „Gesamtaktivität“).
- Geben Sie 100 µl Antiserum in jedes Teströhren (mit Ausnahme der Röhren „Gesamtaktivität“), mischen Sie den Inhalt der Röhren mit dem Vortexmixer und inkubieren Sie die Röhren 3 Stunden lang (3–5 Stunden) bei Raumtemperatur (18–25 °C) vor direktem Licht geschützt.
- Geben Sie 500 µl Ausfällungsreagenz in jedes Teströhren (außer Röhren „Gesamtaktivität“), mischen Sie den Inhalt der Röhren mit dem Vortexmixer und inkubieren Sie die Röhren 30 Minuten lang (30–60 Minuten) bei Raumtemperatur (18–25 °C) vor direktem Licht geschützt.
- Geben Sie 1 ml destilliertes Wasser in jedes Teströhren (ausgenommen Röhren „Gesamtaktivität“), zentrifugieren die Röhren bei ≥ 1500 g 15 Minuten lang bei 20 °C und dekantieren Sie den Überstand.
- Die Röhren 1 Minute lang mit einem Szintillationszähler zur Untersuchung der Gamma-Spektren messen.

#### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Zurzeit gibt es keinen international anerkannten kalibrator für Trypsin. Die Trypsinwerte können nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen anderer Trypsin-Tests verglichen werden.

Die Kalibratoren und kontrollwerte werden mit normalisierten referenzkontrollen und dem wert der vorherigen charge von kalibratoren und kontrollen verglichen. Das im Kit enthaltene Trypsin-Kontrollserum bietet eine analytische methode zur überprüfung der genauigkeit des im Labor durchgeföhrt assayverfahrens. Um die Kalibrierkurve zu erstellen, muss das folgende Verfahren befolgt werden:

1. Den durchschnitt aus den doppelbestimmungen berechnen.
2. Die gebundene radioaktivität als prozentsatz der am nullkalibratorpunkt (0) ermittelten bindung nach folgender formel berechnen:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Die  $(B/B_0(\%))$ -Werte für jeden kalibratorpunkt als Funktion der Trypsinkonzentration jedes kalibratorpunkts darstellen. Offensichtliche „Ausreißer“ ausschließen.
4. Zur Erstellung der Kalibrierkurve können auch computergestützte Methoden verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeföhrt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer Vier-Parameter-Kurvenfunktion.
5. Trypsinkonzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte ( $B/B_0 (\%)$ ) aus der Kalibrierkurve bestimmen.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers in Abwesenheit von unmarkiertem Trypsin ( $B_0/T$ ) überprüft werden.

## XII. TYPISCHE KALIBRIERKURVE

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

Trypsin-RIA		cpm	B/B <sub>0</sub> (%)
Gesamtzahl		29722	
Kalibrator	0.0 ng/ml	15091	100
	36 ng/ml	13067	86,6
	73 ng/ml	11503	76,2
	160 ng/ml	9242	61,2
	300 ng/ml	6904	45,7
	630 ng/ml	4900	32,5
	1560 ng/ml	3842	26,5

## XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

### A. Nachweisgrenze

Die LoB (höchste Leerwertmessung) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet und als die mittleren +1,65 Standardabweichung der Verteilung der Testwerte ermittelt. die LoB wurde mit 4 ng/ml berechnet.

### B. Interferenzen

Es wurden keine Interferenzen beobachtet:  
mit Hämoglobin bis zu 5 g/l,  
mit Triglyceriden bis zu 2,5 g/l,  
mit nicht konjugiertem Bilirubin bis zu 1 g/l,  
mit konjugiertem Bilirubin bis zu 0,5 g/l.

### C. Präzision

INTRA-ASSAY			
Probe	Replikat	$\text{\langle X \rangle \pm SD (ng/ml)}$	CV (%)
A	20	$382.9 \pm 25.6$	6.7
B	20	$230.3 \pm 16.2$	7.0

INTER-ASSAY			
Probe	Replikat	$\text{\langle X \rangle \pm SD (ng/ml)}$	CV (%)
1	10	$151.6 \pm 7.5$	4.9
2	10	$406 \pm 30.9$	7.6

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

## XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Entsprechen die Werte bei der Kit-Kontrolle nicht dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereich, können die Ergebnisse ohne hinreichende Erklärung der Abweichungen nicht verwendet werden.

Falls gewünscht, kann jedes Labor seine eigenen Pools mit Kontrollproben herstellen, die aliquotiert eingefroren werden sollten. Nicht häufiger als zweimal einfrieren und auftauen.

Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Doppelergebnissen der Proben sollten auf den Regeln für gute Laborpraxis beruhen.

## XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

Dieses Kit enthält  $^{125}\text{I}$  (Halbwertszeit: 60 Tage), die ionisierende X- (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlen emittieren.

Dieses radioaktive Produkt darf nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen verwendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte unterliegen der Gesetzgebung des Landes des Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tiere verabreicht werden.

Der gesamte Umgang mit radioaktiven Stoffen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Im Labor muss ein Protokollbuch für den Empfang und die Lagerung radioaktiver Stoffe geführt werden. Kontaminationsgefährdete Laborgeräte und -glaswaren, die mit radioaktiven Stoffen kontaminiert sein könnten, sollten ausgesondert

werden, um eine Kreuzkontamination verschiedener Radioisotope zu verhindern. Eventuell verschüttete radioaktive Stoffe müssen sofort gemäß den Strahlenschutzverfahren entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen gemäß den örtlichen Vorschriften und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden entsorgt werden. Die Einhaltung der Grundregeln des Strahlenschutzes bietet einen angemessenen Schutz.

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

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

Vermeiden Sie jeglichen Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das in diesem Kit enthaltene Azid kann mit Blei und Kupfer in den Abflussrohren reagieren und auf diese Weise hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschritte den Abfluss mit viel Wasser, um die Bildung von Aziden zu verhindern.

Bitte im Arbeitsbereich nicht rauchen, trinken, essen oder Kosmetika anwenden. Nicht mit dem Mund pipettieren. Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe tragen.

## XVI. LITERATUR

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

**XVII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

	GESAMT ZÄHLUNG µl	KALIBRATORE N KONTROLLE µl	PROBEN µl
Kalibratoren/Kontrolle Proben	- -	100 -	- 100
Tracer : $^{125}\text{I}$ humanes Trypsin:	200	200	200
Antiserum	-	100	100
Inkubation	Vortexröhrchen. 3 Stunden lang bei 4 °C (18–25 °C) inkubieren.		
Ausfällungsreagenz	-	500	
Inkubation	Vortexröhrchen. 30 Minuten lang bei 18–8 °C inkubieren.		
Waschschritt	-	1,0 ml destilliertes Wasser hinzufügen	
Zentrifugierung	-	15 Minuten lang mit $\geq 1500\text{g}$ zentrifugieren, bei 20 °C. Die Überstände dekanteren.	
Zählung	Röhrchen 1 Minute lang zählen		