



ImmuSmol SAS
229 Cours de l'Argonne / 33000 Bordeaux / France



LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG
Am Eichenhain 1 / 48531 Nordhorn / Germany

Instructions for use

Histamine ELISA

REF

BA E-1000



IVD



1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Histamine in plasma and urine.

In combination with the supplementary kit *Histamine Release* (for details contact your local supplier), the assay can be used for the measurement of histamine release in heparinized whole blood.

In the first part of the procedure, Histamine is quantitatively acylated. 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.

1.2 Clinical application

Histamine belongs to the biogenic amines and is synthesized by decarboxylation from the amino acid histidine. It is synthesized by mast cells, basophils, platelets, histaminergic neurons, and enterochromaffine cells, where it is stored intracellularly in vesicles and released on stimulation.

Histamine acts by binding to its 4 receptors (H1R, H2R, H3R and H4R) on target cells in various tissues. It causes smooth muscle cell contraction, vasodilatation, increased vascular permeability and mucus secretion, tachycardia, alterations of blood pressure, and arrhythmias.

In humans, histamine is one of the most important mediators and takes part in the initial phase of an anaphylactic reaction ("immediate type" allergy).

Of clinical interest is also the quantification of the histamine release from basophilic leucocytes in allergies.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as under point "Procedural cautions guidelines and warnings". Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

Only in cases where the laboratory results are in an acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient it can be used for therapeutic consequences.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

2.1 Precautions, 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 has to 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 certain types 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) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (6) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (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 ready 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 H₂SO₄. 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. Wash contaminated objects before reusing them.
- (17) For information on 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) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (19) 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.
- (20) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results. Hemolytic samples (up to 1 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dl bilirubin) and lipemic samples (up to 1600 mg/dl triglycerides) have no influence on the assay results.

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of histamine level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

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 D-0090 **FOILS** **Adhesive Foil** - Ready to use

Contents: Adhesive Foils in a resealable pouch

Volume: 1 x 4 foils

BA E-0030 **WASH-CONC 50x** **Wash Buffer Concentrate** - Concentrated 50x

Contents: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH

Volume: 1 x 20 ml/vial, light purple cap

BA D-0024 **REAC-PLATE** **Reaction Plate** - Ready to use

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

BA E-1040 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** - Ready to use

Contents: Donkey anti-goat immunoglobulins conjugated with peroxidase

Volume: 1 x 12 ml/vial, red cap


BA E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate** - Ready to use

Contents: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide

Volume: 1 x 12 ml/black vial, black cap

BA E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use

Contents: 0.25 M sulfuric acid
 Volume: 1 x 12 ml/vial, light grey cap

Hazards identification: 

H290 May be corrosive to metals.

BA E-1031 **HIS** **Histamine Microtiter Strips** - Ready to use

Contents: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.

BA E-1010 **HIS-AS** **Histamine Antiserum** - Ready to use

Contents: Goat Anti- Histamine antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 12 ml/vial, blue cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration ng/ml	Concentration nmol/l	Volume/Vial
BA E-1001	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-1002	STANDARD B	light yellow	0.5	4.5	4 ml
BA E-1003	STANDARD C	orange	1.5	13.5	4 ml
BA E-1004	STANDARD D	dark blue	5	45	4 ml
BA E-1005	STANDARD E	light grey	15	135	4 ml
BA E-1006	STANDARD F	black	50	450	4 ml
BA E-1051	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA E-1052	CONTROL 2	dark red			4 ml

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

Contents: Acidic buffer spiked with defined quantity of Histamine

BA E-1011 **ACYL-BUFF** **Acylation Buffer** - Ready to use


Contents: TRIS-buffer containing a non-mercury preservative
 Volume: 1 x 4 ml/vial, pink cap

BA E-1012 **ACYL-REAG** **Acylation Reagent** - Lyophilized

Contents: Lyophilized acylation reagent
 Volume: 2 vials, purple cap

BA E-0085 **ACYL-SOLV** **Acylation Solvent** - Ready to use

Contents: Organic solvent
 Volume: 1 x 5 ml/vial, brown cap

Hazards identification: 

H225 Highly flammable liquid and vapour.

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 - 300 µl; 1.25 ml
- 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)
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

In general the repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Plasma

Whole blood should be collected by venipuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (e.g. Monovette™ or Vacuette™ for plasma) and centrifuged according to manufacturer's instructions at room temperature immediately after collection.

Haemolytic, icteric and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 6 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Urine

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, can be used.

If 24-hour urine is used please record the total volume of the collected urine.

Storage: up to 6 hours at 2 - 8 °C, for longer periods (up to 6 month) at -20 °C.

Avoid exposure to direct sunlight.

Whole Blood

The release of histamine is performed with heparinized whole blood. For further information please refer to the instructions for use of the add-on kit **Histamine Release** (for details contact your local supplier).

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended. It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

The binding of the antibody and the enzyme conjugates and the activity of the enzyme used are temperature dependent, and the absorbance values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 - 25 °C.

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month at 2 - 8 °C

Acylation Solution

Reconstitute each vial of the Acylation Reagent (BA E-1012) with 2 ml Acylation Solvent (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 25 µl of standards, controls and plasma samples , 10 µl of urine samples , or 50 µl of supernatant from the release test* into the respective wells of the Reaction Plate .
2.	Add 25 µl of Acylation Buffer to all wells.
3.	Add 25 µl of Acylation Solution (refer to 6.1) to all wells.
4.	Incubate for 45 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
5.	Add 100 µl of water (deionized, distilled, or ultra-pure) to all wells.
6.	Incubate for 15 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
	Take 25 µl of the prepared standards, controls and samples for the Histamine ELISA

* For the **release test** the **Histamine Release** supplementary kit (for details contact your local supplier) has to be used.

6.3 Histamine ELISA

1.	Pipette 25 µl of the acylated standards, controls and samples into the appropriate wells of the Histamine Microtiter Strips .
2.	Pipette 100 µl of the Histamine Antiserum into all wells and cover plate with Adhesive Foil .
3.	Incubate for 3 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Alternatively: shake the Histamine Microtiter Strips briefly by hand and incubate for 20 - 25 h at 2 - 8 °C .
4.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
6.	Incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
9.	Add 100 µl of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	Histamine	
	Plasma	0.12 - 50 ng/ml
	Urine	0.3 - 125 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).

Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

⚠ *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.*

Plasma samples and controls:

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

Urine samples:

The read concentrations of **histamine in urine** have to be **multiplied by 2.5**

The total amount of Histamine excreted in urine during 24 h is calculated as following:

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

Conversion

Histamine (ng/ml) x 9 = Histamine (nmol/l)

Expected reference values

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

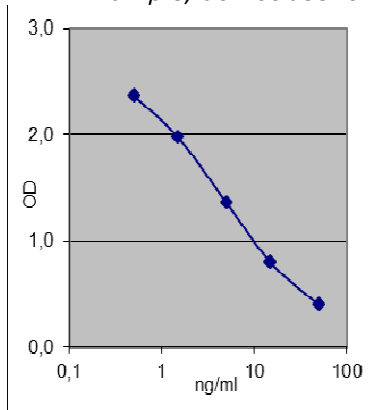
Plasma	24 hour-urine	Spontaneous urine
0.2 - 1.0 ng/ml	5 - 53 µg/d	10 - 50 µg/g creatinine

7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit, or other commercially available, controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated in the QC-Report.

