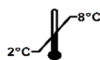


**Instructions for use / Gebrauchsanweisung**  
**Histamine ELISA**

**REF**

**BA E-1000**



**IVD**



96

---

## Table of contents

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Introduction  | 4  |
| 1.1   | Intended use and principle of the test                    | 4  |
| 1.2   | Clinical application                                      | 4  |
| 2.    | Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations | 4  |
| 2.1   | Procedural cautions, guidelines and warnings              | 4  |
| 2.2   | Limitations   | 5  |
| 2.2.1 | Interfering substances and proper handling of specimens   | 5  |
| 2.2.2 | Drug and food interferences                               | 5  |
| 2.2.3 | High-Dose-Hook effect                                     | 5  |
| 3.    | Storage and stability                                     | 5  |
| 4.    | Materials   | 5  |
| 4.1   | Contents of the kit                                       | 5  |
| 4.2   | Calibration and Controls                                  | 7  |
| 4.3   | Additional materials required but not provided in the kit | 7  |
| 4.4   | Additional equipment required but not provided in the kit | 7  |
| 5.    | Sample collection and storage                             | 7  |
| 6.    | Test procedure  | 7  |
| 6.1   | Preparation of reagents and further notes                 | 8  |
| 6.2   | Sample preparation and acylation                          | 8  |
| 6.3   | Histamine ELISA   | 8  |
| 7.    | Calculation of results                                    | 9  |
| 7.1   | Expected reference value                                  | 9  |
| 7.2   | Typical standard curve                                    | 9  |
| 8.    | Quality control   | 10 |
| 9.    | Assay characteristics                                     | 10 |
| 9.1   | Performance data  | 10 |
| 9.2   | Metrological Traceability                                 | 11 |
| 10.   | References/Literature                                     | 11 |
| 11.   | Changes   | 12 |

## **Inhaltsverzeichnis**

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | Einleitung   | 13 |
| 1.1   | Verwendungszweck und Testprinzip   | 13 |
| 1.2   | Klinische Anwendung  | 13 |
| 2.    | Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen         | 13 |
| 2.1   | Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen                            | 13 |
| 2.2   | Grenzen des Tests  | 14 |
| 2.2.1 | Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben                          | 14 |
| 2.2.2 | Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel                       | 15 |
| 2.2.3 | High-Dose-Hook Effekt  | 15 |
| 3.    | Lagerung und Haltbarkeit   | 15 |
| 4.    | Materialien  | 15 |
| 4.1   | Reagenzien im Kit  | 15 |
| 4.2   | Kalibratoren und Kontrollen  | 16 |
| 4.3   | Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien | 16 |
| 4.4   | Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte      | 16 |
| 5.    | Probenbehandlung und Lagerung  | 16 |
| 6.    | Testdurchführung   | 17 |
| 6.1   | Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise                                 | 17 |
| 6.2   | Probenvorbereitung und Azylierung  | 17 |
| 6.3   | Histamin ELISA   | 18 |
| 7.    | Berechnung der Ergebnisse  | 18 |
| 7.1   | Erwartete Referenzbereiche   | 18 |
| 7.2   | Typische Standardkurve   | 19 |
| 8.    | Kontrollproben   | 19 |
| 9.    | Assaycharakteristika   | 19 |
| 9.1   | Leistungsdaten   | 19 |
| 9.2   | Metrologische Rückführbarkeit  | 20 |
| 10.   | Referenzen/Literatur   | 21 |
| 11.   | Änderungen   | 21 |

## **1. Introduction**

### **1.1 Intended use and principle of the test**

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of histamine in urine and plasma to assess histamine balance.

The determination of histamine in plasma helps, among other things, in the assessment of anaphylactic or allergic reactions or mast cell activation.

In the first part of the procedure, histamine is quantitatively acylated to N-acyl histamine. The subsequent competitive ELISA kit uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated analyte concentrations in the standards, controls and samples and the solid phase bound analyte compete for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-goat IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a standard curve prepared with known standard concentrations.

Manual processing is recommended. The use of laboratory automation is the responsibility of the user. This IVD is intended for professional use only.

### **1.2 Clinical application**

Histamine is a biogenic amine and neurotransmitter and is formed from the amino acid L-histidine [1, 2]. It is synthesized and stored in mast cells and basophils until it is released upon appropriate stimulation and finally degraded by diamine oxidase and N-methyltransferase [2 – 4]. Histamine is involved in many mechanisms through its release, such as immunological, physiological, and inflammatory mechanisms, as well as smooth muscle contraction, vasodilation, and increased vascular permeability [2, 5 – 8]. These mechanisms may result in various clinical pathologies such as diabetes, migraine, and stress, or may also affect sleep/wake states [1, 2, 4, 9 – 11]. Histamine has been widely described as a mediator of allergic reactions, such as hay fever, skin eczema, asthma, and anaphylactic reactions [3, 8, 12, 13]. Thus, histamine testing in food intolerances or other allergic reactions can provide an indication of the severity of the intolerance or allergy [14]. If the histamine value is outside the reference range, the results should be clarified with a therapist or physician to discuss further action.

In addition, therapeutic consequences should never be drawn solely based on laboratory values, even if they are assessed in accordance with the quality criteria of the method. Each laboratory result always contributes to only part of the clinical picture. Only if the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture may therapeutic consequences be derived from them. The laboratory values themselves must never be the sole reason for any resulting therapeutic consequences.

## **2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations**

### **2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings**

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and must be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in Intended Use (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) must be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials, and devices are prepared for use at the appropriate time.

- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report provided with the kit.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water.
- (17) For information about hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

## 2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

#### Urine

Please note the sample collection! It cannot be excluded that high acid concentrations lead to incorrect results.

#### Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results.

Hemolytic samples (up to 1 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 0.5 mg/ml bilirubin) and lipemic samples (up to 16 mg/ml triglycerides) have no influence on the assay results.

If the concentrations cannot be estimated and there are doubts as to whether the above limit values for hemolytic, icteric or lipemic samples are complied with, the samples should not be used in the assay.

### 2.2.2 Drug and food interferences

Foods rich in histamine and foods that promote histamine release should be avoided for 12 hours prior to sampling. These are mainly: alcoholic beverages, cheese, fruit, nuts, seafood and raw sausages. For a more detailed list of these foods, please contact a physician or the manufacturer.

Furthermore, certain medications (diamine oxidase inhibitors, histamine N-methyltransferase inhibitors) are able to influence histamine levels.

### 2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

## 3. Storage and stability



Store kit and 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 2 months when stored at 2 – 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

## 4. Materials

### 4.1 Contents of the kit

**BA D-0024**      **REAC-PLATE**      **Reaction Plate** – ready to use

Content:            1 x 96 well plate, empty in a resealable pouch

|                         |   |   |
|-------------------------|---|---|
| <b>BA D-0090</b>        | <b>FOILS</b>  | <b>Adhesive Foil</b> – ready to use               |
| Content:                | Adhesive foils in a resealable pouch  |   |
| Volume:                 | 1 x 4 foils   |   |
| <b>BA E-0030</b>        | <b>WASH-CONC 50x</b>  | <b>Wash Buffer Concentrate</b> – concentrated 50x |
| Content:                | Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH  |   |
| Volume:                 | 1 x 20 ml/vial, purple cap  |   |
| <b>BA E-0055</b>        | <b>SUBSTRATE</b>  | <b>Substrate</b> – ready to use                   |
| Content:                | Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide |   |
| Volume:                 | 1 x 12 ml/vial, black cap   |   |
| <b>BA E-0080</b>        | <b>STOP-SOLN</b>  | <b>Stop Solution</b> – ready to use               |
| Content:                | 0.25 M sulfuric acid  |   |
| Volume:                 | 1 x 12 ml/vial, grey cap  |   |
| Hazards identification: |              | H290 May be corrosive to metals.                  |
| <b>BA E-0085</b>        | <b>ACYL-SOLV</b>  | <b>Acylation Solvent</b> – ready to use           |
| Content:                | Organic solvent   |   |
| Volume:                 | 1 x 5 ml/vial, brown cap  |   |
| Hazards identification: |              | H225 Highly flammable liquid and vapor.           |
| <b>BA E-1010</b>        | <b>AS HIS</b>   | <b>Histamine Antiserum</b> – ready to use         |
| Content:                | Goat anti-histamine antibody, in protein containing buffer, blue colored                      |   |
| Volume:                 | 1 x 12 ml/vial, blue cap  |   |
| Description:            | Species of the antibody is goat; species of the protein in the buffer is bovine               |   |
| <b>BA E-1011</b>        | <b>ACYL-BUFF</b>  | <b>Acylation Buffer</b> – ready to use            |
| Content:                | Buffer with proteins and mercury-free preservatives   |   |
| Volume:                 | 1 x 4 ml/vial, light pink cap   |   |
| Description:            | Species of the protein in the buffer is bovine  |   |
| <b>BA E-1012</b>        | <b>ACYL-REAG</b>  | <b>Acylation Reagent</b> – lyophilized            |
| Content:                | Lyophilized acylation reagent   |   |
| Volume:                 | 2 vials, purple cap   |   |
| <b>BA E-1031</b>        | <b>W HIS</b>  | <b>Histamine Microtiter Strips</b> – ready to use |
| Content:                | 1 x 96 Well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant     |   |
| <b>BA E-1040</b>        | <b>CONJUGATE</b>  | <b>Enzyme Conjugate</b> – ready to use            |
| Content:                | Donkey anti-goat immunoglobulins conjugated with peroxidase                                   |   |
| Volume:                 | 1 x 12 ml/vial, red cap   |   |
| Description:            | Species is donkey   |   |

## 4.2 Calibration and Controls

**Standards and Controls** – ready to use

| Cat. no.  | Component         | Color/Cap | Concentration<br>[ng/ml] HIS  | Concentration<br>[nmol/l] HIS | Volume/<br>Vial |
|-----------|-------------------|-----------|---|-------------------------------|-----------------|
| BA E-1001 | <b>STANDARD A</b> | white     | 0   | 0                             | 4 ml            |
| BA E-1002 | <b>STANDARD B</b> | yellow    | 0.5   | 4.5                           | 4 ml            |
| BA E-1003 | <b>STANDARD C</b> | orange    | 1.5   | 13.5                          | 4 ml            |
| BA E-1004 | <b>STANDARD D</b> | blue      | 5   | 45                            | 4 ml            |
| BA E-1005 | <b>STANDARD E</b> | grey      | 15  | 135                           | 4 ml            |
| BA E-1006 | <b>STANDARD F</b> | black     | 50  | 450                           | 4 ml            |
| BA E-1051 | <b>CONTROL 1</b>  | green     | Expected concentrations and acceptance ranges are indicated on the QC-Report. |                               | 4 ml            |
| BA E-1052 | <b>CONTROL 2</b>  | red       |   |                               | 4 ml            |

Conversion: histamine (ng/ml) x 9 = histamine (nmol/l)

Content: Acidic buffer spiked with a defined quantity of histamine.

## 4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

## 4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 2000 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
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer

## 5. Sample collection and storage

Repeated thawing and freezing of all samples should be avoided!

### EDTA-Plasma

Whole blood should be collected by venipuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant and centrifuged according to manufacturer's instructions at room temperature immediately after collection. When using gel collection tubes, the plasma must be collected immediately after centrifugation and frozen separately, otherwise there is a possibility of obtaining false positive results. Hemolytic, icteric and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 24 hours at 2 – 8 °C, for longer period (up to 6 months) at < -15 °C.

### Spontaneous urine

Spontaneous urine should be collected in a sample cup, stabilized with 10 µl of 6 M HCl to 1 ml of urine. The measurement results are related to the creatinine content of the sample.

Storage: up to 24 hours at 18 – 25 °C, up to 5 days at 2 – 8 °C, for longer period (up to 6 months) at < -15 °C. Avoid exposure to direct sunlight.

### 24-hour urine

10 – 15 ml of 6 M HCl is placed in the collection container to stabilize the collected urine. For the quantitative determination of the amounts of histamine excreted in a day, it is necessary to determine the volume of the day's urine and to note it for the later evaluation of the results. The measurement results can also be related to the creatine content of the sample.

Storage: up to 24 hours at 18 – 25 °C, up to 5 days at 2 – 8 °C, for longer period (up to 6 months) at < -15 °C. Avoid exposure to direct sunlight.

## 6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Determinations in duplicate are recommended. Number the microwell plates (microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up).

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the enzyme immunoassay is between 20 and 25 °C.

⚠ The use of a microtiter plate shaker with the following specifications is mandatory: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm. Shaking with differing settings might influence the results.

## 6.1 Preparation of reagents and further notes

### Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC** **50x** with water to a final volume of 1000 ml.

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

### Acylation Solution

Reconstitute each vial of the **ACYL-REAG** (BA E-1012) with 2 ml **ACYL-SOLV** (BA E-0085). Please make sure that it is completely dissolved before use.

If more than 2 ml are needed, pool the contents of the individual vials and mix thoroughly.

Storage: 1 month at 2 – 8 °C

### Histamine Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

## 6.2 Sample preparation and acylation

|    |   |
|----|---|
| 1. | Pipette <b>25 µl</b> of <b>standards, controls</b> and <b>plasma samples</b> or <b>10 µl</b> of <b>urine samples</b> into the respective wells of the <b>REAC-PLATE</b> . |
| 2. | Add <b>25 µl</b> <b>ACYL-BUFF</b> to all wells.   |
| 3. | Add <b>25 µl</b> <b>Acylation Solution</b> to all wells.  |
| 4. | Incubate for <b>45 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).  |
| 5. | Add <b>100 µl</b> of <b>water</b> (deionized, distilled or ultra-pure) to all wells.  |
| 6. | Incubate for <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).  |
| ⚠  | Take <b>25 µl</b> of the prepared <b>standards, controls</b> and <b>samples</b> for the <b>Histamine ELISA</b> .  |

## 6.3 Histamine ELISA

|     |  |
|-----|--|
| 1.  | Pipette <b>25 µl</b> of the <b>acylated standards, controls</b> and <b>samples</b> into the appropriate wells of the <b>W</b> <b>HIS</b> .   |
| 2.  | Pipette <b>100 µl</b> of the <b>AS HIS</b> into all wells and cover plate with <b>FOIL</b> .   |
| 3.  | Incubate for <b>3 h</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).  |
| 4.  | Remove the <b>FOIL</b> . Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 times</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash buffer, discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material. |
| 5.  | Pipette <b>100 µl</b> of the <b>CONJUGATE</b> into each well.  |
| 6.  | Incubate <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).   |
| 7.  | Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 times</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash buffer, discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.                          |
| 8.  | Pipette <b>100 µl</b> of the <b>SUBSTRATE</b> into each well and incubate for <b>20 – 30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>   |
| 9.  | Add <b>100 µl</b> of the <b>STOP-SOLN</b> to all wells and shake the microtiter plate shortly.   |
| 10. | <b>Read</b> the absorbance of the solution in the wells within 10 min, using a microtiter plate reader set to <b>450 nm</b> (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).  |



## 7. Calculation of results

| Measuring range | Histamine |                  |
|-----------------|-----------|------------------|
|                 | Urine     | 0.91 – 125 ng/ml |
|                 | Plasma    | 0.32 – 50 ng/ml  |

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 ng/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use non-linear regression for curve fitting (e. g. 4-parameter, marquardt).

⚠ *This assay 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.*

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with 0.1 M HCl and have to be re-assayed.

### Plasma samples and controls

The concentrations of the plasma samples and controls can be read directly from the standard curve.

### Urine samples

The concentrations of the urine samples read from the standard curve must be **multiplied** by a factor of **2.5**.

Histamine related to the creatinine content of the sample:  $\mu\text{g/g creatinine} = \frac{\mu\text{g histamine}}{\text{g creatinine}}$

The daily amount of histamine excreted in urine within 24 h is calculated as follows:

$$\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$$

**Conversion:** histamine (ng/ml) x 9 = histamine (nmol/l)

### 7.1 Expected reference value

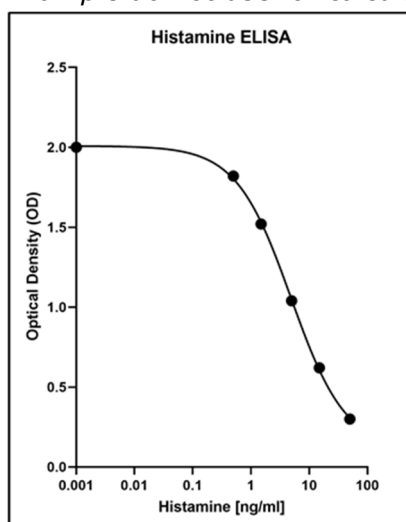
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

The expected reference ranges were determined in an internal study by testing 140 (EDTA-plasma), 63 (spontaneous urine) and 185 (24h urine) samples (European population) (95% reference interval).

| Expected reference value |  |
|--------------------------|--|
| Spontaneous urine        | 6 – 43 $\mu\text{g/g creatinine}$<br>6.1 – 43.8 $\mu\text{mol/mol creatinine}$   |
| 24h urine                | 5 – 56 $\mu\text{g}/24\text{h}$<br>45 – 504 $\text{nmol}/24\text{h}$<br>8 – 38 $\mu\text{g/g creatinine}$<br>8.1 – 38.7 $\mu\text{mol/mol creatinine}$ |
| EDTA-plasma              | $\leq 1.98 \text{ ng/ml}$<br>$\leq 17.8 \text{ nmol/l}$  |

### 7.2 Typical standard curve

⚠ *Example do not use for calculation!*



## 8. Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples. Control samples should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are printed on the QC-Report.

## 9. Assay characteristics

### 9.1 Performance data

| <b>Precision</b>             |        |                   |                              |        |        |                   |        |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|--------|--------|-------------------|--------|
| <b>Intra-Assay Variation</b> |        |                   | <b>Inter-Assay Variation</b> |        |        |                   |        |
|                              | Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%]                       |        | Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| Urine                        | 1      | 9.7 ± 1.5         | 15.0                         | Urine  | 1      | 8.2 ± 0.94        | 11.4   |
|                              | 2      | 18.6 ± 2.4        | 12.8                         |        | 2      | 12.8 ± 1.7        | 13.1   |
|                              |        |                   |                              |        | 3      | 42.2 ± 6.0        | 14.3   |
| Plasma                       | 1      | 1.2 ± 0.18        | 15.8                         | Plasma | 1      | 0.78 ± 0.15       | 19.2   |
|                              | 2      | 5.0 ± 0.59        | 11.8                         |        | 2      | 4.8 ± 0.36        | 7.6    |
|                              |        |                   |                              |        | 3      | 10.2 ± 0.79       | 7.7    |

| <b>Analytical Sensitivity</b> |        |            |
|-------------------------------|--------|------------|
| Limit of Blank (LOB)          | Urine  | 0.19 ng/ml |
|                               | Plasma | 0.12 ng/ml |
| Limit of Detection (LOD)      | Urine  | 0.26 ng/ml |
|                               | Plasma | 0.19 ng/ml |
| Limit of Quantification (LOQ) | Urine  | 0.91 ng/ml |
|                               | Plasma | 0.32 ng/ml |

| <b>Recovery</b> |               |          |           |
|-----------------|---------------|----------|-----------|
|                 | Range [ng/ml] | Mean [%] | Range [%] |
| Urine           | 14.0 – 105    | 109      | 101 – 119 |
| Plasma          | 0.36 – 6.5    | 84       | 78 – 89   |

| <b>Linearity</b> |                       |          |           |
|------------------|-----------------------|----------|-----------|
|                  | Serial dilution up to | Mean [%] | Range [%] |
| Urine            | 1:64                  | 130      | 122 – 135 |
| Plasma           | 1:64                  | 117      | 104 – 128 |

| <b>Analytical Specificity (Cross Reactivity)</b> |                      |
|--|----------------------|
| Substance  | Cross Reactivity [%] |
| Histamine  | 100                  |
| 3-Methyl-Histamine                               | 0.1                  |
| Tyramine   | 0.01                 |
| L-Phenylalanine                                  | < 0.001              |
| L-Histidine                                      | < 0.001              |
| L-Tyrosine                                       | < 0.001              |
| Tryptamine                                       | < 0.001              |
| 5-Hydroxy-Indole-Acetic Acid                     | < 0.001              |
| Serotonin  | < 0.001              |

|  |  |
|--|--|
| <b>Method comparison (urine):<br/>ELISA vs. LC-MS/MS</b> | LC-MS/MS = 0.8x – 3.2; r <sup>2</sup> = 0.98; n = 35 |
| <b>Method comparison (plasma):<br/>ELISA vs. RIA</b>     | RIA = 1.4x + 0.65; r <sup>2</sup> = 0.95; n = 37     |

| <b>Lot-to-Lot</b>                      |        |                            |        |
|--|--------|----------------------------|--------|
|  | Sample | Range [ng/ml] Mean<br>± SD | CV [%] |
| Histamine in artificial matrix (n = 4) | 1      | 8.4 ± 0.43                 | 5.2    |
|  | 2      | 36.0 ± 2.2                 | 6.2    |
| Histamine in plasma (n = 3)            | 1      | 0.53 ± 0.15                | 28.6   |
|  | 2      | 6.7 ± 0.25                 | 3.8    |

## 9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Histamine ELISA are traceable to the weighing.

| <b>Standards and Controls</b> | Uncertainty [%] |
|-------------------------------|-----------------|
|                               | 1.3             |

| <b>Histamine ELISA</b> |                       |                                 |
|------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Urine                  | Concentration [ng/ml] | Expanded Uncertainty [%] k = 2* |
|                        | 8.2                   | 23.0                            |
|                        | 12.8                  | 26.3                            |
|                        | 42.2                  | 28.7                            |
| Plasma                 | Concentration [ng/ml] | Expanded Uncertainty [%] k = 2* |
|                        | 0.78                  | 38.5                            |
|                        | 4.8                   | 15.4                            |
|                        | 10.2                  | 15.6                            |

\* This defines an interval about the measured result that will include the true value with a probability of 95%.

## 10. References/Literature














1. Barata-Antunes, S., et al., Dual role of histamine on microglia-induced neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. 1863(3): p. 764 – 769.
2. Worm, J., K. Falkenberg, and J. Olesen, Histamine and migraine revisited: mechanisms and possible drug targets. *J Headache Pain*, 2019. 20(1): p. 30.
3. Yamauchi, K. and M. Ogasawara, The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(7).
4. Hu, W. and Z. Chen, The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacol Ther*, 2017. 175: p. 116 – 132.
5. Branco, A., et al., Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2018. 2018: p. 9524075.
6. Ferstl, R., C.A. Akdis, and L. O'Mahony, Histamine regulation of innate and adaptive immunity. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012. 17: p. 40 – 53.
7. Hungerford, J.M., Scombroid poisoning: a review. *Toxicol*, 2010. 56(2): p. 231 – 43.
8. Smuda, C. and P.J. Bryce, New developments in the use of histamine and histamine receptors. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011. 11(2): p. 94 – 100.
9. Pini, A., et al., Histamine and diabetic nephropathy: an up-to-date overview. *Clin Sci (Lond)*, 2019. 133(1): p. 41 – 54.
10. Scammell, T.E., et al., Histamine: neural circuits and new medications. *Sleep*, 2019. 42(1).
11. Yuan, H. and S.D. Silberstein, Histamine and Migraine. *Headache*, 2018. 58(1): p. 184 – 193.
12. Thangam, E.B., et al., The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 1873.
13. Lieberman, P., The basics of histamine biology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2011. 106(2 Suppl): p. S2 – 5.
14. San Mauro Martin, I., S. Brachero, and E. Garicano Vilar, Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2016. 44(5): p. 475 – 83.

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

## 11. Changes

| Version | Release Date | Chapter | Change   |
|---------|--------------|---------|--|
| 18.0    | 2022-05-02   | All     | – The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746                     |
|         |              | 1.      | – Introduction   |
|         |              | 2.1     | – Procedural notes, guidelines and warnings  |
|         |              | 2.2.2   | – Drug and food interferences  |
|         |              | 5.      | – Sample collection and storage  |
|         |              | 6.2     | – Whole blood (Histamine Release) removed  |
|         |              | 6.3     | – Alternative antiserum incubation overnight was removed                                 |
|         |              | 7.      | – Measuring range, expected reference value and typical standard curve have been updated |
|         |              | 9.1     | – Performance data updated and Lot-to-Lot added  |
|         |              | 9.2     | – Metrological traceability added  |
|         |              | 10.     | – References/Literature updated  |

### Symbols:

|   |                              |   |                  |   |                                   |
|---|------------------------------|---|------------------|---|-----------------------------------|
|  | Storage temperature          |  | Manufacturer     |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Use-by date                  |  | Batch code       |  | For in-vitro diagnostic use only! |
|  | Consult instructions for use |  | Content          |  | CE marking of conformity          |
|  | Caution                      |  | Catalogue number |  | Distributor                       |
|  | Date of manufacture          |   |                  |   |                                   |

## **1. Einleitung**

### **1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Urin und Plasma, um das Histamingleichgewicht zu beurteilen.

Die Bestimmung von Histamin in Plasma hilft u.a. bei der Beurteilung von anaphylaktischen bzw. allergischen Reaktionen oder Mastzellaktivierung.

Im ersten Teil der Durchführung wird Histamin zu N-azyl Histamin umgewandelt. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die Analytkonzentrationen der Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Analytkonzentrationen konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Wenn das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Ziege Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen. Die Konzentrationen der unbekannt Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.

Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses IVD ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

### **1.2 Klinische Anwendung**

Histamin ist ein biogenes Amin und Neurotransmitter und wird aus der Aminosäure L-Histidin gebildet [1, 2]. Es wird in Mastzellen und Basophilen synthetisiert und gespeichert, bis es bei entsprechender Stimulation freigesetzt und schließlich durch die Diaminoxidase und die N-Methyltransferase abgebaut werden kann [2 – 4].

Histamin ist durch seine Freisetzung an vielen Mechanismen beteiligt, wie z. B. immunologischen, physiologischen und inflammatorischen Mechanismen, sowie an der Kontraktion der glatten Muskulatur, an der Vasodilatation und an erhöhter vaskulärer Permeabilität [2, 5 – 8]. Diese Mechanismen können unterschiedliche klinische Pathologien wie z. B. Diabetes, Migräne und Stress zur Folge haben oder auch den Schlaf-/Wachzustand beeinflussen [1, 2, 4, 9 – 11].

Histamin ist als Mediator von allergischen Reaktionen, wie z. B. Heuschnupfen, Hautekzemen, Asthma und anaphylaktischen Reaktionen weitreichend beschrieben [3, 8, 12, 13]. So können Histaminuntersuchungen bei Nahrungsmittelunverträglichkeiten oder anderen allergischen Reaktionen einen Hinweis auf den Schweregrad der Unverträglichkeit bzw. Allergie geben [14].

Liegt der Histaminwert außerhalb des Referenzbereichs sollten die Ergebnisse mit einem Therapeuten oder Mediziner abgeklärt werden, um ein weiteres Vorgehen zu besprechen.

Zusätzlich sollten niemals therapeutische Konsequenzen allein aufgrund der Laborwerte herangezogen werden, auch wenn diese in Übereinstimmung mit den Qualitätskriterien der Methode beurteilt werden. Jedes Laborergebnis trägt immer nur zu einem Teil des klinischen Bildes bei. Nur wenn die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild stehen, dürfen daraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden. Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus resultierende therapeutische Konsequenzen sein.

## **2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen**

### **2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen**

- (1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter Verwendungszweck (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder

Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.

- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Wells sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potenziell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzintervalle erstellt.
- (20) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
- (21) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.

## **2.2 Grenzen des Tests**

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### **2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben**

#### **Urin**

Probenbehandlung beachten! Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein hoher Säuregehalt des Urins zu falschen Ergebnissen führt.

#### **Plasma**

Proben, die ein Präzipitat oder Fibrinfäden enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 1 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 0,5 mg/ml Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 16 mg/ml Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Sollten die Konzentrationen nicht abzuschätzen sein und Zweifel bestehen, ob die oben genannten Grenzwerte für hämolytische, ikterische oder lipämische Proben eingehalten werden, sollten die Proben nicht im Assay eingesetzt werden.

## 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Histaminreiche Nahrungsmittel und Nahrungsmittel, die eine Histaminausschüttung begünstigen, sollten 12 Stunden vor der Probennahme vermieden werden. Dies sind vor allem: Alkoholische Getränke, Käse, Obst, Nüsse, Meeresfrüchte und Rohwurstwaren. Für eine detailliertere Liste dieser Nahrungsmittel kontaktieren Sie bitte einen Arzt oder den Hersteller.

Außerdem können bestimmte Medikamente (Diaminoxidase-Blocker, Histamin-N-Methyltransferase-Blocker) den Histaminspiegel beeinflussen.

## 2.2.3 High-Dose-Hook Effekt


Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## 3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 – 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

## 4. Materialien

### 4.1 Reagenzien im Kit

|                   |   |   |
|-------------------|---|---|
| <b>BA D-0024</b>  | <b>REAC-PLATE</b>   | <b>Reaktionsplatte</b> – gebrauchsfertig          |
| Inhalt:           | 1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel                                |   |
| <b>BA D-0090</b>  | <b>FOILS</b>  | <b>Selbstklebende Folie</b> – gebrauchsfertig     |
| Inhalt:           | Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel   |   |
| Volumen:          | 1 x 4 Folien  |   |
| <b>BA E-0030</b>  | <b>WASH-CONC</b> <b>50x</b>   | <b>Waschpufferkonzentrat</b> – 50x konzentriert   |
| Inhalt:           | Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH                             |   |
| Volumen:          | 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila   |   |
| <b>BA E-0055</b>  | <b>SUBSTRATE</b>  | <b>Substrat</b> – gebrauchsfertig                 |
| Inhalt:           | Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid |   |
| Volumen:          | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz  |   |
| <b>BA E-0080</b>  | <b>STOP-SOLN</b>  | <b>Stopplösung</b> – gebrauchsfertig              |
| Inhalt:           | 0,25 M Schwefelsäure  |   |
| Volumen:          | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau   |   |
| Gefahrenhinweise: |            | H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.       |
| <b>BA E-0085</b>  | <b>ACYL-SOLV</b>  | <b>Azylierungslösungsmittel</b> – gebrauchsfertig |
| Inhalt:           | Organisches Lösungsmittel   |   |
| Volumen:          | 1 x 5 ml/Fläschchen, Deckel braun   |   |
| Gefahrenhinweise: |            | H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.     |
| <b>BA E-1010</b>  | <b>AS HIS</b>   | <b>Histamin Antiserum</b> – gebrauchsfertig       |
| Inhalt:           | Ziege anti-Histamin Antikörper in proteinhaltigem Puffer, blau gefärbt                        |   |
| Volumen:          | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel blau   |   |
| Beschreibung:     | Spezies des Antikörpers ist Ziege; Spezies des Proteins im Puffer ist Rind                    |   |

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| <b>BA E-1011</b> | <b>ACYL-BUFF</b>  | <b>Azylierungspuffer</b> – gebrauchsfertig           |
| Inhalt:          | Puffer mit Proteinen und quecksilberfreien Konservierungsmitteln  |  |
| Volumen:         | 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel hellrosa  |  |
| Beschreibung:    | Spezies des Proteins im Puffer ist Rind   |  |
| <b>BA E-1012</b> | <b>ACYL-REAG</b>  | <b>Azylierungsreagenz</b> – Lyophilisat              |
| Inhalt:          | Lyophilisiertes Azylierungsreagenz  |  |
| Volumen:         | 2 Fläschchen, Deckel lila   |  |
| <b>BA E-1031</b> | <b>HIS</b>  | <b>Histamin Mikrotiterstreifen</b> – gebrauchsfertig |
| Inhalt:          | 1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel |  |
| <b>BA E-1040</b> | <b>CONJUGATE</b>  | <b>Enzymkonjugat</b> – gebrauchsfertig               |
| Inhalt:          | Esel anti-Ziege Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase   |  |
| Volumen:         | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot  |  |
| Beschreibung:    | Spezies ist Esel  |  |

## 4.2 Kalibratoren und Kontrollen

### Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

| Artikelnr.       | Komponente        | Deckelfarbe | Konzentration<br>[ng/ml] <b>HIS</b>  | Konzentration<br>[nmol/l] <b>HIS</b> | Volumen/<br>Fläschchen |
|------------------|-------------------|-------------|--|--------------------------------------|------------------------|
| <b>BA E-1001</b> | <b>STANDARD A</b> | weiß        | 0  | 0                                    | 4 ml                   |
| <b>BA E-1002</b> | <b>STANDARD B</b> | gelb        | 0,5  | 4,5                                  | 4 ml                   |
| <b>BA E-1003</b> | <b>STANDARD C</b> | orange      | 1,5  | 13,5                                 | 4 ml                   |
| <b>BA E-1004</b> | <b>STANDARD D</b> | blau        | 5  | 45                                   | 4 ml                   |
| <b>BA E-1005</b> | <b>STANDARD E</b> | grau        | 15   | 135                                  | 4 ml                   |
| <b>BA E-1006</b> | <b>STANDARD F</b> | schwarz     | 50   | 450                                  | 4 ml                   |
| <b>BA E-1051</b> | <b>CONTROL 1</b>  | grün        | Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben. |                                      | 4 ml                   |
| <b>BA E-1052</b> | <b>CONTROL 2</b>  | rot         |  |                                      | 4 ml                   |

Umrechnung: Histamin (ng/ml) x 9 = Histamin (nmol/l)

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge Histamin.

### 4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- saugfähige Unterlage
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

### 4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 2000 µl
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer

## 5. Probenbehandlung und Lagerung

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren aller Proben sollte vermieden werden!

### EDTA-Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen sammeln und das Plasma direkt nach Angaben des Herstellers durch Zentrifugation von den übrigen Blutbestandteilen trennen. Bei der Verwendung von Gel-Abnahmeröhrchen muss das Plasma direkt nach der Zentrifugation abgenommen werden und separat eingefroren werden, da sonst die Möglichkeit besteht, falsch positive Ergebnisse zu erzielen. Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 2 – 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei < -15 °C.



## Spontanurin

Es soll Spontanurin in einem Probenbecher gesammelt werden, stabilisiert mit 10 µl 6 M HCl auf 1 ml Urin. Die Messergebnisse werden auf den Kreatiningehalt der Probe bezogen.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 18 – 25 °C, bis zu 5 Tage bei 2 – 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei < -15 °C. Direktes Sonnenlicht vermeiden.

## 24-Stunden Sammelurin

Im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 – 15 ml 6 M HCl vorgelegt. Für die quantitative Bestimmung der im Verlauf eines Tages ausgeschiedenen Mengen an Histamin ist es notwendig, das Volumen des Tagesurins zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren. Die Messergebnisse können auch auf den Kreatiningehalt der Probe bezogen werden.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 18 – 25 °C, bis zu 5 Tage bei 2 – 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei < -15 °C. Direktes Sonnenlicht vermeiden.

## 6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20 und 25 °C.

⚠ Der verwendete Mikrotiterplattenschüttler muss folgende Spezifikationen haben: Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm. Schütteln mit abweichenden Einstellungen kann die Ergebnisse beeinflussen.

### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise

#### Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50x** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

#### Azylierungslösung

2 ml des **ACYL-SOLV** (BA E-0085) zum **ACYL-REAG** (BA E-1012) geben und vor Gebrauch darauf achten, dass sich alles vollständig gelöst hat.

Falls mehr als 2 ml benötigt werden, die Inhalte der einzelnen Fläschchen zusammenführen und gut mischen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

#### Histamin Mikrotiterstreifen

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

### 6.2 Probenvorbereitung und Azylierung

|    |  |
|----|--|
| 1. | Jeweils <b>25 µl</b> der <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Plasmaproben</b> oder <b>10 µl</b> der <b>Urinproben</b> in die entsprechenden Wells der <b>REAC-PLATE</b> pipettieren. |
| 2. | <b>25 µl</b> <b>ACYL-BUFF</b> in alle Wells pipettieren.   |
| 3. | <b>25 µl Azylierungslösung</b> in alle Wells pipettieren.  |
| 4. | <b>45 min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.  |
| 5. | <b>100 µl Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Wells pipettieren.  |
| 6. | <b>15 min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.  |
| ⚠  | Jeweils <b>25 µl</b> der vorbereiteten <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> werden für den <b>Histamin ELISA</b> benötigt.   |

### 6.3 Histamin ELISA

|     |  |
|-----|--|
| 1.  | <b>25 µl</b> der azylierten <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> in die entsprechenden Wells der <b>W</b> <b>HIS</b> pipettieren.  |
| 2.  | <b>100 µl AS HIS</b> in alle Wells hinzugeben und Platte mit <b>FOIL</b> abdecken.   |
| 3.  | Platte für <b>3 h</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.  |
| 4.  | <b>FOIL</b> entfernen und den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells <b>4-mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. |
| 5.  | <b>100 µl CONJUGATE</b> in alle Wells pipettieren.   |
| 6.  | Für <b>30 min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.  |
| 7.  | Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells <b>4-mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.                           |
| 8.  | <b>100 µl SUBSTRATE</b> in alle Wells pipettieren und für <b>20 – 30 min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <b>Direktes Sonnenlicht vermeiden!</b>  |
| 9.  | <b>100 µl</b> der <b>STOP-SOLN</b> in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.  |
| 10. | <b>Absorption</b> mit einem Mikrotiterplatten Reader bei <b>450 nm</b> (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm) innerhalb von 10 min <b>messen</b> .  |

### 7. Berechnung der Ergebnisse

| Messbereich | Histamin |                  |
|-------------|----------|------------------|
|             | Urin     | 0,91 – 125 ng/ml |
|             | Plasma   | 0,32 – 50 ng/ml  |

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) unter Verwendung einer Konzentration von 0,001 ng/ml für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z. B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

⚠ *Dieser Assay 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.*

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit 0,1 M HCl verdünnt und nochmal bestimmt werden.

#### Plasmaproben und Kontrollen

Die Konzentrationen der Plasmaproben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

#### Urinproben

Die aus der Standardkurve abgelesenen Konzentrationen der Urinproben müssen mit dem Faktor **2,5 multipliziert** werden.

Histamin auf den Kreatiningehalt der Probe bezogen:  $\mu\text{g/g Kreatinin} = \frac{\mu\text{g Histamin}}{\text{I}} : \frac{\text{g Kreatinin}}{\text{I}}$

Die Tagesmenge Histamin, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:  $\mu\text{g}/24 \text{ Stunden} = \mu\text{g/l} \times \text{l}/24 \text{ Stunden}$ .

**Umrechnung:** Histamin (ng/ml) × 9 = Histamin (nmol/l)

#### 7.1 Erwartete Referenzbereiche

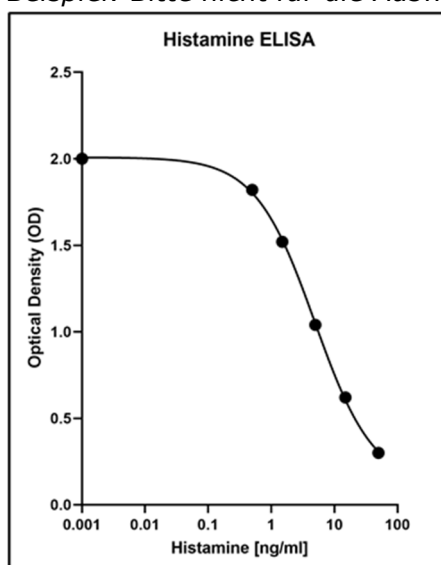
Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert ermittelt.

Die erwarteten Referenzbereiche wurden in einer internen Studie durch die Untersuchung von 140 (EDTA-Plasma), 63 (Spontanurin) und 185 (24h Urin) Proben (europäische Bevölkerung) ermittelt (95% Referenzintervall).

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Erwarteter Referenzbereich</b> |  |
| Spontanurin                       | 6 – 43 µg/g Kreatinin<br>6,1 – 43,8 µmol/mol Kreatinin                                       |
| 24-Stunden Sammelurin             | 5 – 56 µg/24h<br>45 – 504 mmol/24h<br>8 – 38 µg/g Kreatinin<br>8,1 – 38,7 µmol/mol Kreatinin |
| EDTA-Plasma                       | ≤ 1,98 ng/ml<br>≤ 17,8 nmol/l  |

## 7.2 Typische Standardkurve

⚠ *Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



## 8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen werden wie Proben eingesetzt. Sie müssen innerhalb des Vertrauensbereichs liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

## 9. Assaycharakteristika

### 9.1 Leistungsdaten

| <b>Präzision</b>   |       |                         |        |                    |       |                         |        |
|--------------------|-------|-------------------------|--------|--------------------|-------|-------------------------|--------|
| <b>Intra-Assay</b> |       |                         |        | <b>Inter-Assay</b> |       |                         |        |
|                    | Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] |                    | Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| Urin               | 1     | 9,7 ± 1,5               | 15,0   | Urin               | 1     | 8,2 ± 0,94              | 11,4   |
|                    | 2     | 18,6 ± 2,4              | 12,8   |                    | 2     | 12,8 ± 1,7              | 13,1   |
|                    |       |                         |        |                    | 3     | 42,2 ± 6,0              | 14,3   |
| Plasma             | 1     | 1,2 ± 0,18              | 15,8   | Plasma             | 1     | 0,78 ± 0,15             | 19,2   |
|                    | 2     | 5,0 ± 0,59              | 11,8   |                    | 2     | 4,8 ± 0,36              | 7,6    |
|                    |       |                         |        |                    | 3     | 10,2 ± 0,79             | 7,7    |

| <b>Analytische Sensitivität</b> |        |            |
|---------------------------------|--------|------------|
| Limit of Blank (LOB)            | Urin   | 0,19 ng/ml |
|                                 | Plasma | 0,12 ng/ml |
| Limit of Detection (LOD)        | Urin   | 0,26 ng/ml |
|                                 | Plasma | 0,19 ng/ml |
| Limit of Quantification (LOQ)   | Urin   | 0,91 ng/ml |
|                                 | Plasma | 0,32 ng/ml |

| <b>Wiederfindung</b> |                 |                |             |
|----------------------|-----------------|----------------|-------------|
|                      | Bereich [ng/ml] | Mittelwert [%] | Bereich [%] |
| Urin                 | 14,0 – 105      | 109            | 101 – 119   |
| Plasma               | 0,36 – 6,5      | 84             | 78 – 89     |

| <b>Linearität</b> |                         |                |             |
|-------------------|-------------------------|----------------|-------------|
|                   | Serielle Verdünnung bis | Mittelwert [%] | Bereich [%] |
| Urin              | 1:64                    | 130            | 122 – 135   |
| Plasma            | 1:64                    | 117            | 104 – 128   |

| <b>Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)</b> |                   |
|---|-------------------|
| Substanz  | Kreuzreaktion [%] |
| Histamin  | 100               |
| 3-Methyl-Histamin                               | 0,1               |
| Tyramin   | 0,01              |
| L-Phenylalanin                                  | < 0,001           |
| L-Histidin                                      | < 0,001           |
| L-Tyrosin                                       | < 0,001           |
| Tryptamin                                       | < 0,001           |
| 5-Hydroxy-Indol-Essigsäure                      | < 0,001           |
| Serotonin                                       | < 0,001           |

|   |   |
|---|---|
| <b>Methodenvergleich (Urin):<br/>ELISA vs. LC-MS/MS</b> | $LC-MS/MS = 0,8x - 3,2; R^2 = 0,98; n = 35$ |
| <b>Methodenvergleich (Plasma):<br/>ELISA vs. RIA</b>    | $RIA = 1,4x + 0,65; R^2 = 0,95; n = 37$     |

| <b>Lot-zu-Lot</b>                      |       |                                    |        |
|--|-------|------------------------------------|--------|
|  | Probe | Bereich [ng/ml]<br>Mittelwert ± SD | CV [%] |
| Histamin in künstlicher Matrix (n = 4) | 1     | 8,4 ± 0,43                         | 5,2    |
|  | 2     | 36,0 ± 2,2                         | 6,2    |
| Histamin in Plasma (n = 3)             | 1     | 0,53 ± 0,15                        | 28,6   |
|  | 2     | 6,7 ± 0,25                         | 3,8    |

## 9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die zugeordneten Werte der Standards und Kontrollen vom Histamine ELISA sind auf die Einwaage rückführbar.

| <b>Standards und Kontrollen</b> | Unsicherheit [%] |
|---------------------------------|------------------|
|                                 | 1,3              |

| <b>Histamine ELISA</b> |                       |                                    |
|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|                        | Konzentration [ng/ml] | Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2* |
| Urin                   | 8,2                   | 23,0                               |
|                        | 12,8                  | 26,3                               |
|                        | 42,2                  | 28,7                               |
| Plasma                 | Konzentration [ng/ml] | Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2* |
|                        | 0,78                  | 38,5                               |
|                        | 4,8                   | 15,4                               |
|                        | 10,2                  | 15,6                               |

\*Das Intervall der maximalen erweiterten Unsicherheit ist der Bereich, in dem der wahre Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% um den gemessenen Wert liegt.

## 10. Referenzen/Literatur














1. Barata-Antunes, S., et al., Dual role of histamine on microglia-induced neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. 1863(3): p. 764 – 769.
2. Worm, J., K. Falkenberg, and J. Olesen, Histamine and migraine revisited: mechanisms and possible drug targets. *J Headache Pain*, 2019. 20(1): p. 30.
3. Yamauchi, K. and M. Ogasawara, The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(7).
4. Hu, W. and Z. Chen, The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacol Ther*, 2017. 175: p. 116 – 132.
5. Branco, A., et al., Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2018. 2018: p. 9524075.
6. Ferstl, R., C.A. Akdis, and L. O'Mahony, Histamine regulation of innate and adaptive immunity. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012. 17: p. 40 – 53.
7. Hungerford, J.M., Scombroid poisoning: a review. *Toxicol*, 2010. 56(2): p. 231 – 43.
8. Smuda, C. and P.J. Bryce, New developments in the use of histamine and histamine receptors. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011. 11(2): p. 94 – 100.
9. Pini, A., et al., Histamine and diabetic nephropathy: an up-to-date overview. *Clin Sci (Lond)*, 2019. 133(1): p. 41 – 54.
10. Scammell, T.E., et al., Histamine: neural circuits and new medications. *Sleep*, 2019. 42(1).
11. Yuan, H. and S.D. Silberstein, Histamine and Migraine. *Headache*, 2018. 58(1): p. 184 – 193.
12. Thangam, E.B., et al., The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 1873.
13. Lieberman, P., The basics of histamine biology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2011. 106(2 Suppl): p. S2 – 5.
14. San Mauro Martin, I., S. Brachero, and E. Garicano Vilar, Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2016. 44(5): p. 475 – 83.

Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anfrage von Ihrem Anbieter gerne zur Verfügung gestellt.

## 11. Änderungen

| Version | Freigabedatum | Kapitel | Änderung  |
|---------|---------------|---------|---|
| 18.0    | 2022-05-02    | Alle    | – Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017/746 überarbeitet            |
|         |               | 1.      | – Einleitung  |
|         |               | 2.1     | – Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen                                 |
|         |               | 2.2.2   | – Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel                            |
|         |               | 5.      | – Probenbehandlung und Lagerung   |
|         |               | 6.2     | – Vollblut (Histamin Release) entfernt  |
|         |               | 6.3     | – Alternative Antiseruminkubation über Nacht wurde entfernt                     |
|         |               | 7.      | – Messbereiche, Referenzbereiche und typische Standardkurve wurden aktualisiert |
|         |               | 9.1     | – Assay-Charakteristika wurden aktualisiert und Lot-zu-Lot hinzugefügt          |
|         |               | 9.2     | – Metrologische Rückführbarkeit wurde hinzugefügt                               |
|         |               | 10.     | – Referenzen/Literatur wurde aktualisiert                                       |

## Symbole:

|   |                             |   |               |   |                                    |
|---|-----------------------------|---|---------------|---|------------------------------------|
|  | Lagertemperatur             |  | Hersteller    |  | Enthält Testmaterial für <n> Teste |
|  | Verwendbar bis              |  | Chargennummer |  | In vitro Diagnostikum              |
|  | Gebrauchsanweisung beachten |  | Inhalt        |  | CE-Kennzeichnung                   |
|  | Achtung                     |  | Katalognummer |  | Vertriebspartner                   |
|  | Herstellungsdatum           |   |               |   |                                    |