
Instructions for use
Histamine Release

REF

BA E-1100



IVD

CE

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Supplementary kit for the quantitative determination of the release of histamine from heparinized whole blood (this kit has to be used in combination with the Histamine ELISA, for details contact your local supplier).

In humans, histamine (β -imidazole ethylamine) is the most important mediator and is mostly found in the initial phase of an anaphylactic reaction ("immediate type" allergy). Histamine is produced by the enzymatic decarboxylation of histidine. In the organism, histamine is present in nearly all tissues, and it is mainly stored in the metachromatic granules of mast cells and the basophilic leukocytes. It is present in an inactive bound form and is released only as required.

Histamine acts predominantly on smooth muscle and blood vessels. In humans, it is responsible for the broncho-constriction occurring during the acute phase. In the vessels, its constrictive effect is limited to the venula, whereas arterioles are dilated. Furthermore, histamine causes a contraction of the cells of the vascular endothelium and increases the vascular permeability, thereby allowing higher-molecular substances to escape into the tissue.

Like several other mediators, histamine does not exclusively mediate various clinical symptoms of anaphylaxis but also induces a series of effects which are directed towards a termination of the anaphylactic reaction. Histamine may inhibit the release of lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes, the degranulation of mast cells and basophiles and the production of complement components through mononuclear phagocytes. Furthermore, histamine can activate suppressor T cells and, thus, may inhibit the production of IgE. The biological action of histamine in tissue is guaranteed by three different surface receptors, i.e. H1, H2 and H3 receptors.

Of clinical interest in the histamine determination is the quantification of the histamine release from basophilic leukocytes in allergies of the "immediate type" as well as of the histamine quantity which is present in various body fluids (plasma, urine, cell culture supernatants), after allergen administration. First contact of the organism with an allergen does not result in the initiation of a histamine release. Initially, specific IgE antibodies are produced which migrate to the mast cells and there they bind to the receptors. At the second allergen contact, a transformation of a B cell to a plasma cell is no longer required. The allergen directly moves to the IgE antibodies already bound to the mast cells and binds to these antibodies. The mast cell responds by histamine secretion from its granules.

The direct detection of mediator substances like histamine during an allergic reaction is not only of scientific interest but possibly also of practical importance in connection with a specific antagonistic therapy.

Heparinized whole blood samples are incubated with different concentrations of the suspected allergen. Release of histamine will occur upon stimulation of basophilic granulocytes depending on their sensibility to the allergen. The released histamine in the supernatant is subsequently determined using a specific plasma immunoassay, the Histamine ELISA purchased in connection with this kit. This histamine value is related to the 100% control (= Total Histamine) and the blank value (= Spontaneous Release).

The determination of the *in vitro* release of histamine represents a sensitive and specific method as well as a suitable addition to routine diagnostic procedures including conventional skin testing and radioallergosorbent tests (RAST) for the determination of specific IgE antibodies in serum of atopic patients. In addition, this test also detects the "releasability" of the cells.

1.2 Clinical application

Please refer to the instructions for use of the Histamine ELISA, **chapter 1.2**.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

Please refer to the instructions for use of the Histamine ELISA, **chapter 2**.

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA E-1145 **ANTI-IGE** **Anti-IgE-Antiserum - Concentrated**

Contents: Rabbit Anti-Human IgE antibody

Volume: 1 x 25 µl/tube

BA E-1126 **RELEASE-BUFF** **Release Buffer – Ready to Use**

Contents: Buffer with physiological pH

Volume: 1 x 50 ml/vial, orange cap

4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 5 – 500 µl
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 - 650 nm
- Centrifuge capable of at least 3.000 x g
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Temperature controlled water bath (37 °C and 90 °C) or similar heating device
- Histamine ELISA, Vortex mixer, water (deionized, distilled, or ultra-plus)

5. Sample collection and storage

Heparinized Whole Blood

24 h before drawing blood samples the patient should not ingest any allergy causing drugs, antihistaminics, oral corticosteroids and substances which block H2 receptors.

The Histamine Release is performed with heparinized whole blood. That means whole blood is collected into a tube (e.g. Monovette™ or Vacuette™) according to the manufacturer's instructions that contains heparin as anti-coagulant.

