

---

**Instructions for use**  
**Histamine Cell culture ELISA**

**REF**

**DEE1700**



**IVD**



## **1. Introduction**

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

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Histamine in urine and cell culture samples and for the quantitative determination of Total Histamine in whole blood.

First, 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 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 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) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (6) 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.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (8) 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.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) 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.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.

- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (17) Some reagents contain sodium azide (NaN<sub>3</sub>) as preservatives. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water. NaN<sub>3</sub> may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. When disposing reagents, flush with a large volume of water to avoid azide build-up.
- (18) 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.
- (19) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (20) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (22) 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

#### 24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Acylation Buffer is insufficient. As a consequence histamine will not be acylated quantitatively.

### 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

<b>BA D-0024</b>	<u>REAC-PLATE</u>	<b>Reaction Plate</b> - Ready to use
Contents:	1 x 96 well plate, empty in a resealable pouch	
<b>BA E-0030</b>	<u>WASH-CONC</u> <u>50x</u>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> - Concentrated 50x
Contents:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, light purple cap	
<b>BA E-1240</b>	<u>CONJUGATE</u>	<b>Enzyme Conjugate</b> - Ready to use
Contents:	Donkey anti-goat immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
<b>BA E-0055</b>	<u>SUBSTRATE</u>	<b>Substrate</b> - 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

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

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

**BA E-1210** **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
<b>BA E-1001</b>	<b>STANDARD A</b>	white	0	0	4 ml
<b>BA E-1002</b>	<b>STANDARD B</b>	light yellow	0.5	4.5	4 ml
<b>BA E-1003</b>	<b>STANDARD C</b>	orange	1.5	13.5	4 ml
<b>BA E-1004</b>	<b>STANDARD D</b>	dark blue	5	45	4 ml
<b>BA E-1005</b>	<b>STANDARD E</b>	light grey	15	135	4 ml
<b>BA E-1006</b>	<b>STANDARD F</b>	black	50	450	4 ml
<b>BA E-1051</b>	<b>CONTROL 1</b>	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
<b>BA E-1052</b>	<b>CONTROL 2</b>	dark red			4 ml

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

Contents: Acidic buffer spiked with defined quantity of Histamine

**BA E-1211** **ACYL-BUFF** **Acylation Buffer** - Ready to use

Contents: TRIS-buffer  
 Volume: 2 x 12 ml/vial, brown cap

**BA E-1212** **ACYL-REAG** **Acylation Reagent** - Ready to use


Contents: Acylation reagent containing DMSO  
 Volume: 2 x 1.5 ml/vial, green cap


**BA E-0041** **DILUENT** **Diluent** - Ready to use

Contents: Acidic buffer with non-mercury preservatives  
 Volume: 1 x 22 ml/vial, white cap

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 - 200 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
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

 The assay can be performed with or without the usage of a microtiter plate shaker. If a shaker is used, it should have the following characteristics: shaking amplitude 3 mm, capable of approx. 600 rpm.

 For the determination of total histamine in whole blood, a **Release Buffer** is necessary!  
*(Please ask your local supplier for ordering details)*

**BA E-1726** **RELEASE-BUFF** **Release Buffer** - Ready to use

Contents: Buffer with physiological pH  
 Volume: 1 x 250 ml/vial, white cap

## 5. Sample collection and storage

### Cell culture

Samples can be stored at 2 – 8 °C for up to 6 hours. For longer periods ( $\leq$  6 months) the samples should be stored between -20 °C and -80 °C.

### Urine

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, may be used. *If 24-hour urine is being used please record the total volume of the collected urine.* If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Diluent is insufficient. As a consequence interfering factors are not extracted quantitatively.

Storage: up to 6 hours at 2 – 8 °C; for longer periods (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

*Avoid exposure to direct sunlight.*

### Whole Blood

Whole blood is collected into a tube (e.g. Monovette™ or Vacuette™) containing heparin as anti-coagulant. The samples can be stored for up to 24 hours at room temperature. Please do not keep the samples refrigerated, this will lead to clotting of the leucocytes. Avoid direct sunlight.

## 6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent, and the absorption values may vary if a thermostat is not used. 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.



*In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm*

### 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 Reagent

The Acylation Reagent has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that the Acylation Reagent is liquid when being used, it must be ensured that the Acylation Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution.


#### Whole Blood

For the determination of total histamine in whole blood, dilute heparinized whole blood 1 + 20 with **Release Buffer** (BA E-1726) and incubate for **10 min** at **90 °C** (e.g. 50  $\mu$ l whole blood plus 1 ml Release Buffer)


Cool down the samples for **10 min** at **2 – 8°C**

Centrifuge for 10 min at 700 x g (*the brake should be switched-off!*)

## 6.2 Sample preparation and acylation

1.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>standards, controls</b> and <b>20 µl</b> of <b>cell culture samples</b> or <b>urine samples</b> and <b>100 µl</b> of <b>perpetrated whole blood samples</b> ( <i>refer to 6.1.</i> ) into the respective wells of the <b>Reaction Plate</b> .
2.	Add <b>80 µl</b> of <b>Diluent</b> to the wells with <b>cell culture samples</b> and <b>urine samples</b> .
3.	Add <b>25 µl</b> of <b>Acylation Reagent</b> ( <i>refer to 6.1</i> ) to all wells.
4.	Pipette <b>200 µl</b> of <b>Acylation Buffer</b> into all wells.
5.	Incubate <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Alternatively without shaker:</b> shake <b>the Reaction Plate</b> shortly by hand and incubate <b>15 min at RT</b> (20 – 25 °C).
	<b>Take 25 µl for the subsequent ELISA</b>

## 6.3 Histamine ELISA

1.	Pipette <b>25 µl</b> of the <b>acylated standards, controls and samples</b> into the wells of the <b>Histamine Microtiter Strips</b> .
2.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Histamine Antiserum</b> into all wells.
3.	Incubate <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Alternatively without shaker:</b> shake the <b>Histamine Microtiter Strips</b> shortly by hand and incubate for <b>40 min at RT</b> (20 – 25 °C).
4.	Discard or aspirate the contents of the wells and wash the plate <b>3 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Enzyme Conjugate</b> into all wells.
6.	Incubate for <b>10 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Alternatively without shaker:</b> incubate for <b>20 min at RT</b> (20 – 25 °C).
7.	Discard or aspirate the contents of the wells and wash the plate <b>3 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Substrate</b> into all wells.
9.	Incubate for <b>15 ± 2 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Alternatively without shaker:</b> incubate for <b>15 ± 2 min at RT</b> (20 – 25 °C).
	<b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>
10.	Add <b>100 µl</b> of the <b>Stop Solution</b> to each well and shake the microtiter plate shortly by hand to ensure a homogeneous distribution of the solution.
11.	<b>Read</b> the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to <b>450 nm</b> (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

## 7. Calculation of results

Measuring range	Histamine	
	Controls	0.12 - 50 ng/ml
	Cell culture and urine	0.6 - 250 ng/ml
	Whole blood	2.52 - 1050 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).

### Controls

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

### Cell culture samples

The read concentrations of **histamine in cell culture samples** have to be **multiplied by 5**.

### Whole blood samples

The read concentrations of **histamine in whole blood** have to be **multiplied by 21**.

### Urine samples

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

$$\text{Histamine (ng/ml)} \times 9 = \text{Histamine (nmol/l)}$$

### Expected reference values

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Histamine ELISA <sup>Fast Track</sup> the following values were observed:

Whole blood (total Histamine)	24 hour-urine	Spontaneous urine
20 - 200 ng/ml	< 45 µg/d	< 45 µg/g creatinine

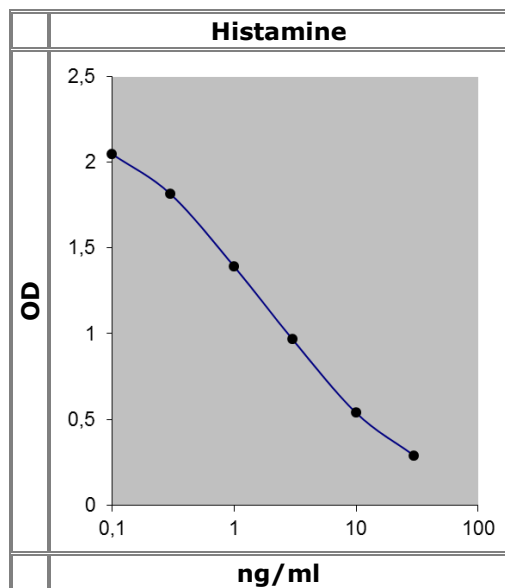
## 7.1 Quality control

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 listed in the QC-Report.

## 7.2 Typical standard curve



*Example, do not use for calculation!*



## 8. Assay characteristics

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		Histamine
	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
	Serotonine	< 0.001

<b>Analytical Sensitivity</b> (Limit of Detection)	Histamine	0.2 ng/ml	Mean signal (Zero-Standard) + 2SD
---	-----------	-----------	-----------------------------------

<b>Precision</b>					
<b>Inter-Assay Variation, n = 13</b>			<b>Intra-Assay Variation, n = 39</b>		
Sample	Mean ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sample	Mean ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	2.03 ± 0.16	8	1	0.6 ± 0.1	12
2	6.74 ± 0.37	5.6	2	4.6 ± 0.3	6.3

<b>Linearity</b>		<b>Range (ng/ml)</b>	<b>Range (%)</b>	<b>Mean (%)</b>
	Histamine	0.74 - 8.48	85 - 106	100







<b>Recovery</b>		<b>Serial dilution up to</b>	<b>Range (%)</b>	<b>Mean (%)</b>
	Histamine	1:16	92 - 120	103

## 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)

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

### Symbols:

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



## 1. Einleitung

### 1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Urin und Zellkulturproben und zur quantitativen Bestimmung von totalem Histamin in Vollblut.

Zuerst wird Histamin im Verlauf der Probenvorbereitung zu N-Azyl-Histamin derivatisiert. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die azylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem 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 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 bestimmt. 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 humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) 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.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (8) 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.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.

- (10) 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.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Kavitäten sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) 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.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (17) Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) als Konservierungsmittel. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen. NaN<sub>3</sub> kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung der Reagenzien mit reichlich Wasser spülen, um die Ansammlung von Azid zu vermeiden.
- (18) 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.
- (19) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (20) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (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.
- (22) 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 Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Azylierungspuffers nicht aus. In der Folge wird Histamin nicht mehr quantitativ azyliert.

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

### 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-0024** REAC-PLATE **Reaction Plate** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel
- 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-1240** CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Esel Anti-Ziege Immunglobuline konjugiert mit Peroxidase  
Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot
- BA E-0055** SUBSTRATE **Substrate** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Chromogenes Substrat 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
- BA E-0131** HIS **Histamine Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Folienbeutel
- BA E-1210** HIS-AS **Histamine Antiserum** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Ziege Anti- Histamine 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
<b>BA E-1001</b>	<u>STANDARD</u> A	weiß	0	0	4 ml
<b>BA E-1002</b>	<u>STANDARD</u> B	hellgelb	0,5	4,5	4 ml
<b>BA E-1003</b>	<u>STANDARD</u> C	orange	1,5	13,5	4 ml
<b>BA E-1004</b>	<u>STANDARD</u> D	dunkelblau	5	45	4 ml
<b>BA E-1005</b>	<u>STANDARD</u> E	hellgrau	15	135	4 ml
<b>BA E-1006</b>	<u>STANDARD</u> F	schwarz	50	450	4 ml
<b>BA E-1051</b>	<u>CONTROL</u> 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind dem QC-Report zu entnehmen.		4 ml
<b>BA E-1052</b>	<u>CONTROL</u> 2	dunkelrot			4 ml

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

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge Histamin

- BA E-1211** ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: TRIS-haltiger Puffer  
Volumen: 2 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel braun
- BA E-1212** ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Azylierungsreagenz in DMSO  
Volumen: 2 x 1,5 ml/Fläschchen, Deckel grün


**BA E-0041**     **DILUENT**                      **Diluent** - Gebrauchsfertig


Inhalt:            Saurer Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln

Volumen:        1 x 22 ml/Fläschchen, Deckel weiß

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 200 µl
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Saugfähige Unterlage

 Der Assay kann ohne Verwendung eines Mikrotiterplattenschüttlers durchgeführt werden. Wird ein Schüttler verwendet, sollte dieser folgende Charakteristika haben: Amplitude 3 mm; ca. 600 rpm.

 Für die Bestimmung von totalem Histamin in Vollblut ist ein **RELEASE-BUFF** notwendig!  
(für Details zur Bestellung kontaktieren Sie Ihren Anbieter)

**BA E-1726**     **RELEASE-BUFF**                      **Release Buffer** - Ready to use

Inhalt:            Puffer mit physiologischem pH

Volumen:        1 x 250 ml/Fläschchen, Deckel weiß

#### 5. Probenmaterial und Lagerung

##### **Zellkulturen**

Lagerung: bis zu 6 Stunden bei 2 – 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C bis -80 °C.

##### **Urin**

Spontanurin oder 24 Stunden Sammelurin (gesammelt in einem Behälter mit 10 - 15 ml 6 M HCl).

Für die quantitative Bestimmung der im Verlauf eines Tages ausgeschiedenen Mengen ist es notwendig, das Volumen des Tagesurins 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.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden, ebenso direktes Sonnenlicht.

##### **Vollblut**


Heparinisiertes Vollblut ist erforderlich, das heißt, das durch Venenpunktion entnommene Vollblut wird in mit Heparin präparierten Blutabnahmegefäßen entnommen und direkt vorsichtig durchmischt.

Die Probe ist maximal 24 Stunden bei 20 – 25 °C stabil. Das Vollblut nicht gekühlt lagern, da dies zur Gerinnung der Leukozyten führt. Direktes Sonnenlicht vermeiden.

#### 6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

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.

 *Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss diese innerhalb von 10 Minuten nochmals bei 405 nm gemessen werden.*


#### 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


##### **Azylierungsreagenz** **ACYL-REAG**

 Das **ACYL-REAG** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Um sicherzustellen, dass es bei Gebrauch flüssig ist, muss sichergestellt sein, dass es vor der Verwendung Raumtemperatur angenommen hat und eine homogene, kristallfreie Lösung bildet.


## Vollblut

Zur Bestimmung von totalem Histamin in Vollblut wird das heparinisierte Vollblut 1 + 20 mit **RELEASE-BUFF** (BA E-1726) verdünnt und für **10 Min** bei **90 °C** inkubiert (z.B. 50 µl Vollblut plus 1 ml **RELEASE-BUFF**)  
Die Proben für **10 Min** auf **2 – 8 °C** abkühlen lassen.  
Für 10 Min bei 700 x g zentrifugieren (*die Bremse sollte ausgeschaltet werden!*)

## 6.2 Vorbereitung und Azylierung

1.	Jeweils <b>100 µl Standards</b> und <b>Kontrollen</b> sowie <b>20 µl</b> der <b>Zellkulturproben</b> oder <b>Urinproben</b> und <b>100 µl</b> der vorbereiteten <b>Vollblutproben</b> ( <i>siehe 6.1</i> ) in die entsprechenden Kavitäten der <b>REAC-PLATE</b> pipettieren.
2.	<b>80 µl DILUENT</b> in die Kavitäten der <b>Zellkulturproben</b> und <b>Urinproben</b> pipettieren.
3.	<b>25 µl ACYL-REAG</b> ( <i>siehe 6.1</i> ) in alle Kavitäten pipettieren.
4.	<b>200 µl ACYL-BUFF</b> in alle Kavitäten pipettieren.
5.	<b>15 Minuten</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <b>Alternativ ohne Schüttler:</b> Platte kurz per Hand schütteln und für <b>15 Min</b> bei <b>RT</b> (20 - 25 °C) inkubieren.
	<b>Jeweils 25 µl werden für den nachfolgenden ELISA verwendet</b>

## 6.3 Histamin ELISA

1.	<b>25 µl</b> der <b>azylierten Standards, Kontrollen und Proben</b> in die Kavitäten der <b>HIS</b> pipettieren.
2.	Jeweils <b>100 µl HIS-AS</b> in alle Kavitäten pipettieren.
3.	Platte <b>30 Min</b> bei <b>RT</b> (20 - 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <b>Alternativ ohne Schüttler:</b> Platte kurz per Hand schütteln und für <b>40 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) inkubieren.
4.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>3 mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	Jeweils <b>100 µl CONJUGATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Platte <b>10 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <b>Alternativ ohne Schüttler:</b> Platte kurz per Hand schütteln und für <b>20 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) inkubieren.
7.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>3 mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	Jeweils <b>100 µl SUBSTRATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
9.	Platte <b>15 ± 2 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <b>Alternativ ohne Schüttler:</b> Platte kurz per Hand schütteln und für <b>15 ± 2 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) inkubieren.
	<b>Direktes Sonnenlicht vermeiden!</b>
10.	<b>100 µl STOP-SOLN</b> in alle Kavitäten pipettieren und kurz per Hand schütteln.
11.	<b>Absorbtion</b> mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei <b>450 nm</b> (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten <b>messen</b> .

## 7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Histamine	
	Kontrollen	0.12 - 50 ng/ml
	Zellkulturen und Urin	0.6 – 250 ng/ml
	Vollblut	2.52 – 1050 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 entsprechende Standardkonzentration (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt. Die Auswertung muss mit einer nicht-linearen Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) erfolgen.

### Kontrollen

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

### Zellkulturproben

Die abgelesenen Konzentrationen müssen mit **5 multipliziert** werden.

### Vollblutproben

Die abgelesenen Konzentrationen müssen mit **21 multipliziert** werden.

### Urinproben

Die abgelesenen Konzentrationen müssen mit **5 multipliziert** werden.

Die Gesamtmenge, die im Verlauf von 24 Stunden ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:

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

### Umrechnung

$$\text{Histamin (ng/ml)} \times 9 = \text{Histamin (nmol/l)}$$

### Erwartete Referenzwerte

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

In einer Studie wurden Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem Histamin ELISA <sup>Fast Track</sup> folgende Werte:

Vollblut (totales Histamin)	24 Stunden-Sammelurin	Spontanurin
20 - 200 ng/ml	< 45 µg/Tag	< 45 µg/g Kreatinin

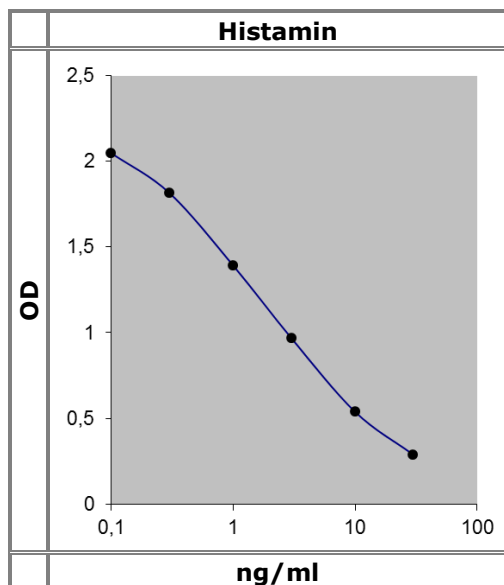
## 7.1 Qualitätskontrolle

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

Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		Histamin
	3-Methyl-Histamin	0,1
	Tyramin	0,01
	L-Phenylalanin	< 0,001
	L-Histidin	< 0,001
	L-Tyrosin	< 0,001
	Tryptamin	< 0,001
	5-Hydroxy-Indol- Essigsäure	< 0,001
	Serotonin	< 0,001

<b>Analytische Sensitivität (Limit of Detection)</b>	Histamin	0,2 ng/ml	Mittelwert (Null-Standard) + 2SD
--	----------	-----------	----------------------------------

<b>Präzision</b>					
<b>Inter-Assay Variation, n = 13</b>			<b>Intra-Assay Variation, n = 39</b>		
Probe	Mittelwert ± SD (ng/ml)	CV (%)	Probe	Mittelwert ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	2,03 ± 0,16	8	1	0,6 ± 0,1	12
2	6,74 ± 0,37	5,6	2	4,6 ± 0,3	6,3

<b>Linearität</b>		<b>Bereich (ng/ml)</b>	<b>Bereich (%)</b>	<b>Mittelwert (%)</b>
	Histamin	0.74 - 8.48	85 - 106	100







<b>Wiederfindung</b>		<b>Serielle Verdünnung bis</b>	<b>Bereich (%)</b>	<b>Mittelwert (%)</b>
	Histamin	1:16	92 - 120	103

## 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)

 **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	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer	<b>RUO</b>	Nur für Forschungszwecke