

# Histamin-Eliminierungs-Ratio (HERO) ELISA

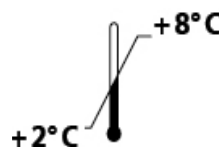
*Zur in-vitro-Bestimmung der Histamin-Eliminierung  
in Serum*

# Histamine elimination ratio (HERO) ELISA

*For the in vitro determination of histamine elimination  
in serum*

Gültig ab / Valid from 2022-05-23

**REF** K 8215



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND –VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>4</b>
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema Inkubation der Proben</i>	5
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<i>Biotininterferenz</i>	9
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	9
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	10
<i>Linearität</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Spezifität</i>	12
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>12</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>14</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der Histamin-Assay K 8215 ist ein Assay für professionelle Laboranwender zur quantitativen Bestimmung der Höhe der Histamin-Eliminierung in Serum von Patienten jeden Alters und Geschlechts.

Der Assay ist ein medizinisches In-vitro-Diagnostikum, welches manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden kann.

## 2. EINLEITUNG

Histamin ist ein biogenes Amin, welches durch Decarboxylierung von Histidin gebildet wird. Histamin wird in Mastzellen, Basophilen, Blutplättchen, histaminergen Neuronen und enterochromaffinen Zellen produziert und in Vesikeln gespeichert.

Nach Stimulation und Freisetzung bindet es an die vier Rezeptoren H1R, H2R, H3R und H4R der Zielzellen in diversen Geweben und führt unter anderem zur Kontraktion der glatten Muskelzellen, Vasodilatation, erhöhter vaskulärer Permeabilität, erhöhter Mucus-Sekretion, Tachykardie sowie zu Änderungen des Blutdrucks und zu Arrhythmien. Als vasoaktiver Mediator spielt es eine dominierende Rolle bei allergischen Erkrankungen wie Rhinitis allergica (Heuschnupfen), allergischem Asthma bronchiale und Urticaria.

Histamin wird im Körper über zwei Wege abgebaut: durch die extrazellulär vorliegende Diaminoxidase (DAO) und die vorwiegend intrazellulär vorliegende Histamin-N-Methyltransferase (HNMT).

Bei Patienten, die auf histaminreiche Nahrungsmittel eine der oben genannten allergischen oder pseudoallergischen Reaktionen zeigen, ist es von klinischem Interesse, in welchem Ausmaß Histamin im Serum eliminiert werden kann.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8215	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	2 x 12 x 8 Vertiefungen
K 0015	COPLATE	Kopplungsplatte	2 x 12 x 8 Vertiefungen
K 8215	INCPLATE	Inkubationsplatte für die Proben	12 x 8 Vertiefungen
K 8215	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml

K 8215	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml
K 8215	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8215	SPIKEREAG	Histaminhaltiges Spikereagenz	1 x 22 ml
K 8215	AB	Histamin-Antikörper, peroxidase- markiert, gebrauchsfertig	2 x 6 ml
K 8215	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 70 ml
K 8215	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	2 vials
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	2 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	2 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Brutschrank 37 °C
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥18,2 MΩ cm).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.

- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2-8 °C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Zum Rekonstituieren die auf dem Etikett angegebene Menge an **DMSO** zugeben und mit dem Vortex-Mixer mehrere Sekunden mischen, **15 min** stehen lassen und zwischendurch vortexen. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND –VORBEREITUNG

Frisch abgenommenes Serum kann bis zu 3 Tage bei Raumtemperatur oder 14 Tage bei 2-8 °C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Die Serumproben werden **unverdünnt** verwendet.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit Histamin versetzt und inkubiert sowie derivatisiert (siehe Testdurchführung).

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der Histamin-Eliminierung in Serum.

Der Assay besteht aus zwei Schritten: Einem Versetzen der Serumproben mit einer histaminhaltigen Reagenz, mit und ohne Inkubationszeit, und der anschließenden Ermittlung der Histaminkonzentrationen im ELISA.

### **Inkubation der Proben**

Die Serumproben werden mit dem histaminhaltigen Spikereagenz versetzt und über 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Histaminkonzentration in der inkubierten Probe im ELISA.

Es wird eine Referenzprobe erstellt, indem ein Aliquot der Serumprobe über 24 Stunden bei 2-8°C aufbewahrt wird und dann unmittelbar vor der Bestimmung der Histaminkonzentration im ELISA mit dem Spikereagenz versetzt wird.

