



Trypsin RIA

KIRCE07

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Lea todo el protocolo antes de usar.

Trypsin RIA

I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de tripsina humana (h tripsina) en suero.

Solo para uso en investigación. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial:** DIAsource Trypsin RIA Kit
- B. Número de catálogo:** KIRCE07 : 100 pruebas
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.

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

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

Tel: +32 (0) 10 84 99 00

Fax : +32 (0) 10 84 99 90

III. ANTECEDENTES

La tripsina es una de las enzimas implicadas en la digestión de proteínas en la dieta en el intestino delgado. Actúa como una endopeptidasa con una marcada especificidad preferencial por los enlaces peptídicos derivados de los grupos carbonilo de los residuos L-arginilo y L-lisilo. Químicamente, la tripsina es una proteína formada por 201 aminoácidos con un peso molecular de 22 900 Da.

Al igual que otras enzimas proteolíticas de origen pancreático, la tripsina se sintetiza y secreta a partir de las células acinares del páncreas exocrino como precursor inactivo o proenzima, el tripsinógeno. Esto ocurre en dos formas, que se convierten en tripsina enzimáticamente activa por la acción de la enteroquinasa producida por las células del duodeno. Esta quinasa, en presencia de iones Ca^{++} , elimina el hexapéptido Val-(Asp)⁴-Lys del tripsinógeno, desenmascarando así el centro activo de la molécula de tripsina. Además, la propia tripsina puede activar el tripsinógeno mediante autocatálisis.

Parte de la tripsina parece excretarse intacta por intestino, ya que puede detectarse y medirse en las heces. Además, el tripsinógeno, la tripsina y probablemente la tripsina unidos a un inhibidor pancreático pueden acceder desde las células pancreáticas a la sangre a través del líquido intersticial. En la sangre, tres inhibidores específicos (α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina y el inhibidor de inter- α -tripsina) bloquean toda la actividad de la tripsina. Sin embargo, el suero normal todavía conserva cierta actividad proteolítica como lo demuestra la hidrólisis de sustratos sintéticos, pero esto no puede deberse únicamente a la tripsina.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La tripsina se puede medir en el jugo duodenal o pancreático mediante métodos espectrofotométricos, que dependen de su capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos. Sin embargo, este método no se puede utilizar para determinar los niveles sanguíneos de la enzima dado que las tripsinas están inactivas y la actividad enzimática de la tripsina en el suero está bloqueada por los inhibidores mencionados anteriormente.

Esto no ocurriría si se pudieran utilizar las propiedades inmunológicas de la tripsina en lugar de las enzimáticas en un método para su determinación en suero.

El kit Trypsin permite la determinación radioinmunológica de la enzima tripsina en suero humano y otros fluidos biológicos. El kit utiliza el principio de análisis de unión competitiva a proteínas, utilizando un método de radioinmunoensayo de doble anticuerpo, en el que la tripsina libre se separa de la tripsina unida a anticuerpo mediante un suero precipitante anticonejo.

Durante la primera incubación, la tripsina sérica y la tripsina marcada con yodo 125 compiten por anticuerpos altamente específicos contra la tripsina, con el resultado de que la tripsina marcada con yodo 125 se une a los anticuerpos en proporción inversa a la cantidad de tripsina sérica presente.

Durante la segunda incubación, la tripsina o el complejo de anticuerpos contra la tripsina marcada con yodo 125 reacciona con una gammaglobulina anticonejo, provocando precipitación. El precipitado puede centrifugarse, decantarse el sobrenadante y medirse la actividad del yodo 125 en el precipitado en un contador de centelleo gamma. La actividad medida se compara con una curva del calibrador preparada en las mismas condiciones y proporcionará una indicación de la concentración de tripsina en el suero.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 100 pruebas	Reconstitución
Ag125I Tripsina humana marcada con yodo 125	1 vial < 95 kBq 22 ml	Lista para usar
CAL0 Calibrador 0: en suero de caballo y azida sódica.	1 vial lío­filizado	Añadir 0,5 ml de agua destilada
CALN Calibradores 1-6: en suero de caballo y azida sódica (Véanse los valores exactos en las etiquetas del vial.)	6 viales lío­filizados	Añadir 0,5 ml de agua destilada
CONTROLN Control en suero humano y azida sódica. (Véase el valor exacto en la etiqueta del vial)	1 vial 0,5 ml	Lista para usar
ANTISERUM Tripsina anti humana de conejo en tampón con albúmina bovina y azida sódica.	1 vial 10,5 ml	Lista para usar
PRECAGENT Tampón de reactivo precipitante con IgG de cabra anticonejo, albúmina bovina y azida sódica.	1 vial 55 ml	Listo para usar

