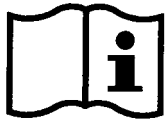


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Histamine ELISA



DEE1000



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table of contents/ Inhaltsverzeichnis

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS 11

1.	Einleitung	12
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	12
1.2	Klinische Anwendung	12
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	12
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	12
2.2	Grenzen des Tests	13
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	13
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	13
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	14
3.	Lagerung und Haltbarkeit	14
4.	Materialien	14
4.1	Reagenzien im Kit	14
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	15
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	15
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	15
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	15
6.	Testdurchführung	16
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	16
6.2	Probenvorbereitung und Azylierung	16
6.3	Histamine ELISA	17
7.	Berechnung der Ergebnisse	17
7.1	Erwartete Referenzbereiche	18
7.2	Typische Standardkurve	18
8.	Kontrollproben	18
9.	Assaycharakteristika	18
9.1	Leistungsdaten	18
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	19
11.	Änderungen	20

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 uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples compete with the solid phase bound analytes 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 resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is 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.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if these results are assessed in accordance with the quality criteria of the method. 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.

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 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. Rinse contaminated items before reuse.
- (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 must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
 - (22)

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 kit and 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 of the ELISA plate 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	
BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil – ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	1 x 4 foils	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
BA E-0085	ACYL-SOLV	Acylation Solvent – ready to use
Content:	Organic solvent	
Volume:	1 x 5 ml/vial, brown cap	
Hazard pictograms:	 	
	GHS02 GHS07	
Signal word:	Danger	
BA E-1010	HIS-AS	Histamine Antiserum – ready to use
Content:	Goat anti-histamine antibody, in protein containing buffer, blue coloured	
Volume:	1 x 12 ml/vial, blue cap	
Description:	Species of the antibody is goat; species of the protein in the buffer is bovine	
BA E-1011	ACYL-BUFF	Acylation Buffer – ready to use
Content:	Buffer with proteins and non-mercury preservative	
Volume:	1 x 4 ml/vial, pink cap	
Description:	Species of the protein in the buffer is bovine	
BA E-1012	ACYL-REAG	Acylation Reagent – lyophilized
Content:	Lyophilized acylation reagent	
Volume:	2 vials, purple cap	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
BA E-1031	HIS	Histamine Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant	
BA E-1040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Donkey anti-goat immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is donkey	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	

4.2 Calibration and Controls**Standards and Controls – ready to use**

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

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

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, handling 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 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.

6. Test procedure

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

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 – 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.

- ⚠ Do not exceed the temperature during the enzyme immunoassay of 20 – 25 °C and the prescribed incubation times. Too high temperature during the enzyme immunoassay and too long incubation times might influence the results.
- ⚠ To stop the acylation, deionized, distilled or ultra-pure water must be used in all cases. Otherwise, it may influence the results.
- ⚠ The addition of 10 µl of 6 M HCl to 1 ml of spontaneous urine must be strictly adhered to. If this amount of HCl deviates, the results may be influenced.

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: 2 months 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 or 10 µl of urine samples into the respective wells of the REAC-PLATE .
2.	Add 25 µl ACYL-BUFF to all wells.
3.	Add 25 µl Acylation Solution 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 .

6.3 Histamine ELISA

1.	Pipette 25 µl of the acylated standards, controls and samples into the appropriate wells of the HIS .
2.	Pipette 100 µl of the HIS-AS into all wells and cover plate with FOILS .
3.	Incubate for 3 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Remove the FOILS . Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 times 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 CONJUGATE into each well.
6.	Incubate 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 times 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 each well 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-SOLN to all wells and shake the microtiter plate shortly.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 min, using a microtiter plate 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	
	Urine	0.91 – 125 ng/ml
	Plasma	0.32 – 50 ng/ml

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, 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. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

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:

$$\text{histamine [ng/ml]} \times 9 = \text{histamine [nmol/l]}$$

7.1 Expected reference value

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

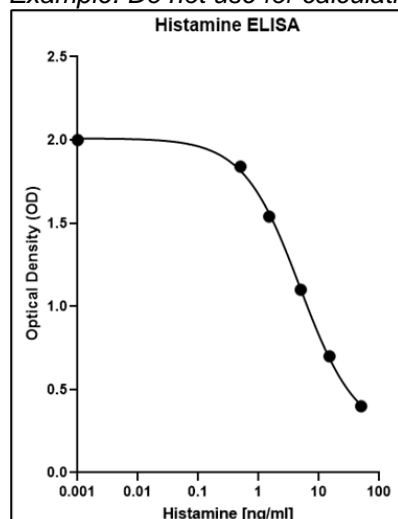
The expected reference ranges were determined in an internal study by testing 140 (EDTA-plasma), 63 (spontaneous urine) and 185 (24h urine) samples (European population) (95% reference interval).

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

Values significantly outside the reference range should be assessed by a doctor.

7.2 Typical standard curve

⚠ *Example. Do not use for calculation!*



8. Control samples

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**

Analytical Sensitivity		
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

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
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

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	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

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]
Histamine in artificial matrix (n = 6)	1	3.5 ± 0.4	10.7
	2	15.8 ± 1.1	6.7
Histamine in plasma (n = 6)	1	2.4 ± 0.5	19.4
	2	8.6 ± 0.8	8.9

Recovery			
	Range [ng/ml]	Mean [%]	Range [%]
Urine	3.7 – 126	113	105 – 127
Plasma	0.34 – 11.5	95.0	91.1 – 102

Linearity			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Urine	1:64	130	122 – 135
Plasma	1:64	117	104 – 128

Method comparison (urine): ELISA vs. LC-MS/MS	LC-MS/MS = $0.8x - 3.2$; $r^2 = 0.98$; $n = 35$
Method comparison (plasma): ELISA vs. RIA	RIA = $1.4x + 0.65$; $r^2 = 0.95$; $n = 37$

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Histamine ELISA are traceable to SI Units by weighing with quality-controlled analyte.

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	2.5

Histamine ELISA		
Urine	Concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] $k = 2^*$
	8.2	23.3
	12.8	26.7
	42.2	29.0
Plasma	Concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] $k = 2^*$
	0.78	38.7
	4.8	16.0
	10.2	16.2

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

10. References/Literature // 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.

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

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

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
18.0	2022-05-02	All 1. 2.1 2.2.2 5. 6.2 6.3 7. 9.1 9.2 10.	The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746 Introduction Procedural notes, guidelines and warnings Drug and food interferences Sample collection and storage Whole blood (Histamine Release) removed Alternative antiserum incubation overnight was removed Measuring range, expected reference value and typical standard curve have been updated Performance data updated and Lot-to-Lot added Metrological traceability added References/Literature updated
19.0	2023-02-10	6 6.1 7.1 7.2 9.1	New warning notices included Acylation Solution: Shelf life after opening 2 months IFU warning added Typical standard curve updated Recovery updated
20.0	2024-07-16	4.1 9.1 9.2	Hazard labelling updated according to SDS Lot-to-Lot updated Metrological Traceability updated

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta

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 die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Analyten konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Ziege-Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

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

Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum 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.

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.

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 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 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, potentiell 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 bis zum Verfalldatum 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**

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaktionsplatte – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well-Platte, leer, in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA D-0090	FOILS	Selbstklebende Folie – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	1 x 4 Folien	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
BA E-0085	ACYL-SOLV	Azylierungslösungsmittel – gebrauchsfertig
Inhalt:	Organisches Lösungsmittel	
Volumen:	1 x 5 ml/Fläschchen, Deckel braun	
Gefahrenpiktogramme:	 	
Signalwort:	GHS02 GHS07 Gefahr	
BA E-1010	HIS-AS	Histamin Antiserum – 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	
:		
BA E-1011	ACYL-BUFF	Azylierungspuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit Proteinen und quecksilberfreiem Konservierungsmittel	
Volumen:	1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel rosa	
Beschreibung:	Spezies des Proteins im Puffer ist Rind	
:		
BA E-1012	ACYL-REAG	Azylierungsreagenz – Lyophilisat
Inhalt:	Lyophilisiertes Azylierungsreagenz	
Volumen:	2 Fläschchen, Deckel lila	
Gefahrenpiktogramme:		
Signalwort:	GHS07 Achtung	
BA E-1031	LI HIS	Histamin Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	

BA E-1040	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Esel anti-Ziege Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Esel	
Gefahrenpiktogramme:		
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on	
Gefahrenhinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheitshinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

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

Umrechnung: Histamin [ng/ml] x 9 = Histamin [nmol/l]

g:

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge Histamin.

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

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

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 mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer

5. Probensammlung, -behandlung 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. Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden). Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

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

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

⚠ *Die Temperatur während des Enzymimmunoassays von 20 – 25 °C und die vorgeschriebenen Inkubationszeiten nicht überschreiten. Zu hohe Temperatur während des Ansatzes und zu lange Inkubationszeiten können die Ergebnisse beeinflussen.*

⚠ *Für das Stoppen der Azylierung muss in jedem Fall mit deionisiertem, destilliertem oder ultra-purem Wasser gearbeitet werden. Anderenfalls kann es die Ergebnisse beeinflussen.*

⚠ *Die Zugabe von 10 µl 6 M HCl auf 1 ml Spontanurin ist unbedingt einzuhalten. Bei Abweichen dieser Menge HCl können die Ergebnisse beeinflusst werden.*

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere 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: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Histamin Mikrotiterstreifen

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierungslösung 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, Kontrollen und Plasmaproben oder 10 µl der Urinproben in die entsprechenden Wells der REAC-PLATE pipettieren.
2.	25 µl ACYL-BUFF in alle Wells pipettieren.
3.	25 µl Azylierungslösung in alle Wells 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 Wells 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 Histamine ELISA benötigt.

6.3 Histamine ELISA

1.	25 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der LI HIS pipettieren.
2.	100 µl HIS-AS in alle Wells hinzugeben und Platte mit FOILS abdecken.
3.	Platte für 3 h bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	FOILS entfernen und den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 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 Wells pipettieren.
6.	Für 30 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 4-mal 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 Wells pipettieren und für 20 – 30 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
9.	100 µl der STOP-SOLN in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten Reader bei 450 nm (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm) innerhalb von 10 min messen .

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 (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit 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 nochmals bestimmt werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt 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: $\mu\text{g/g Kreatinin} = \frac{\mu\text{g Histamin}}{\text{g Kreatinin}}$

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] x 9 = Histamin [nmol/l]

7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

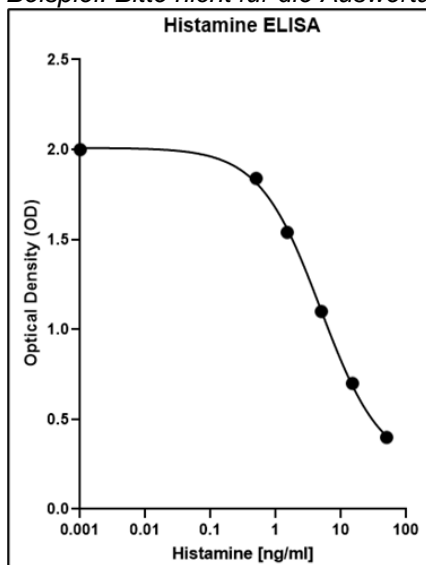
Die erwarteten Referenzbereiche wurden in einer internen Studie durch die Untersuchung von 140 (EDTA-Plasma), 63 (Spontanurin) und 185 (24h Urin) Proben (europäische Bevölkerung) ermittelt (95% Referenzintervall).

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

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

7.2 Typische Standardkurve

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



8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekanntes Proben behandelt werden. Kontrollproben sollten innerhalb der festgelegten Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

9. Assaycharakteristika

9.1 Leistungsdaten

Analytische Sensitivität		
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

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
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

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	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

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
Histamin in künstlicher Matrix (n = 6)	1	3,5 ± 0,4	10,7
	2	15,8 ± 1,1	6,7
Histamin in Plasma (n = 6)	1	2,4 ± 0,5	19,4
	2	8,6 ± 0,8	8,9

Wiederfindung			
	Bereich [ng/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	3,7 – 126	113	105 – 127
Plasma	0,34 – 11,5	95,0	91,1 – 102

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	1:64	130	122 – 135
Plasma	1:64	117	104 – 128

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

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die den Standards und Kontrollen des Histamine ELISA zugewiesenen Werte sind durch Wägung mit qualitätskontrollierten Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	2,5

Histamine ELISA		
Urin	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
	8,2	23,3
	12,8	26,7
	42,2	29,0
Plasma	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
	0,78	38,7
	4,8	16,0
	10,2	16,2

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

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
19.0	2023-02-10	6	Neue Warnhinweise aufgenommen
		6.1	Acylierungslösung: Haltbarkeit nach Öffnen 2 Monate
		7.1	IFU-Warnhinweis ergänzt
		7.2	Typische Standardkurve aktualisiert
		9.1	Wiederfindung aktualisiert
20.0	2024-07-16	4.1	Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert
		9.1	Lot-zu-Lot aktualisiert
		9.2	Metrologische Rückführbarkeit aktualisiert