7.2 Typical standard curve

⚠ Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity Limit of Detection	Histamine	
	Sensitivity Plasma	0.18 ng/ml
	Sensitivity Urine	0.22 ng/ml

Analytical Sensitivity Limit of Quantitation	Histamine	
	Sensitivity Plasma	0.29 ng/ml
	Sensitivity Urine	0.96 ng/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)	
		Histamine	
	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		

Precision									
Intra-Assay									
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		
Histamine	1	9.7 ± 1.5	15	Histamine	1	1.2 ± 0.2	16		
	Urine	2	18.6 ± 2.4		13	Plasma	2	5.0 ± 0.6	12
Inter-Assay									
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		
Histamine	1	8.2 ± 0.9	11	Histamine	1	0.29 ± 0.07	25		
	Urine	2	12.8 ± 1.7		13	Plasma	2	3.1 ± 0.2	8
	3	42.2 ± 6.0	14		3	5.5 ± 0.8	15		

Linearity		Range	Serial dilution up to	Range (%)
	Urine	4.3 – 69.8 ng/ml	1:21	90 - 124
	Plasma	0.7 – 7.9 ng/ml	1:10	85 - 106

Recovery		Range	Mean (%)	Range (%)
	Urine	14.0 - 105 ng/ml	109	101 - 119
	Plasma	0.4 – 6.4 ng/ml	84	78 - 89







Method comparison versus other RIA	Urine	RIA = 0.9 ELISA – 3.1	r = 0.97; n = 29
	Plasma	RIA = 1.0 ELISA – 0.4	r = 0.99; n = 49

9. References/Literature

- (1) Yagci et al. TCTP/HRF pathway and angiogenesis: A feasible intercourse in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Research*, 37:665-670 (2013)
- (2) Coulson et al. Paracetamol (acetaminophen) attenuates in vitro mast cell and peripheral blood mononucleocyte cell histamine release induced by N-acetylcysteine. *Clinical Toxicology*, 48(2):111-114 (2010)
- (3) Rovere et al. Histamine and Selenium in Lung Cancer. *Anticancer Research*, 26: 2937-2942 (2006)
- (4) Miyazaki et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions. *J Clin Invest*, 115(2): 434-442 (2005)
- (5) Brown, S. G. et al. Ant venom immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet*, 361(9362): 1001-1006 (2003)
- (6) Matsumoto, J. Adverse effects of praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: involvement of host anaphylactic reactions induced by parasite antigen release. *Int J Parasitol*, 32(4): 461-471 (2002)
- (7) Matsumoto, J. and H. Matsuda. Mast-cell-dependent histamine release after praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: implications for chemotherapy-related adverse effects. *Parasitol Res*, 88(10): 888-893
- (8) Hsu, C. H. et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med*, 2(5): 540-544
- (9) Demoly P. et al. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy*, 54(5): 500-506 (1999)

△ 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

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Plasma und Urin.

In Kombination mit dem Zusatzkit Histamine Release (für weitere Informationen kontaktieren Sie Ihren Anbieter), kann der Test zur Bestimmung der Freisetzung von Histamin in heparinisiertem Vollblut verwendet werden.

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 enzymmarkierten Antikörper bestimmt und mit einem Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.

1.2 Klinische Anwendung

Histamin zählt zu den biogenen Aminen und wird durch Decarboxylierung aus der Aminosäure Histidin gebildet. Histamin wird in Mastzellen, Basophilen, Blutplättchen, histaminergen Neuronen und enterochromaffinen Zellen produziert, in Vesikeln gespeichert und bei entsprechender Stimulation freigesetzt.

Histamin bindet an die 4 Rezeptoren H1R, H2R, H3R und H4R der Zielzellen in diversen Geweben und führt unter anderem zur Kontraktion der glatten Muskelzellen, zur Vasodilatation, zur erhöhten vaskulären Permeabilität, zur erhöhten Mucus-Sekretion, zur Tachykardie sowie zu Änderungen des Blutdrucks als auch zu Arrhythmien.

Histamin ist auch einer der Hauptmediatoren bei einer anaphylaktischen Reaktion im Menschen. Von klinischem Interesse ist auch die Quantifizierung der Histamin-Freisetzung aus basophilen Leukozyten bei Allergien.

Therapeutische Konsequenzen dürfen niemals allein auf Grund von Laborwerten herangezogen werden, auch wenn diese Werte 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 abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung 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) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Kavitäten müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (8) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.

- (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 Kavitäten 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 für die 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 H₂SO₄ 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 Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (19) 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.
- (20) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen

Plasma

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 1 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dl Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 1600 mg/dl Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse.

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Histamin-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

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 D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	1 x 4 Folien	

BA E-0030 **WASH-CONC 50x** **Wash Buffer Concentrate** - 50x konzentriert
 Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila

BA E-1040 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Esel Anti-Ziege Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot

BA E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Chromogenes Substrate mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen schwarz, Deckel schwarz

BA E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau

Mögliche Gefahren: 
 H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

BA E-1031 **HIS** **Histamin Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel

BA E-1010 **HIS-AS** **Histamin Antiserum** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Ziege Anti- Histamin Antikörper, blau gefärbt
 Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel blau

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration ng/ml	Konzentration nmol/l	Volumen/Fläschchen
BA E-1001	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-1002	STANDARD B	hellgelb	0,5	4,5	4 ml
BA E-1003	STANDARD C	orange	1,5	13,5	4 ml
BA E-1004	STANDARD D	dunkelblau	5	45	4 ml
BA E-1005	STANDARD E	hellgrau	15	135	4 ml
BA E-1006	STANDARD F	schwarz	50	450	4 ml
BA E-1051	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben		4 ml
BA E-1052	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

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


Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit Histamin

BA E-1011 **ACYL-BUFF** **Acylation Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: TRIS-haltiger Puffer mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel
 Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel rosa

BA D-0024 **REAC-PLATE** **Reaction Plate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel

BA E-1012 **ACYL-REAG** **Acylation Reagent** - Lyophilisat
 Inhalt: Lyophilisiertes Azylierungsreagenz
 Volumen: 2 Fläschchen, Deckel lila

BA E-0085 **ACYL-SOLV** **Acylation Solvent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Organisches Lösungsmittel
Volumen: 1 x 5 ml/Fläschchen, Deckel braun
Mögliche
Gefahren: 

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 300 µl; 1,25 ml
- 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

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren aller Proben sollte vermieden werden!

Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Plasma Monovette™ oder Vacuette™) sammeln und das Plasma direkt nach Angaben des Herstellers durch Zentrifugation von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Lagerung: bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C
Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Urin

Es kann Spontanurin oder 24 Stunden- Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt). Wird 24 Stunden Sammelurin verwendet, ist es notwendig, das Volumen zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.

Lagerung: bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C
Direktes Sonnenlicht vermeiden!

Vollblut

Zur Bestimmung der Histaminfreisetzung aus heparinisiertem Vollblut wird der Zusatzkit Histamine Release benötigt (für weitere Informationen kontaktieren Sie Ihren Anbieter).

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 und sollten durch ein Thermostat sichergestellt sein. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 – 25°C.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat 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 Mikrotiter Strips

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 25 µl der Standards, Controls (Kontrollen) und Plasmaproben, 10 µl der Urinproben oder 50 µl der Überstände aus dem Release Test* in die entsprechenden Kavitäten der REAC-PLATE pipettieren.
2.	25 µl ACYL-BUFF in alle Kavitäten pipettieren.
3.	25 µl Azylierungslösung (siehe 6.1) in alle Kavitäten pipettieren.
4.	45 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
5.	100 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Kavitäten pipettieren.
6.	15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
	Jeweils 25 µl der vorbereiteten Standards, Kontrollen und Proben werden für den Histamin ELISA benötigt.

*Zur Bestimmung der Histaminfreisetzung aus heparinisiertem Gesamtblut wird der Zusatzkit **Histamine Release ELISA** (für weitere Informationen kontaktieren Sie Ihren Anbieter) benötigt.

6.3 Histamin ELISA


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

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Histamin	
	Plasma	0,12 - 50 ng/ml
Urin	0,3 – 125 ng/ml	

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: Spline, 4- Parameter, Akima) 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.*

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.

Die Tagesmenge Histamin, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:

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

Umrechnung

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

Erwartete Referenzbereiche

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

Plasma	24 Stunden-Urin	Spontanurin
0,2 – 1,0 ng/ml	5 – 53 µg/d	10 – 50 µg/g Kreatinin

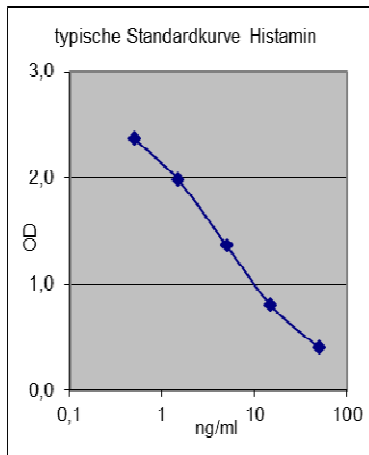
7.1 Qualitätskontrolle

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. Die Kontrollproben müssen dabei innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve



Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität Limit of Detection	Histamin	
	Sensitivität Plasma	0,18 ng/ml
	Sensitivität Urin	0,22 ng/ml

Analytische Sensitivität Limit of Quantitation	Histamin	
	Sensitivität Plasma	0,29 ng/ml
	Sensitivität Urin	0,96 ng/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		Histamin
	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-Indole-Acetic Acid	< 0,001
	Serotonin	< 0,001

Präzision							
Intra-Assay							
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)
Histamin Urin	1	9,7 ± 1,5	15	Histamin Plasma	1	1,2 ± 0,2	16
	2	18,6 ± 2,4	13		2	5,0 ± 0,6	12
Inter-Assay							
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)
Histamin Urin	1	8,2 ± 0,9	11	Histamin Plasma	1	0,29 ± 0,07	25
	2	12,8 ± 1,7	13		2	3,1 ± 0,2	8
	3	42,2 ± 6,0	14		3	5,5 ± 0,8	15

Linearität		Bereich	Serielle Verdünnung bis:	Bereich (%)
	Urin	4,3 - 69,8 ng/ml	1:21	90 - 124
	Plasma	0,7 - 7,9 ng/ml	1:10	85 - 106

Wiederfindung		Bereich	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Urin	14,0 - 105 ng/ml	109	101 - 119
	Plasma	0,4 - 6,4 ng/ml	84	78 - 89







Methodenvergleich mit kommerziell erhältlichem RIA	Urin	RIA = 0,9 ELISA - 3,1	r = 0,97; n = 29
	Plasma	RIA = 1,0 ELISA - 0,4	r = 0,99; n = 49

9. Referenzen/Literatur

- (1) Yagci et al. TCTP/HRF pathway and angiogenesis: A feasible intercourse in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Research*, 37:665-670 (2013)
- (2) Coulson et al. Paracetamol (acetaminophen) attenuates in vitro mast cell and peripheral blood mononucleocyte cell histamine release induced by N-acetylcysteine. *Clinical Toxicology*, 48(2):111-114 (2010)
- (3) Rovere et al. Histamine and Selenium in Lung Cancer. *Anticancer Research*, 26: 2937-2942 (2006)
- (4) Miyazaki et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions. *J Clin Invest*, 115(2): 434-442 (2005)
- (5) Brown, S. G. et al. Ant venom immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet*, 361(9362): 1001-1006 (2003)
- (6) Matsumoto, J. Adverse effects of praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: involvement of host anaphylactic reactions induced by parasite antigen release. *Int J Parasitol*, 32(4): 461-471 (2002)
- (7) Matsumoto, J. and H. Matsuda. Mast-cell-dependent histamine release after praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: implications for chemotherapy-related adverse effects. *Parasitol Res*, 88(10): 888-893
- (8) Hsu, C. H. et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med*, 2(5): 540-544
- (9) Demoly P. et al. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy*, 54(5): 500-506 (1999)

⚠ **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	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		