

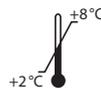
IDK[®] Tryptase ELISA

*Zur In-vitro-Bestimmung von Tryptase
in EDTA-Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of tryptase
in EDTA-plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2025-03-13

REF K 6814



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenvorbereitung</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
12. TECHNISCHE MERKMALE	9
13. ENTSORGUNG	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Tryptase aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Tryptase ist ein Sammelbegriff für eine Familie von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen. Sie werden vor allem in Mastzellen gebildet und gespeichert, um bei einer Aktivierung in die Blutbahn abgegeben werden zu können [1, 2]. Tryptasen wirken vasoaktiv, proinflammatorisch und haben einen chemotaktischen Effekt auf Leukozyten. In diesem Zusammenhang spielen sie eine besondere Rolle bei Entzündungsprozessen und Typ-I-Allergien. Erhöhte Tryptasekonzentrationen finden sich auch bei myeloiden Erkrankungen; im Gegensatz zu Patienten mit einem lymphoiden Neoplasma, die eher normale Tryptasekonzentrationen aufweisen [4, 5].

Indikationen

- myeloischen Erkrankungen und Neoplasmen, inkl. Mastozytose
- anaphylaktischen Reaktionen (Medikamente, Insektengifte)
- Medikamentenüberempfindlichkeiten (z. B. Anästhetika oder Kontrastmittel)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6814	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6814	AB	Detektionsantikörperkonzentrat, biotinyliert	1 x 200 µl
K 6814	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 200 µl
K 6814	STDKONZ	Standardkonzentrat, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6814	CTRL1	Kontrolle 1, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6814	CTRL2	Kontrolle 2, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6814	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel, saugfähiges Papier)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x, je nach Probenaufkommen, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzenrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (z. B. 100 ml WASH-BUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich

bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Das lyophilisierte Standardkonzentrat (STDKONZ)** und die **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standardkonzentrat und Kontrollen** (rekonstituierte STDKONZ und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Die **Herstellung der Standardkurve** (Volumina und Konzentrationen) ist der beiliegenden Produktspezifikation zu entnehmen.
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers und Konjugats:** Das **Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** und das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** werden vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (z. B. 100 µl AB + 10 ml Waschpuffer und 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das AB und das CONJ sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes AB) und **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

EDTA-Plasma und Serum

Das Probenmaterial wird bis zur Verwendung bei **-20°C** gelagert. **Achtung:** einmal aufgetaute Proben möglichst sofort analysieren, wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen vermeiden.

Probenvorbereitung

Wir empfehlen **aufgetautes EDTA-Plasma** vor der Verwendung im Test in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen für **5 min** bei 10 000 x g zu **zentrifugieren**.

Probenverdünnung

Die Proben werden vor dem Einsatz im Test **1:5** verdünnt,

z. B. **50 µl** Probe + **200 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Pro Vertiefung werden **100 µl** der Verdünnung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Tryptase.

Im ersten Inkubationsschritt wird Tryptase aus den Proben von einem immobilisierten Antikörper gebunden. Es folgt ein Waschschrift, um alle ungebundenen Probenkomponenten zu entfernen.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein polyklonaler mit Biotin markierter anti-Tryptase-Antikörper zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Zugabe des Streptavidin-POD-Konjugats und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

1. Antikörper – Tryptase-biotinylierter Antikörper – Streptavidin-POD-Konjugat

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Tryptase-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Detektionsantikörper (verdünntes AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln* inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Plasma- und Serumproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 0,391 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) 0,749 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen

sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.
- Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL) sowie der Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) enthalten Borsäure. **Gefahr:** Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen (H360FD). Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ENTSORGUNG

- Flüssige Testkomponenten, Pipettenspitzen, Röhrchen usw. sind wie gewöhnlicher Laborabfall zu behandeln, sofern nicht anders angegeben. Die Lösungen sollten nach dem Test in einem dafür geeigneten Behälter, gemäß den örtlichen Vorschriften, entsorgt werden.
- Alle Proben sind als potentiell gefährlich zu betrachten und wie ein infektiöses Agens behandelt werden. Andere potentiell infektiöse Materialien (z. B. Probensammelbehälter) müssen entsprechend den offiziellen Vorschriften entsorgt werden.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Schwerwiegende Vorfälle im Zusammenhang mit dem Testkit sind der Immundiagnostik AG sowie der nationalen Aufsichtsbehörde zu melden.

15. LITERATUR

1. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol*; 2015
2. Hallgren et al. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J*; 2006
3. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, Van der Linden PW. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol* 1994;14:190-204.
4. Sperr WR, El-Samahi A, Kundi M, Girschikofsky M, Winkler S, Lutz D, Endler G, Rumpold H, Agis H, Sillaber C, Jäger U, Valent P. Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *Eur J Clin Invest* 2009;39:914-23
5. Sperr WR, Stehberger B, Wimazal F, Baghestanian M, Schwartz LB, Kundi M, Semper H, Jordan JH, Chott A, Drach J, Jäger U, Geissler K, Greschniok A, Horny HP, Lechner K, Valent P. Serum tryptase measurements in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1097-105.

Verwendete Symbole:

	Chargenbezeichnung		Bestellnummer
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Temperaturbegrenzung		Verwendbar bis
	Produktspezifikationsdatenblatt beachten		Gebrauchsanweisung beachten
	Europäische Konformität		Nicht wiederverwenden
	Gesundheitsgefahr		Enthält Material tierischen Ursprungs
	Eindeutige Produktidentifizierung		Reizend

Manual

IDK[®] Tryptase ELISA

*For the in vitro determination of tryptase
in EDTA-plasma and serum*

Valid from 2025-03-13

REF K 6814



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	16
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
<i>Sample storage</i>	17
<i>Sample preparation</i>	17
<i>Sample dilution</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	20
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
10. QUALITY CONTROL	21
11. PRECAUTIONS	21
12. DISPOSAL	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

The assay described here is suitable for the determination of tryptase from EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Tryptase is a collective term for a family of trypsin-like serine proteases. They are mainly produced and stored in mast cells to be released into the bloodstream upon activation [1, 2]. Tryptases are vasoactive, proinflammatory and have a chemotactic effect on leukocytes. In this context, they play a special role in inflammatory processes and type I allergies. Elevated tryptase concentrations are also found in myeloid diseases; in contrast to patients with a lymphoid neoplasm, who tend to have normal tryptase concentrations [4, 5].

Indications

- myeloid diseases and neoplasms, incl. Mastocytosis
- anaphylactic reactions (drugs, insect venom)
- drug hypersensitivity (e.g. anesthetics or contrast media)

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6814	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 6814	AB	Detection antibody concentrate , biotinylated	1 x 200 µl
K 6814	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 6814	STDKONZ	Standard concentrate, lyophilised	4 x 1 vial
K 6814	CTRL1	Control 1, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6814	CTRL2	Control 2, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6814	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, absorbent paper etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (e.g. 100 ml WASH-BUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.

- The **lyophilised standard concentrate (STDKONZ)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standard concentrate and controls** (reconstituted STDKONZ and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- The preparation of the **standard curve** (volumes and concentrations) is described in the product specification.
- **Preparation of the detection antibody and the conjugate:** Before use, the **detection antibody concentrate (AB)** and the **conjugate concentrate (CONJ)** have to be diluted **1:101** in **dilution buffer** (e.g. 100 µl AB + 10 ml wash buffer and 100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The AB and the CONJ are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Detection antibody** (1:101 diluted AB) and **conjugate** (1:101 diluted CONJ) **are not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

EDTA plasma and serum samples

The sample material is stored at -20 °C until use. Important: once thawed, analyse samples immediately if possible, avoid repeated freeze-thaw cycles.

Sample preparation

We recommend to centrifuge thawed EDTA plasma in 1.5 ml reaction tubes at 10000 g for 5 min before use in the assay.

Sample dilution

Samples must be diluted **1:5** before performing the assay,

e.g. **50 µl** sample + **200 µl** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

100 µl of the dilution are used in the test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of tryptase.

In a first incubation step, tryptase in the sample is bound to tryptase antibodies, which are immobilised on the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out.

In a second incubation step, a biotinylated polyclonal anti-tryptase antibody is added into each microtiter well. After a further washing step, the streptavidin peroxidase conjugate is added and a "sandwich" of

1st antibody – tryptase - biotinylated antibody – streptavidin peroxidase conjugate is formed.

Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. An acidic stop solution is then added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the tryptase content in the sample.

A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Tryptase, present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered in the aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker* .
10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

EDTA plasma and serum samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 5** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	0.391 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.749 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.
- The lyophilised standards (STD) and controls (CTRL) as well as the sample dilution buffer (SAMPLEBUF) contains boric acid. **Danger:** May damage fertility. May damage the unborn child (H360FD). Therefore, protective gloves, protective clothing and safety goggles should be worn. If exposed or concerned: Get medical advice/attention.

12. DISPOSAL

- Liquid test components, pipets tips, tubes etc. are to be treated as ordinary laboratory waste, unless otherwise stated. The solutions should be discarded in a proper container after testing following local regulations.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. Other potentially infectious materials (e.g. sample collection container) must be disposed in accordance with official regulations.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol*; 2015
2. Hallgren et al. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J*; 2006
3. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, Van der Linden PW. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol* 1994;14:190-204.
4. Sperr WR, El-Samahi A, Kundi M, Girschikofsky M, Winkler S, Lutz D, Endler G, Rumpold H, Agis H, Sillaber C, Jäger U, Valent P. Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *Eur J Clin Invest* 2009;39:914-23
5. Sperr WR, Stehberger B, Wimazal F, Baghestanian M, Schwartz LB, Kundi M, Semper H, Jordan JH, Chott A, Drach J, Jäger U, Geissler K, Greschniok A, Horny HP, Lechner K, Valent P. Serum tryptase measurements in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1097-105.

Used symbols:

	Lot number		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Temperature limitation		Use by
	Consult product specification data sheet		Consult instructions for use
	European Conformity		Do not re-use
	Systemic health hazards		Contains material of animal origin
	Unique Device Identification		Irritant