The samples can be stored for up to 24 hours at room temperature. Please do not keep the samples refrigerated, this will lead to clotting of the leucocytes. Avoid direct sunlight.

The following quantities of whole blood are needed:

- 40 µl for the determination of total histamine
- 200 µl for the spontaneous release
- 200 µl for positive control with anti- IgE
- 200 µl for each individual allergen concentration

Example: for a histamine release determination with 4 allergens in 3 different concentrations one would need approx. 2.5 ml of heparinized blood.

| | | |
|------------|------------|---|
| Storage: | 20 - 25 °C | Keep away from heat or direct sun light. |
| Stability: | 24 h | Avoid cooling. At 2 - 8 °C, the leucocytes will clot. |

Storage of Supernatants: see chapter 6.4

6. Test procedure

6.1 Preparation of reagents

Anti-IgE-Antiserum Concentrate:

Prepare the working solution of the Anti-IgE-Antiserum by adding 5 µl of the Anti-IgE-Antiserum Concentrate to 5 ml of Release Buffer.

| | | |
|--|----------|---------|
| Storage of diluted Anti-IgE-Antiserum: | 2 – 8 °C | - 20 °C |
| Stability of diluted Anti-IgE-Antiserum: | 3 d | 1 month |

6.2 Release of the allergen induced histamine

Allergen dilutions

Starting with a stock solution of 1 mg allergen per ml water (deionized, distilled, or ultra-pure), a set of 10x dilutions is prepared according to the following pipetting scheme (example for 3 dilution steps):

| No. | Dilution | Allergene solution | Release-Buffer |
|-----|-----------|-----------------------|----------------|
| 1 | 10^{-1} | 50 µl stock- solution | 450 µl |
| 2 | 10^{-2} | 50 µl solution No. 1 | 450 µl |
| 3 | 10^{-3} | 50 µl solution No. 2 | 450 µl |

6.3 Histamine Release protocol (example for 3 dilution steps)

For each allergen tested with a patient the following pipetting scheme has to be followed:

| Dilution | Allergen - dilution | Heparinized whole blood | Release Buffer | Anti-IgE Antiserum |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|----------------|--------------------|
| 10^{-1} | 200 µl | 200 µl | | |
| 10^{-2} | 200 µl | 200 µl | | |
| 10^{-3} | 200 µl | 200 µl | | |
| Spontaneous - Release | | 200 µl | 200 µl | |
| Positive - Control | | 200 µl | | 200 µl |

6.4 Pipetting scheme Release

| | allergen induced release | positive control | spontaneous release | total Histamine |
|---|--------------------------|------------------|---------------------|--|
| Release-Buffer | | | 200 µl | 360 µl |
| allergene dilution | 200 µl | | | |
| anti-IgE | | 200 µl | | |
| Heparinized Whole Blood | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 40 µl |
| mix carefully incubate for 60 min at 37 °C | | | | mix carefully incubate for 10 min at 90 °C |
| Incubate for 10 min in an ice bath Centrifuge for 10 min at 700 x g (brake switched-off) Take 50 µl for the Acylation | | | | |

Storage of Supernatants

| | |
|----------|--------|
| 2 - 8 °C | -20 °C |
| 1 d | 1 week |

6.5 Acylation

The Acylation has to be done with the Histamine ELISA test kit, starting with Chapter 6 Test procedure of the test instructions.

6.6 Histamine ELISA

The quantification of the Histamine has to be done with the Histamine ELISA test kit.

7. Calculation of results

| Measuring range | Histamine |
|-----------------|-------------------|
| | 0.12 - 50 ng/ml |
| | 108 - 450 nmol/ml |

The histamine concentrations of the samples from the **release test** can be read directly from the standard curve of the Histamine ELISA.

■ *The Histamine ELISA is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.*

The results for the **total histamine** have to be **multiplied by factor 5**.

The histamine concentration from spontaneous release has to be subtracted from the allergen-induced histamine.

Expected reference values

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Total Histamine | < 60 ng/ml |
| Spontaneous Release | < 5 % of total histamine value |
| Positive Control | > 5 % of total histamine value |
| Allergen Induced Release | > 5 % of total histamine value |

7.1 Quality control

The valid confidence limits for the kit controls are listed in the QC-Report included in the kit.

8. Assay characteristics







Please refer to the instructions for use of the Histamine ELISA, chapter 8.

9. References/Literature

Please refer to the instructions for use of the Histamine ELISA, chapter 9.

■ **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

Symbols:

| | | | | | |
|---|------------------------------|---|------------------|---|-----------------------------------|
|  | Storage temperature |  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Expiry date | LOT | Batch code | IVD | For in-vitro diagnostic use only! |
|  | Consult instructions for use | CONT | Content | CE | CE labelled |
|  | Caution | REF | Catalogue number | | |

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Zusatzkit für die quantitative Bestimmung des Histamin-Release in heparinisiertem Vollblut (dieses Produkt ist nur zur Verwendung in Verbindung mit dem Histamin ELISA, kontaktieren Sie Ihren Anbieter für weitere Informationen).

Histamin (β -Imidazoethylamin) ist beim Menschen der wichtigste Mediatorstoff und tritt vor allem in der Initialphase der anaphylaktischen Reaktion (Allergie des Soforttyps) in Erscheinung. Histamin entsteht durch die enzymatische Decarboxylierung des Histidins. Im Organismus ist Histamin in fast allen Geweben vorhanden. Hauptsächlich ist es in den metachromatischen Granula der Mastzellen und den basophilen Leukozyten gespeichert. Es liegt in einer inaktiven, gebundenen Form vor und wird erst bei Bedarf freigesetzt.

Histamin wirkt vorwiegend auf glatte Muskulatur und Blutgefäße. Beim Menschen ist es für die Bronchokonstriktion während der akuten Phase verantwortlich. In den Gefäßen ist die konstriktive Wirkung von Histamin auf die Venolen begrenzt, wohingegen Arteriolen erweitert werden. Darüber hinaus bewirkt Histamin eine Kontraktion der Zellen des Gefäßendothels und erhöht die Gefäßpermeabilität. Auf diese Weise können höhermolekulare Substanzen in das Gewebe übertreten.

Wie auch mehrere andere Mediatoren vermittelt Histamin nicht ausschließlich unterschiedliche klinische Symptome der Anaphylaxie, sondern induziert darüber hinaus eine Reihe von Wirkungen, die auf die Beendigung der anaphylaktischen Reaktion abzielen. Histamin kann die Freisetzung von lysosomalen Enzymen aus den polymorphkernigen Leukozyten, die Degranulation von Mastzellen und Basophilen und die Bildung von Komplement-Bestandteilen durch mononukleäre Phagozyten hemmen. Darüber hinaus kann Histamin T-Suppressorzellen aktivieren und dadurch die IgE-Produktion hemmen. Die biologische Wirkung von Histamin im Gewebe wird über drei verschiedenen Oberflächenrezeptoren vermittelt: die H1-, H2- und H3-Rezeptoren.

Das klinische Interesse an der Histamin-Bestimmung liegt einmal in der Quantifizierung der Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten bei Allergien des Soforttyps sowie der Histaminmenge, die in den verschiedenen Körperflüssigkeiten vorhanden ist (Plasma, Urin, Zellkulturüberstände), nachdem eine Allergenzufuhr stattgefunden hat. Der erste Kontakt des Organismus mit einem Allergen führt noch nicht zur Auslösung einer Histaminfreisetzung. Zuerst werden spezifische IgE-Antikörper gebildet. Diese wandern zu den Mastzellen und binden sich dort an die Rezeptoren. Beim zweiten Allergenkontakt ist dann keine Umwandlung einer B-Zelle zur Plasmazelle mehr erforderlich und Mastzellen mit spezifischen IgE-Antikörpern liegen bereits vor. Das Allergen begibt sich unmittelbar zu den an den Mastzellen verankerten IgE-Antikörpern und bindet sich an diese. Die Mastzelle reagiert, indem ihre Granula Histamin freisetzen.

Der direkte Nachweis von Mediator-Substanzen wie Histamin während einer allergischen Reaktion ist nicht nur wissenschaftlich von Interesse, sondern hat im Hinblick auf eine spezifische antagonistische Therapie möglicherweise auch praktische Bedeutung.

Patientenblut wird in Reagenzröhrchen mit unterschiedlichen Konzentrationen des vermuteten Allergens inkubiert. Als Probenmaterial wird heparinisierendes Blut verwendet. Dabei kommt es bei entsprechender Sensibilisierung zu einer Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten. Das freigesetzte Histamin wird im Überstand mit einem spezifischen Plasma-Immunoassay (Histamine ELISA, mit dem dieser Zusatzkit bezogen werden kann) gemessen und zu einer 100 % Kontrolle (= Total-Histamin) sowie zum Leerwert (= Spontanrelease) in Beziehung gesetzt (prozentuale Histaminfreisetzung). Besondere Bedeutung hat dieser Test in Situationen, wo kein RAST erhältlich ist. Zusätzlich zum Nachweis von IgE-Antikörpern auf der Basophilenoberfläche erfasst dieser Test auch die "Freisetzungsfähigkeit" der Zellen (Releasability), die bei verschiedenen atopischen Erkrankungen von Bedeutung ist.

1.2 Klinische Anwendung

Bitte lesen Sie die Arbeitsanleitung Histamin ELISA, **Kapitel 1.2**.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

Bitte lesen Sie die Arbeitsanleitung Histamin ELISA, **Kapitel 2**.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA E-1145 **ANTI-IGE** **Anti-IgE-Antiserum - Konzentrat**

Inhalt: Kaninchen Anti-Human IgE Antikörper

Volumen: 1 x 25 µl/Röhrchen

BA E-1126 **RELEASE-BUFF** **Release Buffer – Gebrauchsfertig**

Inhalt: Puffer mit physiologischem pH

Volumen: 1 x 50 ml/Fläschchen, Deckel orange

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 5 – 500 µl
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung

Heparinisiertes Vollblut

Die Patienten sollten 24 Stunden vor der Blutabnahme jegliche Einnahme Allergie auslösender Medikamente, Antihistaminika, oraler Corticosteroide und Substanzen, die die H2-Rezeptoren blockieren, vermeiden.

Für den Histamin Release ist heparinisiertes Vollblut erforderlich, d. h. das durch Venenpunktion entnommene Vollblut wird in mit Heparin präparierten Blutabnahmegefäßen (z.B. Monovette™ oder Vacuette™) nach Angaben des Herstellers entnommen und direkt vorsichtig durchmischt.

Die Probe ist maximal 24 Stunden bei 20 - 25°C stabil. Das Vollblut nicht gekühlt lagern, da dies zur Verklumpung der Leukozyten führen kann.

Die folgenden Mengen an Vollblut werden benötigt:

- 40 µl für die Bestimmung des Total-Histamins
- 200 µl für die spontane Freisetzung
- 200 µl für die Positiv-Kontrolle des Anti-IgE
- 200 µl für jede individuelle Allergen-Konzentration

Beispiel: Man benötigt für eine Studie mit 4 Allergenen à 3 Konzentrationen pro Allergen insgesamt ca. 2,5 ml Vollblut.

| | | |
|-------------|------------|---|
| Lagerung: | 20 - 25 °C | Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. |
| Stabilität: | 24 Stunden | Nicht kühlen. Bei 2 - 8 °C verklumpen die Leukozyten. |

Lagerung der Überstände: Siehe Kapitel 6.4

6. Testdurchführung

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Anti-IgE-Antiserum Konzentrat:

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung des Anti-IgE- Antiserums, 5 µl ANTI-IGE zu 5 ml RELEASE-BUFF geben.

| | | |
|--|----------|---------|
| Lagerung des gelösten Anti-IgE-Antiserums: | 2 - 8 °C | - 20 °C |
| Stabilität des gelösten Anti-IgE-Antiserums: | 3 Tage | 1 Monat |

6.2 Freisetzung des Allergen-induzierten Histamins

Verdünnung des Allergens

Eine Stocklösung mit 1 mg Allergen pro ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-rein) herstellen und eine Reihe von 10-fach-Verdünnungen, wie im nachfolgenden Schema erklärt, erstellen (Beispiel für 3 Verdünnungsschritte):

| Nr. | Verdünnung | Allergen-Verdünnung | RELEASE-BUFF |
|-----|------------------|------------------------|--------------|
| 1 | 10 ⁻¹ | 50 µl Stocklösung | 450 µl |
| 2 | 10 ⁻² | 50 µl Verdünnung Nr. 1 | 450 µl |
| 3 | 10 ⁻³ | 50 µl Verdünnung Nr. 2 | 450 µl |

6.3 Histamin Release Protokoll (Beispiel für 3 Verdünnungsschritte)

Für jedes an einem Patienten getestete Allergen müssen die folgenden Pipettierschemen befolgt werden:

| Verdünnung | Allergen-Verdünnung | heparinisiertes Vollblut | RELEASE-BUFF | Anti-IgE Antiserum |
|----------------------|---------------------|--------------------------|--------------|--------------------|
| 10 ⁻¹ | 200 µl | 200 µl | | |
| 10 ⁻² | 200 µl | 200 µl | | |
| 10 ⁻³ | 200 µl | 200 µl | | |
| spontane Freisetzung | | 200 µl | 200 µl | |
| Positiv - Kontrolle | | 200 µl | | 200 µl |

6.4 Pipettierschema Freisetzung

| | Allergen-induzierte Freisetzungen | Positiv - Kontrolle | spontane Freisetzung | Total-Histamin |
|--|-----------------------------------|---------------------|----------------------|--|
| RELEASE-BUFF | | | 200 µl | 360 µl |
| Allergen-Verdünnung anti-IgE | 200 µl | | | |
| heparinisiertes Vollblut | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 40 µl |
| vorsichtig mischen für 60 Min bei 37 °C inkubieren | | | | vorsichtig mischen für 10 Min bei 90 °C inkubieren |
| für 10 Min in einem Eisbad inkubieren für 10 Min bei 700 x g zentrifugieren (mit ausgeschalteter Bremse) 50 µl für die Azylierung nehmen | | | | |

Lagerung der Überstände:

| | |
|----------|---------|
| 2 - 8 °C | -20 °C |
| 1 Tag | 1 Woche |

6.5 Azylierung

Die Azylierung wird mit dem Histamin ELISA Kit durchgeführt, angefangen bei Kapitel 6 **Testdurchführung** der Arbeitsanleitung.

6.6 Histamin ELISA

Die Histaminbestimmung wird mit dem Histamin ELISA Kit durchgeführt.

7. Berechnung der Ergebnisse

| Messbereich | Histamin |
|-------------|-------------------|
| | 0.12 - 50 ng/ml |
| | 108 - 450 nmol/ml |

Die Histaminkonzentration der Proben des **Release Tests** kann direkt von der Standardkurve des Histamin ELISA abgelesen werden.

Der Histamin ELISA ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.

Die Ergebnisse des **totalen Histamins** müssen mit dem **Faktor 5 multipliziert** werden.

Die Histaminkonzentration der spontanen Freisetzung muss von der Konzentration des Allergen-induzierten Histamins abgezogen werden.

Erwartete Referenzwerte

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

| | |
|--|---------------------------------|
| Total-Histamin | < 60 ng/ml |
| spontane Freisetzung | < 5 % des Total-Histamin Wertes |
| Positiv - Kontrolle | > 5 % des Total-Histamin Wertes |
| Allergen-induzierte Freisetzung | > 5 % des Wert Total-Histamin |

7.1 Qualitätskontrolle

Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind im beiliegenden QC-Report aufgeführt.

8. Testcharakteristika












Bitte beziehen Sie sich auf die Arbeitsanleitung Histamin ELISA, Kapitel 8.

9. Referenzen/Literatur

Bitte beziehen Sie sich auf die Arbeitsanleitung Histamin ELISA, Kapitel 9.

■ **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

Symbole:

| | | | | | |
|---|--|---|----------------|---|------------------------------------|
|  | Lagertemperatur |  | Hersteller |  | Enthält Testmaterial für <n> Teste |
|  | Verwendbar bis |  | Chargennummer |  | In vitro Diagnostikum |
|  | Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen |  | Inhalt |  | CE gekennzeichnet |
|  | Achtung |  | Katalog-Nummer | | |