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

- 1. Agua destilada: para reconstitución de reactivos y paso de lavado.
- 2. Pipetas para dispensación de 100 µl, 200 µl y 500 µl (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables).
- 3. Tubos de incubación de 3 a 5 ml; p. ej.: tubos de poliestireno de 12 x 75 mm.
- 4. Agitador tipo vórtex.
- 5. Jeringa automática de 1 ml (tipo Cornwall) para lavado.
- 6. Sistema de aspiración.
- 7. Centrifuga ≥ 1500 g.
- 8. Puede utilizarse cualquier contador gamma con capacidad para medir yodo 125 (eficiencia mínima del 70 %)

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Calibradores: Disuelva con cuidado los calibradores en agua destilada, procediendo de la siguiente manera: Golpee suavemente los viales del calibrador para desalojar cualquier partícula que pueda estar adherida al tapón. Después retire con cuidado los tapones, colocándolos boca abajo sobre la superficie de trabajo. Utilizando una micropipeta adecuada, dispense exactamente 500 µl de agua destilada en cada vial, vuelva a colocar los tapones y espere aproximadamente 10 minutos para que el material liofilizado se disuelva por completo. La reconstitución y la mezcla se pueden acelerar agitando el contenido o haciendo rodar los viales entre las manos.

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Después del primer uso, el trazador se mantiene estable si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Después de la extracción de sangre, se obtiene el suero mediante los métodos habituales. Se pipetea y analiza directamente o se almacena hasta 3 días entre 2 y 8 °C para su uso posterior o, alternativamente, se congela a -20 °C.

El kit de radioinmunoensayo de tripsina permite medir la tripsina como proteína en el suero y no se ve afectado por la presencia de inhibidores séricos. El radioinmunoensayo es específico para tripsina, tripsinógeno y las formas inhibidas de la enzima.

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad. No mezcle materiales de distintos lotes de kit. El resto de los reactivos deben estar a temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) antes de usar. Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente. Use una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra diferente para evitar la contaminación cruzada. Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión. Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

B. Procedimiento

- 1- Se recomienda realizar los ensayos por duplicado para los calibradores, el control y las muestras.
- 2- Etiquete suficientes tubos de incubación (3-5 ml), como se indica en VI. *Suministros no proporcionados.* (calibradores, suero control, muestras de suero y tubos de «actividad total»).
- 3- Pipetee 100 µl de calibradores, suero control y muestras de suero en los tubos de ensayo que hayan sido preparados.
- 4- Dispense 200 µl de tripsina marcada con yodo 125 en cada tubo de ensayo (incluidos los tubos de «actividad total»).
- 5- Dispense 100 µl de antisuero en cada tubo de ensayo (excluyendo los tubos de «actividad total»), mezcle el contenido de los tubos en el mezclador vórtex e incube durante 3 h (entre 3 y 5 h) a temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) de la luz directa.
- 6- Dispense 500 µl de reactivo de precipitación en cada tubo de ensayo (excluyendo los tubos de «actividad total»), mezclar el contenido de los tubos en el mezclador vórtex e incubar durante 30 min (entre 30 y 60 min) a temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) lejos de la luz directa.
- 7- Dispense 1 ml de agua destilada en cada tubo de ensayo (excluyendo los tubos de «actividad total»), centrifugue los tubos a ≥ 1500 g durante 15 min a 20 °C y decante los sobrenadantes.
- 8- Mida los tubos de ensayo durante 1 minuto en un contador de centelleo gamma.

XI CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Actualmente no existe ningún calibrador de tripsina aceptado internacionalmente. Los valores de tripsina no pueden compararse fácilmente con los resultados de otros ensayos de tripsina. Los calibradores y valores del control se asignan contra los controles de referencia normalizados y al valor del lote anterior de calibradores y control..