### **Ermittlung der Histaminkonzentrationen im ELISA**

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung werden die Standards und Kontrollen, das über 24 h inkubierte Serum sowie die Referenzprobe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Histamins versetzt. Anschließend werden die derivatisierten Proben zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen Histamin-Antikörper in einer mit Histamin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Histamin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema Inkubation der Proben*

Die Serumproben in zwei Aliquots für inkubierte Probe und Referenzprobe aufteilen:

	<b>Inkubierte Proben:</b>	<b>Referenzproben:</b>
1.	<b>100 µl</b> Serum in die Inkubationsplatte (INCPLATE) oder in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aus Polypropylen pipettieren.	<b>125 µl</b> Serum <b>24 h bei 2-8 °C</b> als Referenz aufbewahren.
2.	<b>200 µl</b> Spikereagenz (SPIKEREAG) zu jeder Probe in der Inkubationsplatte oder den Gefäßen pipettieren. Die Inkubationsplatte mit der Noppenmatte <b>dicht verschließen</b> bzw. die Gefäße schließen. Anschließend <b>1 min</b> auf einem <b>Horizontalschüttler</b> gründlich mischen.	
3.	<b>24 h bei 37 °C</b> inkubieren.	
4.		Am nächsten Tag: <b>100 µl</b> der Referenzprobe in die Inkubationsplatte (INCPLATE) oder in Reaktionsgefäße pipettieren.
5.		<b>200 µl</b> Spikereagenz (SPIKEREAG) zu jeder Referenzprobe pipettieren und <b>1 min</b> auf einem <b>Horizontalschüttler</b> gründlich mischen.

Anschließend die Referenzproben sowie die inkubierten Proben **sofort** zusammen weiterverarbeiten, siehe Pipettierschema Derivatisierung.

### *Pipettierschema Derivatisierung*

Vor Gebrauch alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Die Derivatisierung der Standards, Kontrollen, inkubierten Proben und Referenzproben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt. Alternativ dazu kann die Derivatisierung auch in den Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) durchgeführt werden.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte (PLATE) aufzutragen.

6.	<b>25 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ inkubierte Probe/ Referenzprobe</b> in Mikroreaktionsgefäße bzw. in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) pipettieren.
7.	<b>250 µl Reaktionspuffer (REABUF)</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Proben) bzw. in jede Vertiefung der Kopplungsplatte pipettieren.
8.	<b>50 µl Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen. Anschließend auf einem <b>Horizontalschüttler 30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren. <i>Alternativ dazu: 50 µl Derivatisierungsreagenz</i> in jede Vertiefung (STD, CTRL, Probe) der Kopplungsplatte pipettieren und sofort auf einem <b>Horizontalschüttler 30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren. Die Kopplungsplatte mit dem mitgelieferten Deckel abdecken, sie darf <u>nicht</u> mit Folie abgeklebt werden.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

Die benötigten Mikrotiterstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

9.	<b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen, oder der COPLATE, als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
10.	<b>50 µl Histamin-Antikörper (AB)</b> in jede Vertiefung pipettieren.
11.	Platte mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde</b> bei 18-25 °C <b>unter Schütteln</b> inkubieren.
12.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
13.	<b>100 µl Substrat (SUB)</b> in jede Vertiefung pipettieren.
14.	<b>12-18 min*</b> bei 18-25 °C im <b>Dunkeln</b> inkubieren.



15.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
16.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:

Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 30 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

## 8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### **Berechnung der Histamin-Eliminierungs-Ratio**

Für die Berechnung der Histamin-Eliminierungs-Ratio (HERO) wird die Differenz der Histaminkonzentration von Referenzprobe und inkubierter Probe durch die Konzentration der Referenzprobe geteilt.

$$\text{HERO [\%]} = \frac{c(\text{Histamin}) \text{ Referenz} - c(\text{Histamin}) \text{ inkubierte Probe}}{c(\text{Histamin}) \text{ Referenz}} \times 100$$

## **9. EINSCHRÄNKUNGEN**

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 343$  ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von  $< 25$  %. Höhere Biotinkonzentrationen können zu falschen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die  $> 5$  mg/Tag Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert werden.

## **10. QUALITÄTSKONTROLLE**

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### *Referenzwerte*

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n = 42$ ) wurde eine mittlere Histamin-Eliminierungs-Ratio (HERO) von 45 % ermittelt (Median). Schwache, mäßige und gute Eliminierung wurde folgendermassen definiert:

Schwache Eliminierung: HERO < 25 %  
 Mäßige Eliminierung: HERO 25-40 %  
 Gute Eliminierung: HERO > 40 %

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Genauigkeit – Präzision*

#### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 6**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge identisch) in Einzelbestimmungen bestimmt.

Probe	Mittelwert inkubierte Probe [ng/ml]	Mittelwert Referenzprobe [ng/ml]	Mittelwert HERO [%]	VK [%]
1	1,8	23,0	92,2	3,4
2	8,2	20,7	60,2	6,3

#### **Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 6**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit jeweils 6 Proben von 2 Personen unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge unterschiedlich) in Doppelbestimmungen bestimmt.

Proben von	Mittelwert inkubierte Probe [ng/ml]	Mittelwert Referenzprobe [ng/ml]	Mittelwert HERO [%]	VK [%]
A	2,8	18,1	84,4	8,0
B	7,5	18,1	57,8	11,1

### *Genauigkeit – Richtigkeit*

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 3 Serumproben mit bekannten Histamin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
0,35	3,10	3,45	3,61	104,7
	6,43	6,78	6,35	93,7
	9,77	10,12	8,65	85,5
0,49	3,01	3,50	3,48	99,6
	6,34	6,83	6,27	91,8
	9,68	10,16	8,67	85,4
0,59	2,94	3,53	3,36	95,1
	6,28	6,86	5,94	86,6
	9,61	10,20	8,02	78,6

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 4 gespikten Serumproben mit einer niedrigen Serumprobe mit 0,6 ng/ml Histamin-Gehalt nachgewiesen.

Für Histamin in Serum wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 3,0 ng/ml bis 30,5 ng/ml nachgewiesen mit einer Wiederfindung von 83,6 – 117,9 %.

Probe [ng/ml]	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
19,8	1:1,5	13,4	13,7	102,6
	1:2	10,2	10,5	103,5
	1:3	7,0	7,1	101,4
	1:4	5,4	5,6	104,2
	1:5	4,4	5,2	117,9
	1:6	3,8	4,0	106,2
	1:8	3,0	2,8	93,8
23,5	1:1,5	15,8	14,9	94,3
	1:2	12,0	10,4	86,1
	1:3	8,2	7,5	91,6
	1:4	6,3	6,1	97,5
	1:5	5,2	4,4	84,3
	1:6	4,4	4,4	99,9
	1:8	3,4	3,3	95,8

30,5	1:1,5	20,5	20,4	99,4
	1:2	15,5	13,0	83,6
	1:3	10,6	9,8	93,2
	1:4	8,1	8,5	104,9
	1:5	6,6	6,9	105,4
	1:6	5,6	6,3	113,3
	1:8	4,3	5,1	118,6
22,8	1:1,5	15,4	16,1	104,4
	1:2	11,7	10,1	86,2
	1:3	8,0	8,9	111,7
	1:4	6,1	5,3	86,2
	1:5	5,0	4,4	86,5
	1:6	4,3	4,0	93,2
	1:8	3,4	3,4	99,6

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 80-mal die Matrix des Spikereagenzes. Die Messungen ergab eine Nachweisgrenze von 0,9 ng/ml.

### Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Histamin-Reaktivität:

3-Methylhistamin	< 0,1 %
Tyramin	< 0,001 %
L-Phenylalanin	< 0,0002 %
L-Histidin	< 0,0002 %
L-Tyrosin	< 0,0002 %
Tryptamin	< 0,0002 %
5-Hydroxyindolessigsäure	< 0,0002 %
Serotonin (5-Hydroxytryptamin)	< 0,0002 %

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen ProClin oder Thimerosal. ProClin bzw. Thimerosal sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- ELISA-Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 15. LITERATUR

1. Kufner MA, Schwelberger HG, Ulrich P, Hahn EG, Raithel M. Total histamine degradation capacity (THDC) as an important biological marker of histamine metabolism in human colonic mucosa. *Inflamm Res.* 2002 Apr;51 Suppl 1:S87-8. doi: 10.1007/pl00022461. PMID: 12013425.
2. Kufner MA, Ulrich P, Raithel M, Schwelberger HG. Determination of histamine degradation capacity in extremely small human colon samples. *Inflamm Res.* 2001 Apr; 50 Suppl 2:S96-7. doi: 10.1007/PL00022422. PMID: 11411621.
3. Raithel M, Kufner MA, Ulrich P, Hahn EG. The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm Res.* 1999 Apr; 48 Suppl 1: S75-6. doi: 10.1007/s000110050414. PMID: 10350171.

**Verwendete Symbole:**

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs



Manual

# Histamine elimination ratio (HERO) ELISA

*For the in vitro determination of histamine elimination  
in serum*

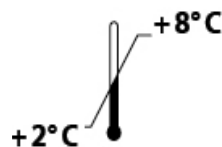
Valid from 2022-05-23



**K 8215**



192



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>18</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>20</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Incubation of samples</i>	21
<i>Derivatisation procedure</i>	22
<i>Test procedure</i>	23
<b>8. RESULTS</b>	<b>24</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<i>Biotin interference</i>	24
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>25</b>
<i>Reference range</i>	25
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Accuracy – Trueness</i>	26
<i>Linearity</i>	26
<i>Analytical sensitivity</i>	27
<i>Specificity</i>	27
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>28</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>28</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>29</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>29</b>

## 1. INTENDED USE

The histamine assay K 8215 is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) intended for professional laboratory users for the quantitative measurement of serum histamine elimination from patients of any age and gender.

The assay is an *in vitro* diagnostic medical device, which can be used manually or by an automated platform.

## 2. INTRODUCTION

Histamine is a biogenic amine that derives from the decarboxylation of histidine. It is synthesised in mast cells, basophils, platelets, histaminergic neurons and enterochromaffine cells, where it is stored in vesicles. After stimulation and release, 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, vasodilation, increased vascular permeability, increased mucous secretion, tachycardia, alterations of blood pressure and arrhythmias, among other effects. As a vasoactive mediator, it plays a dominant role in allergic diseases such as allergic rhinitis (hay fever), allergic bronchial asthma, and urticaria.

Histamine is mainly degraded by two pathways: By the extracellular diaminoxidase (DAO) and by the predominantly intracellular histamine N-methyltransferase (HNMT).

Measurement of serum histamine depletion is of clinical interest in patients showing one of the above-mentioned allergic or pseudoallergic reactions to histamine-rich foods.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 8215	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	2 x 12 x 8 wells
K 0015	COPLATE	Plate for derivatisation	2 x 12 x 8 wells
K 8215	INCPLATE	Plate for sample incubation	12 x 8 wells
K 8215	STD	Standards, ready-to-use (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml
K 8215	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml

K 8215	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 8215	SPIKEREAG	Spiking reagent containing histamine	1 x 22 ml
K 8215	AB	Histamine antibody, peroxidase- labelled, ready-to-use	2 x 6 ml
K 8215	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 70 ml
K 0008.10	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	2 vials
K 0002.15	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	2 x 10 ml
K 0003.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 8215	STOP	Stop solution, ready-to-use	2 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Incubator 37 °C
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in

the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.

- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Bring to room temperature before opening and dissolve the content of the vial in **DMSO** as stated on the label. Allow to dissolve for **15 min** and mix thoroughly with a vortex-mixer. **The derivatisation reagent** (reconstituted DER) can be stored at **2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum samples are stable for 3 days at room temperature or for 14 days at 2-8 °C. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.

Serum samples are analysed **undiluted**.

For sample preparation, samples are spiked with histamine and incubated, and a derivatisation reagent is added (see assay procedure).

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of histamine elimination in serum.

The assay consists of two steps: spiking of the serum samples with a histamine-containing reagent and incubation, and determination of histamine concentrations in the ELISA.

### **Incubation of samples**

A histamine-containing spiking reagent is added to the serum sample and it is incubated at 37 °C for 24 hours. The histamine concentration of this sample is then determined by ELISA.

A reference sample is prepared by storing an aliquot of the serum sample at 2-8 °C for 24 hours and then adding the spiking reagent immediately before determining the histamine concentration in the ELISA.

### Determination of histamine concentrations in the ELISA

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The preparation of standards, controls, incubated samples and reference samples includes the addition of a derivatisation reagent for histamine derivatisation. Afterwards, the treated samples and a peroxidase-conjugated polyclonal histamine antibody are incubated in wells of a microtiter plate coated with histamine derivative (tracer). During the incubation period, the target histamine in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies.

After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the histamine concentration in the sample; this means, high histamine concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibody and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. Histamine, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### *Incubation of samples*

Take two aliquots of the serum samples, for incubated sample and for reference sample:

#### **Incubated samples:**

#### **Reference samples:**

1.	Add <b>100 µl</b> serum into the incubation plate (INCPLATE) or in 1,5 ml polypropylene reaction vials.	store <b>125 µl</b> serum for <b>24 hours at 2-8 °C</b> as a reference.
2.	Add <b>200 µl</b> spiking reagent (SPIKEREAG) to each sample in the incubation plate or the vials. <b>Close</b> the incubation plate <b>tightly</b> with the cap mat or close the vials, respectively. Mix thoroughly on a <b>horizontal shaker</b> for <b>1 minute</b> .	

3.	Incubate for <b>24 hours at 37 °C.</b>	
4.		The next day: Add <b>100 µl</b> of the reference sample into the incubation plate (INCPLATE) or in polypropylene reaction vials.
5.		Add <b>200 µl</b> spiking reagent (SPIKEREAG) to each reference sample and mix thoroughly on a <b>horizontal shaker</b> for <b>1 minute</b> .

Then **immediately** process the reference samples and the incubated samples together, see derivatisation procedure.

### *Derivatisation procedure*

Bring **all reagents to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Derivatisation of standards and controls, incubated samples and reference samples is carried out in reaction vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials). Alternatively, the derivatisation can be carried out in the wells of the COPLATE.

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate (PLATE).

6.	Add <b>25 µl standard</b> (STD)/ <b>control</b> (CTRL)/ <b>incubated sample/ reference sample</b> into the respective vials, or into the wells of the COPLATE.
7.	Add <b>250 µl reaction buffer</b> (REABUF) into the vials (STD, CTRL, samples) or the wells of the COPLATE.
8.	Add <b>50 µl derivatisation reagent</b> into each vial (STD, CTRL, sample) and <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> . <i>Alternatively:</i> Add <b>50 µl derivatisation reagent</b> into each well (STD, CTRL, sample) of the COPLATE and incubate immediately on a <b>horizontal shaker</b> for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C). Cover the COPLATE with the supplied lid, do <u>not</u> cover it with foil.

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

## Test procedure

Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered with foil at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

9.	For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/samples</b> out of the vials, or the COPLATE, and add into the respective wells of the microtiter plate.
10.	Add <b>50 µl histamine antibody (AB)</b> into each well of the microtiter plate.
11.	Cover the strips tightly with foil and incubate for <b>1 hour</b> at 18-25 °C on a <b>horizontal shaker</b> .
12.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
13.	Add <b>100 µl substrate (SUB)</b> into each well.
14.	Incubate for <b>12-18 min*</b> at 18-25 °C in the <b>dark</b> .
15.	Add <b>100 µl stop solution (STOP)</b> into each well and mix well.
16.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm (690 nm) as a reference.

\* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. Attention should be paid to the following points:

Derivatisation of the samples is possible in 30 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.



## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

### 3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the program used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Calculation of the histamine elimination ratio

For the calculation of the histamine elimination ratio (HERO), the difference of the histamine concentrations of reference and incubated sample is divided by the concentration of the reference sample.

$$\text{HERO [\%]} = \frac{c(\text{histamine}) \text{ reference} - c(\text{histamine}) \text{ incubated sample}}{c(\text{histamine}) \text{ reference}} \times 100$$

## 9. LIMITATIONS

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 343$  ng/ml show a change of the results of  $< 25$  %. Higher concentrations of biotin can lead to false results. Patients taking  $> 5$  mg biotin per day should wait at least 24 hours after taking biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

### *Reference range*

Based on internal studies with samples of apparently healthy persons (n = 42) a mean histamine elimination ratio of 45 % (median) was calculated. Weak, moderate and good elimination was defined as follows:

Weak Elimination:	HERO < 25 %
Moderate Elimination:	HERO 25-40 %
Good Elimination	HERO > 40 %

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 6**

The repeatability was assessed with 2 samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot) in single determinations.

Sample	Mean value incubated sample [%]	Mean value reference sample [%]	Mean value HERO [%]	CV [%]
1	1.8	23.0	92.2	3.4
2	8.2	20.7	60.2	6.3

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 6**

The reproducibility was assessed with 6 samples from 2 persons under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots) in duplicate determinations.

Samples from	Mean value incubated sample [%]	Mean value reference sample [%]	Mean value HERO [%]	CV [%]
A	2.8	18.1	84.4	8.0
B	7.5	18.1	57.8	11.1

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, histamine spikes with known concentrations were added to 3 different samples.

sample [ng/ml]	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
0.35	3.10	3.45	3.61	104.7
	6.43	6.78	6.35	93.7
	9.77	10.12	8.65	85.5
0.49	3.01	3.50	3.48	99.6
	6.34	6.83	6.27	91.8
	9.68	10.16	8.67	85.4
0.59	2.94	3.53	3.36	95.1
	6.28	6.86	5.94	86.6
	9.61	10.20	8.02	78.6

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed with a serial dilution of 4 spiked serum samples with a low level serum sample containing 0.6 ng/l histamine.

For histamine in serum, the method has been demonstrated to be linear from 3.0 to 30.5 ng/ml with a recovery rate of 83.6 to 117.9 %.

sample [ng/ml]	dilution	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
19.8	1:1.5	13.4	13.7	102.6
	1:2	10.2	10.5	103.5
	1:3	7.0	7.1	101.4
	1:4	5.4	5.6	104.2
	1:5	4.4	5.2	117.9
	1:6	3.8	4.0	106.2
	1:8	3.0	2.8	93.8

23.5	1:1.5	15.8	14.9	94.3
	1:2	12.0	10.4	86.1
	1:3	8.2	7.5	91.6
	1:4	6.3	6.1	97.5
	1:5	5.2	4.4	84.3
	1:6	4.4	4.4	99.9
	1:8	3.4	3.3	95.8
30.5	1:1.5	20.5	20.4	99.4
	1:2	15.5	13.0	83.6
	1:3	10.6	9.8	93.2
	1:4	8.1	8.5	104.9
	1:5	6.6	6.9	105.4
	1:6	5.6	6.3	113.3
	1:8	4.3	5.1	118.6
22.8	1:1.5	15.4	16.1	104.4
	1:2	11.7	10.1	86.2
	1:3	8.0	8.9	111.7
	1:4	6.1	5.3	86.2
	1:5	5.0	4.4	86.5
	1:6	4.3	4.0	93.2
	1:8	3.4	3.4	99.6

### *Analytical sensitivity*

The matrix of the spiking reagent was measured 80 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 \text{ SD}$  and estimated to be 0.9 ng/ml.

### *Specificity*

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to histamine. The specificity is calculated in percent, in relation to the histamine-binding activity:

3-methylhistamine	< 0.1 %
tyramine	< 0.001 %
L-phenylalanine	< 0.0002 %
L-histidine	< 0.0002 %
L-tyrosine	< 0.0002 %
tryptamine	< 0.0002 %

5-hydroxyindoleacetic acid	< 0.0002 %
serotonin (5-hydroxytryptamine)	< 0.0002 %

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain ProClin or thimerosal as bactericides. ProClin and thimerosal are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during ELISA incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

















## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Kufner MA, Schwelberger HG, Ulrich P, Hahn EG, Raithel M. Total histamine degradation capacity (THDC) as an important biological marker of histamine metabolism in human colonic mucosa. *Inflamm Res*. 2002 Apr;51 Suppl 1:S87-8. doi: 10.1007/pl00022461. PMID: 12013425
2. Kufner MA, Ulrich P, Raithel M, Schwelberger HG. Determination of histamine degradation capacity in extremely small human colon samples. *Inflamm Res*. 2001 Apr; 50 Suppl 2:S96-7. doi: 10.1007/PL00022422. PMID: 11411621.
3. Raithel M, Kufner MA, Ulrich P, Hahn EG. The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm Res*. 1999 Apr; 48 Suppl 1: S75-6. doi: 10.1007/s000110050414. PMID: 10350171.

**Used symbols:**

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin