

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
Mast Cell Tryptase**  
Clone AA1  
**Code No./ Code/ Code-Nr. M 7052**  
Edition/ Ausgabe 18.12.02

**ENGLISH****Intended use**

For in vitro diagnostic use.

Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, Clone AA1, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels human mast cells and is a useful tool for the recognition of very atypical or immature mast cells (MC) in mast cell leukaemia, and for the detection of small, even minute, dense focal MC infiltrates in staging procedures in patients with known cutaneous mastocytosis (1). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

**Introduction**

Human mast cell tryptases (EC 3.4.21.59) comprise a family of trypsin-like neutral serine proteases that are predominantly expressed in mast cells (2). In its enzymatically active form, mast cell tryptase exists as a non-covalently linked tetramer of 132 kDa (2, 3). Mast cell tryptase is capable of degrading vasoactive intestinal peptide and activating prekallikrein as well as generating kinins, all important mediators involved in bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness, which are major contributors to allergic airway disease (2). Mast cell tryptase also exhibits mitogenic effect on human airway smooth muscle cells, and human lung and dermal fibroblasts. Both smooth muscle hyperplasia and fibrotic changes can lead to thickening of the airway wall and a permanent reduction in airway calibre (2). Mast cells are activated by a number of stimuli, including antigen, superoxides, complement protein, neuropeptides and lipoproteins, resulting in activation and degranulation. Mast cell degranulation and thereby release of mast cell tryptase as well as histamine, leukotrienes and cytokines into the surrounding tissue is a pivotal event in an inflammatory response and seems to play an important role in host defense against pathogens (4). Mast cells play an active role in such diverse diseases as atherosclerosis, asthma, arthritis, bile duct fibrosis, malignancy and pulmonary fibrosis (4, 5).

Identification of mast cells through staining of tissues with antibodies specific for human mast cell tryptase has been useful in identification of focal and diffuse MC infiltrates in primary MC disease and mastocytosis. Demonstration of mast cell tryptase is essential for the identification of highly atypical, hypogranulated or even non-metachromatic MCs, especially in MC leukaemia, and for the detection of small or minute MC infiltrates (1).

**Reagent provided**

Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L Na<sub>3</sub>N.

Clone: AA1 (3). Isotype: IgG1, kappa.

Mouse IgG concentration: see label on vial.

**Immunogen**

Mast cell tryptase isolated from human lung (3).

**Specificity**

In Western blotting of a tryptase-rich extract of human lung under reducing conditions, the antibody labels a band of approximately 32.5 kDa corresponding to human mast cell tryptase (3).

In indirect ELISA the antibody reacts with purified human mast cell tryptase (3).

Antibody-binding to the mast cell tryptase does not affect enzyme activity (3).

Periodate treatment of mast cell tryptase has no effect on antibody labelling, indicating that carbohydrate epitopes are not involved in antibody recognition. Nor is antibody recognition affected by the presence of heparin (3).

**Precautions**

1. For professional users.

2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

**Storage**

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

**Specimen preparation**

Paraffin sections: The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin or Carnoy's reagent, although the structural integrity of the mast cells is better preserved with formalin fixation (6). Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, code No. S 1700, Dako Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K or trypsin (6) was found less efficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure.

Frozen sections and cell preparations: The antibody can be used for labelling Carnoy's or acetone/methanol fixed, frozen sections and cell preparations (3).

**Staining procedure**

Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, code No. M 7052, may be used at a dilution range of 1:100-1:200 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval Solution, code No. S 1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is Dako Mouse IgG1, code No. X 0931, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in Dako Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.

Visualization: DAKO LSAB™+HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™+HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, code No. K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

### Product-specific limitations

In specimens fixed in Carnoy's reagent, non-specific labelling of collagen has been reported in one study (7) but was not observed in another (6).

### Performance characteristics

Cells labelled by the antibody display a highly specific granular cytoplasmic staining pattern, corresponding to the secretory granules of mast cells (3).

**Normal tissues:** The antibody specifically labels mast cells (MC) in a number of human tissues, including lung, tonsil, colon, gastric mucosa and skin, whereas only a few MCs are detectable in the pituitary gland (6). The antibody does not label basophils, eosinophils, neutrophils, monocytes or lymphocytes and, likewise, no labelling has been observed in keratinocytes (3).

**Abnormal tissues:** In a study of more than 150 cases of different MC disorders, it was demonstrated that  $<4$  MCs/mm<sup>2</sup> were labelled in bone marrow in most normal and reactive states, whereas  $>5$  but  $<100$  were labelled in myelodysplastic syndromes. More than 100 MCs/mm<sup>2</sup> were detected in MC neoplasias, and cases with a much higher number (maximum 2655 MCs/mm<sup>2</sup>) were often observed (1). In a study of 7 patients with seasonal allergic conjunctivitis, the antibody demonstrated an average MC density within the conjunctival stroma of 106/mm<sup>2</sup> compared to 57.4/mm<sup>2</sup> in 8 normal subjects. Intraepithelial tryptase positive cells were also demonstrated in the allergic subjects, whereas no intraepithelial cells were detected in the normal counterparts (7). In the area around the septal bile ducts of the liver, the number of MCs labelled by the antibody in 45 cirrhotic livers averaged 59.0 MCs/mm<sup>2</sup>, a number that was significantly higher than in 71 normal livers, in which only an average density of 39.4 MCs/mm<sup>2</sup> was found (5).

## FRANÇAIS

### Intérêt

Pour diagnostic *in vitro*.

Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, Clone AA1, est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque les mastocytes humains et constitue un moyen très utile dans la détermination des mastocytes immatures ou très atypiques lors des leucémies à mastocytes, ainsi que pour la détection de petits, voire infimes infiltrats focaux et denses de mastocytes, dans les procédures de stadification chez les patients atteints de mastocytose cutanée (1) L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être entreprise dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics par un professionnel certifié.

### Introduction

Les tryptases à mastocytes humains (EC 3.4.21.59) incluent une famille de protéases à sérine neutres et de type trypsine, exprimées principalement dans les mastocytes (2). Dans sa forme enzymatiquement active, la tryptase à mastocytes existe sous forme d'un tétramère lié de façon non-covalente de 132 kDa (2, 3). La tryptase à mastocytes est capable de dégrader le peptide intestinal vasoactif et d'activer la prékallikréine, ainsi que de générer les kinines, d'importants médiateurs impliqués dans la bronchoconstriction et dans l'hyperréactivité bronchique, principaux facteurs des maladies allergiques des voies aériennes (2). La tryptase à mastocytes induit également un effet mitogénique au niveau des cellules des muscles lisses des voies respiratoires humaines, des poumons et des fibroblastes dermiques humains. L'hyperplasie et l'évolution fibrosante des muscles lisses peuvent entraîner l'épaississement de la paroi des voies respiratoires et une réduction définitive du diamètre de celles-ci (2). Les mastocytes sont activés par un certain nombre de stimuli, dont les antigènes, les superoxydes, le complément, les neuropeptides et les lipoprotéines, résultant en une activation et en une dégranulation. La dégranulation des mastocytes, et, par voie de conséquence, la libération de tryptase à mastocytes ainsi que de l'histamine, des leucotriènes et des cytokines dans le tissu environnant, est un événement déterminant dans la réaction inflammatoire et semble jouer un rôle décisif dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (4). Les mastocytes jouent un rôle actif dans des affections telles que l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la fibrose du canal cholédoque, de la tumeur maligne et de la fibrose pulmonaire (4, 5).

L'identification des mastocytes par l'intermédiaire du marquage des tissus avec des anticorps spécifiques de la tryptase à mastocytes humains s'est avérée utile dans l'identification des infiltrats de mastocytes focaux et diffus dans les affections primaires des mastocytes et la mastocytose. La démonstration de la tryptase à mastocytes est essentielle pour l'identification des mastocytes hautement atypiques, contenant peu, voir pas de granules métachromatiques, particulièrement dans la leucémie à mastocytes, et pour la détection de petits ou infimes infiltrats de mastocytes (1).

### Réactif fourni

L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surnageante dialysée contre 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, et contenant 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>.

**Clone:** AA1 (3). **Isotype:** IgG1, kappa.

**Concentration IgG de Souris:** Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

### Immunogène

Tryptase à mastocytes isolée du poumon humain (3).

### Spécificité

En transfert de type Western d'un extrait de poumon riche en tryptase en conditions réductrices, l'anticorps marque une bande d'environ 32,5 kDa correspondant à la tryptase à mastocytes humaine (3)

En ELISA indirecte, l'anticorps montre une réaction à la tryptase à mastocytes humaine purifiée (3).

La fixation de l'anticorps sur la tryptase à mastocytes n'affecte pas l'activité de cette enzyme (3).

Le traitement au périodate de la tryptase à mastocytes n'a pas d'effet sur le marquage de l'anticorps, ce qui indique que les épitopes de l'hydrate de carbone ne sont pas impliqués dans la détermination des anticorps. En outre, la détermination des anticorps n'est pas affectée par la présence de l'héparine (3).

### Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.

3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.

### Stockage

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.

### Préparation de l'échantillon

**Coupes en paraffine:** L'anticorps peut être utilisé pour le marquage de coupes de tissus incluses en paraffine, fixées dans du formol ou dans du Carnoy, bien que l'intégrité structurelle des mastocytes soit mieux préservée par la fixation au formol (6). Le prétraitement des tissus par démasquage de l'épitope induite par la chaleur est requis. Pour les tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus avec Dako Target Retrieval Solution, pH Elevé, code S 3308, ou 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0 ou 10 mmol/L tampon tris, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Le prétraitement des tissus avec la protéinase K ou la trypsine (6) s'est avéré moins efficace. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante.

**Coupes congelées et préparations cellulaires:** L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes congelées et préparations de cellules fixées dans le Carnoy ou l'acétone/méthanol (3).

## Procédure d'immunomarquage

**Dilution:** Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, code M 7052, peut être dilué entre 1:100 et 1:200 pour une application sur des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol de l'amygdale humaine pendant 20 minutes de démasquage de l'épitope induite par la chaleur dans Dako Target Retrieval Solution, code S 1700, et 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est Dako Mouse IgG1, code X 0931, dilué à la même concentration en IgG de souris que l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage réelle, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi; ou de les diluer dans Dako Antibody Diluent, code S 0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

**Révélation:** DAKO LSAB™+/HRP kit, code K 0679, et DAKO EnVision™+/HRP kits, codes K 4004 et K 4006 sont requis. Pour les coupes congelées et préparations cellulaires, Dako APAAP kit, code K 0670, est une alternative valable si le marquage endogène peroxydasique est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

## Limitations spécifiques du produit

Pour les spécimens fixés dans le Carnoy, un marquage non-spécifique du collagène a été signalé dans une étude (7), mais n'a pas été observé au cours d'une autre étude (6).

## Performances

Les cellules marquées par l'anticorps montrent un modèle de marquage granulaire cytoplasmique hautement spécifique, correspondant aux granules sécrétoires des mastocytes (3).

**Tissus normaux:** L'anticorps marque les mastocytes de manière spécifique dans un certain nombre de tissus humains, dont les poumons, les amygdales, le côlon, la muqueuse gastrique et la peau, alors qu'un faible nombre de mastocytes sont détectables au niveau de l'hypophyse. L'anticorps ne marque pas les basophiles, les éosinophiles, les neutrophiles, les monocytes ou les lymphocytes, de la même manière qu'aucun marquage n'a été observé pour les kératinocytes (3).

**Tissus anormaux:** Au cours d'une étude menée sur plus de 150 cas différents de troubles mastocytaires, il a été démontré que moins de 4 mastocytes/mm<sup>2</sup> ont été marqués dans la moelle osseuse dans la plupart des états normaux et réactifs, alors que plus de 5, mais moins de 100 mastocytes ont été marqués dans les syndromes myélodysplasiques. Plus de 100 mastocytes/mm<sup>2</sup> ont été détectés dans les néoplasies à mastocytes, et il est fréquent que des cas fassent état de chiffres largement supérieurs (maximum 2655 mastocytes/mm<sup>2</sup>) (1). Au cours d'une étude menée sur 7 patients présentant une conjonctivite allergique saisonnière, l'anticorps a révélé une densité moyenne de mastocytes au sein du stroma conjonctival de 106/mm<sup>2</sup>, contre 57,4/mm<sup>2</sup> chez 8 sujets normaux. La présence de cellules intraépithéliales tryptase-positives a également été déterminée chez les sujets allergiques, alors qu'aucune n'a été détectée chez les sujets sains (7). Dans la zone périphérique des canaux cholédoques septaux du foie, le nombre moyen de mastocytes marqués par l'anticorps chez 45 sujets présentant un foie cirrhotique s'élevait à 59,0 mastocytes/mm<sup>2</sup>, nombre significativement plus élevé que chez 71 sujets ayant un foie sain, pour lesquels la densité moyenne s'élevait à 39,4 mastocytes/mm<sup>2</sup> (5).

## DEUTSCH

### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, Clone AA1, ist für den immunzytochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert humane Mastzellen und ist nützlich für die Erkennung äußerst atypischer oder unausgereifter Mastzellen (MZ) bei Mastzellenleukämie sowie für den Nachweis von kleinen, oder sogar winzigen, dichten fokalen MZ-Infiltraten bei der Stadieneinteilung von Patienten mit diagnostizierter kutaner Mastozytose (1). Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

### Einleitung

Humane Mastzell-Tryptasen (EC 3.4.21.59) bilden eine Familie Trypsin-ähnlicher, neutraler Serin-Proteasen, die überwiegend in Mastzellen exprimiert werden (2). In ihrer enzymatisch aktiven Form existiert die Mastzell-Tryptase als nicht kovalent gebundenes Tetramer von 132 kDa (2, 3). Die Mastzell-Tryptase ist fähig, vasoaktive intestinale Peptide abzubauen und Präkallikrein zu aktivieren sowie Kinine zu generieren. Alle diese Stoffe sind wichtige Mediatoren, die an der Bronchokonstriktion und Überreaktion der Atemwege beteiligt sind, die wiederum einen bedeutenden Beitrag zu allergischen Erkrankungen der Atemwege leisten (2). Die Mastzell-Tryptase zeigt auch eine mitogene Wirkung auf die glatten Muskelzellen der humanen Lunge und Haut. Sowohl eine Hyperplasie der glatten Muskelzellen als auch fibrotische Änderungen können zu einer Verdickung der Wandungen der Atemwege sowie einer permanenten Verringerung des Atemwegquerschnitts führen (2). Mastzellen werden durch eine Reihe von Stimuli aktiviert, wie beispielsweise Antigen, Superoxide, Komplement-Protein, Neuropeptide und Lipoproteine, die zu einer Aktivierung und Degranulation der Mastzellen führen. Die Mastzellen-Degranulation und die folgende Freisetzung von Mastzell-Tryptase sowie Histaminen, Leukotrienen und Zytokinen in das umliegende Gewebe, stellt ein zentrales Ereignis einer entzündlichen Reaktion dar und scheint eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Wirtes gegen Pathogene zu spielen (4). Mastzellen spielen eine aktive Rolle bei solch unterschiedlichen Krankheiten wie Atherosklerose, Asthma, Arthritis, Gallengangfibrose sowie Malignitäten und pulmonärer Fibrose (4, 5).

Das Verfahren der Identifizierung von Mastzellen durch Anfärben von Geweben mit Antikörpern, die für die humane Mastzell-Tryptase spezifisch sind, hat sich bei der Identifizierung fokaler und diffuser MZ-Infiltrate bei primärer MZ-Krankheit und Mastozytose als nützlich erwiesen. Der Nachweis der Mastzell-Tryptase ist für die Identifizierung von äußerst atypischen, hypogranulierten oder sogar nicht metachromatischen Mastzellen, insbesondere bei der Mastzellenleukämie sowie für die Aufdeckung von kleinen oder winzigen MZ-Infiltraten von entscheidender Bedeutung.

### Geliefertes Reagenz

Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Klon:** AA1 (3). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

**Maus-IgG-Konzentration:** Siehe Produktetikett.

### Immunogen

Aus der menschlichen Lunge isolierte Mastzell-Tryptase (3).

### Spezifität

Im Westernblot eines Tryptase-reichen Extrakts der menschlichen Lunge markiert der Antikörper unter reduzierenden Bedingungen eine Bande von ungefähr 32,5 kDa, die der humanen Mastzell-Tryptase entspricht (3).

Im indirekten ELISA reagiert der Antikörper mit gereinigter humaner Mastzell-Tryptase (3).

Eine Bindung des Antikörpers an die Mastzell-Tryptase hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (3).

Eine Periodatbehandlung der Mastzell-Tryptase hat keine Wirkung auf die Antikörpermarkierung, was darauf verweist, dass Kohlenhydrat-epitope an der Antikörpererkennung unbeteiligt sind. Die Antikörpererkennung wird ebenso wenig durch das Vorhandensein von Heparin beeinflusst (3).

### Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

### Lagerung

(103472-002)

M 7052/EFG/SUA/18.12.02 p. 3/4

Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

#### Probenvorbereitung

**Paraffinschnitte:** Der Antikörper kann für die Markierung von Gewebeschnitten verwendet werden, die in Paraffin eingebettet und in Formalin oder Carnoy-Reagenz fixiert wurden. Die strukturelle Integrität der Mastzellen bleibt allerdings bei einer Fixierung mit Formalin besser erhalten (6). Eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung ist erforderlich. Für formalinfixierte Gewebeschnitte werden optimale Resultate erzielt mit Dako Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S 1700, Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308, 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6,0, oder 10 mmol/L Trispuffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0. Die Vorbereitung der Gewebe mit Proteinase K oder Trypsin (6) hat sich als weniger effizient erwiesen. Während der Gewebepreparation oder während der anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

**Gefrierschnitte und zytologische Präparate:** Der Antikörper kann für die Markierung gefrorener Schnitte und Zellpräparate, die in Carnoy Reagenz oder Azeton/Methanol fixiert wurden, verwendet werden (3).