El suero control de tripsina incluido en el kit proporciona un medio analítico para comprobar la exactitud del procedimiento de ensayo realizado en el laboratorio.

Para establecer la curva de calibración se debe seguir el siguiente procedimiento:

1. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
2. Calcule la radiactividad unida como un porcentaje de la unión determinado en el punto del calibrador cero (0) según la fórmula siguiente:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Represente los valores (B/B0(%)) del punto de cada calibrador como una función de la concentración de tripsina del punto de cada calibrador. Rechace los valores atípicos obvios.
4. Se pueden usar también métodos informáticos para generar la curva de calibración. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.
5. Determine las concentraciones de tripsina de las muestras en la curva de calibración mediante interpolación de los valores (B/B0(%)) de las muestras.
6. Debe comprobarse, para cada ensayo, el porcentaje de trazador total unido en ausencia de tripsina sin marcar (B0/T).

XII. CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

Trypsin RIA		cpm	B/B0 (%)
Recuento total		29722	
Calibrador	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. EFICACIA Y LIMITACIONES

B. Limite de detección

El LoB (límite del blanco) se calculó por medición del blanco varias veces y se calculó como la media + 1,65 desviación estándar de la distribución del los valores de la prueba. Se calculó que el LoB era 4 ng/ml.

B. Interferencia

No se observó ninguna interferencia:
con hemoglobina hasta 5 g/l,
con triglicéridos hasta 2,5 g/l ,
con bilirrubina no conjugada hasta 1 g/l,
con bilirrubina conjugada hasta 0,5 g/l.

C. Precisión

INTRAENSAYO			
Muestra	Réplica	<X> ± DE (ng/ml)	CV (%)
A B	20	382,9 ± 25,6	6,7
	20	230,3 ± 16,2	7,0
INTERENSAYO			
Muestra	Réplica	<X> ± DE (ng/ml)	CV (%)
1 2	10	151,6± 7,5	4,9
	10	406 ± 30,9	7,6

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Si los resultados obtenidos para el control del kit o no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.

Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. No congele y descongele más de dos veces.

Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.

XV. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Este kit contiene yodo ¹²⁵ (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV).

Este producto radiactivo se puede transferir a y ser utilizado únicamente por personas autorizadas; la adquisición, almacenamiento, uso e intercambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario final. Bajo ninguna circunstancia debe administrarse el producto a seres humanos ni animales. Toda manipulación de productos radiactivos debe llevarse a acabo en una zona designada para tal fin, alejada de zonas de paso. En el laboratorio debe custodiarse un libro de registro sobre la recepción y almacenamiento de materiales radiactivos. Los equipos y el material de vidrio de laboratorio, que podrían estar contaminados con sustancias radiactivas, deberían separarse para prevenir la contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.

Los vertidos radiactivos deben limpiarse inmediatamente de conformidad con los procedimientos de seguridad radiológica. Los residuos radiactivos deben desecharse siguiendo la normativa y las recomendaciones locales de las autoridades con jurisdicción del laboratorio. El cumplimiento de las normas básicas sobre seguridad radiológica proporciona la protección adecuada.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, habiendo dado negativos para HbsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos (azida sódica como conservante). La azida de este kit puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar de este modo azidas metálicas muy explosivas. Durante el paso de lavado, lave el desagüe con agua abundante para prevenir la acumulación de azidas.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

XVI. BIBLIOGRAFÍA

(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. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	RECUE NTOS TOTALES	CALIBRADORE S CONTROL	MUESTRA S
	µl	µl	µl
Calibradores/control Muestras	- -	100 -	- 100
Trazador: Tripsina humana marcada con yodo ¹²⁵ ;	200	200	200
Antisuero	-	100	100
Incubación	Tubos vorticiales. Incube durante 3 horas a 18 – 25 °C.		
Reactivo de precipitación	-	500	
Incubación	Tubos vorticiales. Incube durante 30 minutos a 18 – 25 °C.		
Paso de lavado	-	Añada 1,0 ml de agua destilada	
Centrifugación	-	Centrifugue durante 15 minutos a ≥ 1500 g, a 20 °C. Decante el sobrenadante.	
Recuento	Medir los tubos durante 1 minuto		