#### Färbeprozedur

**Verdünnung:** Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, Code-Nr. M 7052, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:100-1:200 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte paraffineingebettete Schnitte der menschlichen Tonsillen genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Dako Target Retrieval solution, pH 6,1, Code-Nr. S 1700, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist Dako Mouse IgG1, Code-Nr. X 0931, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S 0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden.

**Visualisierung:** Folgende Kits werden empfohlen: DAKO LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K 0679 und DAKO EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K 4004 und K 4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der Dako APAAP Kit, Code-Nr. K 0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird.

#### Produktspezifische Beschränkungen

Bei mit Carnoy-Reagenz fixierten Proben wurde in einer Studie eine unspezifische Markierung von Kollagen festgestellt werden (7), jedoch nicht in einer anderen Studie (6).

#### Leistungseigenschaften

Vom Antikörper markierte Zellen weisen ein hochspezifisches, granuläres zytoplasmatisches Färbemuster auf, das den sekretorischen Granula der Mastzellen entspricht (3).








**Normalgewebe:** Der Antikörper markiert spezifisch Mastzellen (MZ) in einer Reihe von humanen Geweben, wie z.B. Lungen-, Tonsillen-, Kolon-, Magenschleimhaut- und Hautgewebe, wogegen nur einige wenige MZ in der Hypophyse nachgewiesen werden können (6). Der Antikörper markiert keine Basophilen, Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten oder Lymphozyten. Des Weiteren wurde keine Markierung von Keratinozyten beobachtet (3).

**Anomales Gewebe:** Eine Studie von über 150 Fällen verschiedener MZ-Krankheiten hat nachgewiesen, dass im Knochenmark in den meisten normalen und reaktiven Stadien weniger als 4 MZ/mm<sup>2</sup> markiert wurden, wogegen bei myelodysplastischen Syndromen zwischen 5 und 100 markiert wurden. Bei MZ-Neoplasien wurden über 100 MZ/mm<sup>2</sup> ermittelt und oft wurden Fälle mit wesentlich höheren Werten (Maximum 2655 MZ/mm<sup>2</sup>) beobachtet (1). Bei einer Studie von 7 Patienten mit saisonaler allergischer Konjunktivitis, zeigte der Antikörper eine durchschnittliche MZ-Dichte im Stroma der Bindehaut von 106/mm<sup>2</sup>, im Vergleich zu 57,4/mm<sup>2</sup> bei 8 normalen Testpersonen. Bei den allergischen Probanden wurden ebenfalls intraepitheliale Tryptase-positive Zellen nachgewiesen, wogegen bei den normalen Entsprechungen keine Intraepithelzellen festgestellt wurden (7). In 45 zirrhatischen Lebern erreichte die Zahl der Mastzellen, die vom Antikörper markiert wurden, im Gebiet der Septum-Gallengänge der Leber einen Durchschnittswert von 59,0 MZ/mm<sup>2</sup>. Dieser Wert lag bedeutend höher als bei 71 normalen Lebern, bei denen nur eine durchschnittliche Dichte von 39,4 MZ/mm<sup>2</sup> nachgewiesen wurde (5).

#### References/ Références/ Literatur

- Horny H-P, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res* 2001;25:543-51.
- Abraham WM. Tryptase: potential role in airway inflammation and remodelling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L193-L196.
- Walls AF, Bennett AR, McBride HM, Glennie MJ, Holgate ST, Church MK. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for human mast cell tryptase. *Clin Exp Allergy* 1990;20:581-9.
- Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg D, Stone W, Huang S-K, et al. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* 2001;6:d1109-27.
- Koda W, Harada K, Tsuneyama K, Kono N, Sasaki M, Matsui O, et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab Invest* 2000;80:1007-17.
- Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol* 1990;162:119-26.
- Morgan SJ, Williams JH, Walls AF, Church MK, Holgate ST, McGill JI. Mast cell numbers and staining characteristics in the normal and allergic human conjunctiva. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:111-6.

#### Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2°C – 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Manufacturer Fabricant Hersteller
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 LOT	Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung		
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis		