

Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only

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 2025-01-20

REF

K 8215



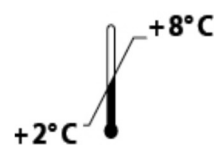
192

REF

K 8215.10



10 x 192



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

www.immundiagnostik.com

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel HINWEISE UND VORSICHTSMASSAHMEN zu entnehmen.

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
6. PROBENLAGERUNG UND –VORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Inkubation und Derivatisierung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	9
8. ERGEBNISSE	10
9. EINSCHRÄNKUNGEN	11
<i>Biotininterferenz</i>	11
10. QUALITÄTSKONTROLLE	12
<i>Referenzwerte</i>	12
11. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	12
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	13
<i>Linearität</i>	13
<i>Analytische Sensitivität</i>	14
<i>Spezifität</i>	14
12. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	15
13. TECHNISCHE MERKMALE	15
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	16
15. LITERATUR	16
16. SYMBOLE	17

1. VERWENDUNGSZWECK

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

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

2. EINLEITUNG

Histamin ist ein biogenes Amin, das 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 zu Kontraktion der glatten Muskelzellen, Vasodilatation, erhöhter vaskulärer Permeabilität, erhöhter Mucus-Sekretion, Tachykardie sowie Blutdruckänderungen und 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 auf zwei Wegen abgebaut: durch die extrazelluläre Diaminoxidase (DAO) und die vorwiegend intrazelluläre Histamin-N-Methyltransferase (HNMT).

Bei Patienten, die eine der oben genannten allergischen oder pseudoallergischen Reaktionen auf histaminreiche Nahrungsmittel zeigen, ist es von klinischem Interesse, das Ausmaß der Histamineliminierung im Serum zu bestimmen.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge für Art.-Nr.	
			K 8215	K 8215.10
K 8215	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	2 x 12 x 8 Vertiefungen	20 x 12 x 8 Vertiefungen
K 0015	COPLATE	Kopplungsplatte	2 x 12 x 8 Vertiefungen	20 x 12 x 8 Vertiefungen
K 8215	INCPLATE	Inkubationsplatte	12 x 8 Vertiefungen	10 x 12 x 8 Vertiefungen
K 8215	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml	5 x 6 x 2 ml

K 8215	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml	5 x 2 ml
K 8215	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml	5 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml	15 x 100 ml
K 8215	SAMPLEBUF	Probenpuffer	1 x 22 ml	10 x 22 ml
K 8215	AB	Histamin-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	2 x 6 ml	20 x 6 ml
K 8215	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 70 ml	8 x 70 ml
K 8215	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	2 vials	20 vials
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	2 x 10 ml	20 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	2 x 15 ml	20 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie bitte 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 (1100 rpm und 550 rpm mit 2 mm Orbit; z.B. Modell Shake ID2, erhältlich bei Immundiagnostik AG)
- 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 ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

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** mit Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildung 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** 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 einige Sekunden mischen, **15 min** stehen lassen und zwischendurch vortexen. Es muss vollständig gelöst sein. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Kunststoffe 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 längerer Lagerung sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Die Serumproben werden **unverdünnt** verwendet.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit histaminhaltigem Probenpuffer versetzt, unterschiedlich gelagert und derivatisiert (siehe Testdurchführung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung der Histamin-Eliminierung in Serum. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zunächst werden die Serumproben mit einem histaminhaltigen Probenpuffer versetzt und je ein Aliquot davon für 24 h bei 4 °C bzw. bei 37 °C gelagert.

Die Histaminkonzentrationen in den beiden Aliquots werden dann nach einer Derivatisierung im ELISA gemessen.

Zur Vorbereitung dafür werden die Standards, die Kontrollen und die beiden Aliquots mit einem patentierten Derivatisierungsreagenz versetzt, um das enthaltene Histamin zu derivatisieren. Die derivatisierten Proben werden zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen Histamin-Antikörper in einer mit Histamin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation konkurriert 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. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. 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 Histaminkonzentration in der Probe sinkt 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 und Derivatisierung

Für die Lagerung der Aliquots bei 37 °C wird die Inkubationsplatte (INCPLATE) verwendet. Alternativ dazu können auch Mikroreaktionsgefäße (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) verwendet werden.

Die Derivatisierung von Standards, Kontrollen, 37°C- und 4°C-Aliquots erfolgt in der Kopplungsplatte (COPLATE). Alternativ dazu können auch Mikroreaktionsgefäße aus Polypropylen verwendet werden

Wir empfehlen, je eine Derivatisierung pro Standard, Kontrolle und Aliquot durchzuführen und jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatten (PLATE) zu geben.

Tag 1:

1.	100 µl Serum in die jeweiligen Vertiefungen der INCPLATE pipettieren.
2.	200 µl Probenpuffer (SAMPLEBUF) zu jeder Probe in der INCPLATE pipettieren. INCPLATE mit der Noppenmatte verschließen und 1 min auf einem Horizontalschüttler gründlich mischen .
3.	25 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL) in die Vertiefungen der COPLATE pipettieren.
4.	25 µl vorbereitete Probe aus der INCPLATE in die COPLATE pipettieren.
5.	COPLATE mit Folie dicht abkleben und 24 h bei bei 2-8 °C lagern (4°C-Aliquot).
6.	INCPLATE mit der Noppenmatte wieder dicht verschließen und 24 h bei 37 °C inkubieren (37°C-Aliquot).

Beispiel Plattenbelegung INCPLATE (37 °C), optimiert für Mehrkanalpipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P9	P17	P21	P29	P37						
B	P2	P10	P18	P22	P30	P38						
C	P3	P11	P19	P23	P31	P39						
D	P4	P12	P20	P24	P32	P40						
E	P5	P13		P25	P33							
F	P6	P14		P26	P34							
G	P7	P15		P27	P35							
H	P8	P16		P28	P36							

Beispiel Plattenbelegung COPLATE (2-8 °C), optimiert für Mehrkanalpipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1		<i>P1</i>		<i>P9</i>				<i>P21</i>		<i>P29</i>	
B	STD2		<i>P2</i>		<i>P10</i>				<i>P22</i>		<i>P30</i>	
C	STD3		<i>P3</i>		<i>P11</i>				<i>P23</i>		<i>P31</i>	
D	STD4		<i>P4</i>		<i>P12</i>				<i>P24</i>		<i>P32</i>	
E	STD5		<i>P5</i>		<i>P13</i>	<i>P17</i>			<i>P25</i>		<i>P33</i>	<i>P37</i>
F	STD6		<i>P6</i>		<i>P14</i>	<i>P18</i>			<i>P26</i>		<i>P34</i>	<i>P38</i>
G	CTRL1		<i>P7</i>		<i>P15</i>	<i>P19</i>			<i>P27</i>		<i>P35</i>	<i>P39</i>
H	CTRL2		<i>P8</i>		<i>P16</i>	<i>P20</i>			<i>P28</i>		<i>P36</i>	<i>P40</i>

fett = 37 °C-Aliquots

kursiv = 4 °C-Aliquot

Tag 2:

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

7.	25 µl der 37 °C-Aliquots aus der INCPLATE in die jeweiligen Vertiefungen der COPLATE pipettieren.
8.	250 µl Reaktionspuffer (REABUF) in jede Vertiefung (STD, CTRL, Aliquots) der COPLATE pipettieren.
9.	50 µl Derivatisierungsreagenz in jede Vertiefung (STD, CTRL, Aliquots) der COPLATE pipettieren. COPLATE auf einem Horizontalschüttler gründlich mischen . Wir empfehlen, bei 1100 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln, um eine vollständige Durchmischung zu erreichen.
10.	COPLATE 30 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.

Beispiel Plattenbelegung COPLATE (Derivatisierung), optimiert für Mehrkanalpipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	P1	<i>P1</i>	P9	<i>P9</i>	P17		P21	<i>P21</i>	P29	<i>P29</i>	P37
B	STD2	P2	<i>P2</i>	P10	<i>P10</i>	P18		P22	<i>P22</i>	P30	<i>P30</i>	P38
C	STD3	P3	<i>P3</i>	P11	<i>P11</i>	P19		P23	<i>P23</i>	P31	<i>P31</i>	P39
D	STD4	P4	<i>P4</i>	P12	<i>P12</i>	P20		P24	<i>P24</i>	P32	<i>P32</i>	P40
E	STD5	P5	<i>P5</i>	P13	<i>P13</i>	<i>P17</i>		P25	<i>P25</i>	P33	<i>P33</i>	<i>P37</i>
F	STD6	P6	<i>P6</i>	P14	<i>P14</i>	<i>P18</i>		P26	<i>P26</i>	P34	<i>P34</i>	<i>P38</i>
G	CTRL1	P7	<i>P7</i>	P15	<i>P15</i>	<i>P19</i>		P27	<i>P27</i>	P35	<i>P35</i>	<i>P39</i>
H	CTRL2	P8	<i>P8</i>	P16	<i>P16</i>	<i>P20</i>		P28	<i>P28</i>	P36	<i>P36</i>	<i>P40</i>

fett = 37 °C-Aliquots

kursiv = 4 °C-Aliquots

Pipettierschema Testdurchführung

Die benötigten Mikrotiterstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

11.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/ Kontrollen/ Aliquots aus der COPLATE als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten (PLATE) pipettieren.
12.	50 µl Histamin-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
13.	Platte mit Folie dicht abkleben und 1 Stunde bei 18-25 °C unter Schütteln inkubieren. Wir empfehlen, bei 550 rpm mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.
14.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
16.	12-18 min* bei 18-25 °C im Dunkeln inkubieren.
17.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
18.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm 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 405 nm 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.

Beispiel Plattenbelegung PLATE 1, optimiert für Mehrkanalpipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	P1	P1	<i>P1</i>	<i>P1</i>	P9	P9	<i>P9</i>	<i>P9</i>	P17	P17
B	STD2	STD2	P2	P2	<i>P2</i>	<i>P2</i>	P10	P10	<i>P10</i>	<i>P10</i>	P18	P18
C	STD3	STD3	P3	P3	<i>P3</i>	<i>P3</i>	P11	P11	<i>P11</i>	<i>P11</i>	P19	P19
D	STD4	STD4	P4	P4	<i>P4</i>	<i>P4</i>	P12	P12	<i>P12</i>	<i>P12</i>	P20	P20
E	STD5	STD5	P5	P5	<i>P5</i>	<i>P5</i>	P13	P13	<i>P13</i>	<i>P13</i>	<i>P17</i>	<i>P17</i>
F	STD6	STD6	P6	P6	<i>P6</i>	<i>P6</i>	P14	P14	<i>P14</i>	<i>P14</i>	<i>P18</i>	<i>P18</i>
G	CTRL1	CTRL1	P7	P7	<i>P7</i>	<i>P7</i>	P15	P15	<i>P15</i>	<i>P15</i>	<i>P19</i>	<i>P19</i>
H	CTRL2	CTRL2	P8	P8	<i>P8</i>	<i>P8</i>	P16	P16	<i>P16</i>	<i>P16</i>	<i>P20</i>	<i>P20</i>

Beispiel Plattenbelegung PLATE 2, optimiert für Mehrkanalpipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	P21	P21	<i>P21</i>	<i>P21</i>	P29	P29	<i>P29</i>	<i>P29</i>	P37	P37
B	STD2	STD2	P22	P22	<i>P22</i>	<i>P22</i>	P30	P30	<i>P30</i>	<i>P30</i>	P38	P38
C	STD3	STD3	P23	P23	<i>P23</i>	<i>P23</i>	P31	P31	<i>P31</i>	<i>P31</i>	P39	P39
D	STD4	STD4	P24	P24	<i>P24</i>	<i>P24</i>	P32	P32	<i>P32</i>	<i>P32</i>	P40	P40
E	STD5	STD5	P25	P25	<i>P25</i>	<i>P25</i>	P33	P33	<i>P33</i>	<i>P33</i>	<i>P37</i>	<i>P37</i>
F	STD6	STD6	P26	P26	<i>P26</i>	<i>P26</i>	P34	P34	<i>P34</i>	<i>P34</i>	<i>P38</i>	<i>P38</i>
G	CTRL1	CTRL1	P27	P27	<i>P27</i>	<i>P27</i>	P35	P35	<i>P35</i>	<i>P35</i>	<i>P39</i>	<i>P39</i>
H	CTRL2	CTRL2	P28	P28	<i>P28</i>	<i>P28</i>	P36	P36	<i>P36</i>	<i>P36</i>	<i>P40</i>	<i>P40</i>

fett = 37 °C-Aliquots

kursiv = 4 °C-Aliquots

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 Histaminkonzentrationen von 4°C-Aliquot und 37°C-Aliquot durch die Konzentration des 4°C-Aliquots geteilt.

$$\text{HERO [\%]} = \frac{c(\text{Histamin})_{4^\circ\text{C-Aliquot}} - c(\text{Histamin})_{37^\circ\text{C-Aliquot}}}{c(\text{Histamin})_{4^\circ\text{C-Aliquot}}} \times 100$$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Biotininterferenz

Proben, die Biotin in einer Konzentration von ≤ 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, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) in Einzelbestimmungen bestimmt.

Probe	Mittelwert 37°C-Aliquot [ng/ml]	Mittelwert 4°C-Aliquot [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, Messgeräte, Tag, Kitcharge unterschiedlich) in Doppelbestimmungen bestimmt.

Proben von	Mittelwert 37°C-Aliquot [ng/ml]	Mittelwert 4°C-Aliquot [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 Probenpuffers. 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. HINWEISE UND 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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H₂SO₄ 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.
4. Kellner KH. Automatenfähiger Immunoassay für Biogene Amine. Europäisches Patent 2 612 147 B1. 30.03.2016

16. SYMBOLE

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

Manual*For professional use only*

Histamine elimination ratio (HERO) ELISA

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

Gültig ab / Valid from 2025-01-20



K 8215



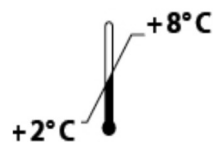
192



K 8215.10



10 x 192



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit.

Important safety information for this product can be found in the chapter **WARNINGS AND PRECAUTIONS**.

Table of Contents

1. INTENDED USE	21
2. INTRODUCTION	21
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	23
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	23
7. ASSAY PROCEDURE	24
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Incubation and derivatisation procedure</i>	24
<i>Test procedure</i>	26
8. RESULTS	28
9. LIMITATIONS	29
<i>Biotin interference</i>	29
10. QUALITY CONTROL	29
<i>Reference range</i>	29
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	29
<i>Precision and reproducibility</i>	29
<i>Accuracy – Trueness</i>	30
<i>Linearity</i>	30
<i>Analytical sensitivity</i>	31
<i>Specificity</i>	32
12. WARNINGS AND PRECAUTIONS	32
13. TECHNICAL HINTS	32
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	33
15. REFERENCES	33
16. SYMBOLS	34

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 all ages and gender.

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

2. INTRODUCTION

Histamine is a biogenic amine derived 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.

Its effects include smooth muscle cell contraction, vasodilation, increased vascular permeability, increased mucous secretion, tachycardia, blood pressure changes and arrhythmias. 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 for cat.no.	
			K 8215	K 8215.10
K 8215	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	2 x 12 x 8 wells	20 x 12 x 8 wells
K 0015	COPLATE	Plate for derivatisation	2 x 12 x 8 wells	20 x 12 x 8 wells
K 8215	INCPLATE	Plate for incubation	12 x 8 wells	10 x 12 x 8 wells
K 8215	STD	Standards, ready-to-use (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml	5 x 6 x 2 ml

K 8215	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml	5 x 2 ml
K 8215	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml	5 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml	15 x 100 ml
K 8215	SAMPLEBUF	Sample buffer	1 x 22 ml	10 x 22 ml
K 8215	AB	Histamine antibody, peroxidase-labelled, ready- to-use	2 x 6 ml	20 x 6 ml
K 8215	REABUF	Reaction buffer, ready-to- use	1 x 70 ml	8 x 70 ml
K 8215	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	2 vials	20 vials
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	2 x 10 ml	20 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	2 x 15 ml	20 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 (1100 rpm and 550 rpm with orbit 2 mm, for example model ShakeID 2, available at Immundiagnostik AG)
- 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. Ensure that it is completely dissolved. **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 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 treated with a histamine-containing sample buffer, stored, 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 test is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

In a first step, the serum samples are mixed with a sample buffer containing histamine and aliquots are treated at 4 °C or 37 °C for 24 hours.

The histamine concentrations of both aliquots are then measured in the ELISA.

The preparation of standards, controls, and aliquots includes the addition of a derivatisation reagent for histamine derivatisation. The prepared samples and a peroxidase-conjugated polyclonal histamine antibody are then 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 samples, is determined directly from this curve.

Incubation and derivatisation procedure

The incubation plate (INCPLATE) is used to treat the aliquots at 37 °C. Alternatively, reaction vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials) can be used.

The derivatisation of standards, controls, 37 °C and 4 °C aliquots is carried out in the derivatisation plate (COPLATE). Alternatively, micro reaction vials made of polypropylene can be used.

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

Day 1:

1.	Add 100 µl serum into the respective wells of the INCPLATE .
2.	Add 200 µl sample buffer (SAMPLEBUF) to each sample in the INCPLATE . Close the INCPLATE with the cap mat and mix thoroughly for 1 minute on a horizontal shaker.
3.	Add 25 µl standard (STD)/ control (CTRL) in the wells of the COPLATE .
4.	Pipette 25 µl prepared sample from the INCPLATE into the COPLATE .
5.	Cover the COPLATE tightly with foil and store at 2-8 °C for 24 h (4 °C aliquot).
6.	Close the INCPLATE tightly with the cap mat and incubate at 37 °C for 24 h (37 °C aliquot).

Example of plate layout INCPLATE (37 °C), optimised for multichannel pipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a1	a9	a17	a21	a29	a37						
B	a2	a10	a18	a22	a30	a38						
C	a3	a11	a19	a23	a31	a39						
D	a4	a12	a20	a24	a32	a40						
E	a5	a13		a25	a33							
F	a6	a14		a26	a34							
G	a7	a15		a27	a35							
H	a8	a16		a28	a36							

Example of plate layout COPLATE (2-8 °C), optimised for multichannel pipette

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1		<i>a1</i>		<i>a9</i>				<i>a21</i>		<i>a29</i>	
B	STD2		<i>a2</i>		<i>a10</i>				<i>a22</i>		<i>a30</i>	
C	STD3		<i>a3</i>		<i>a11</i>				<i>a23</i>		<i>a31</i>	
D	STD4		<i>a4</i>		<i>a12</i>				<i>a24</i>		<i>a32</i>	
E	STD5		<i>a5</i>		<i>a13</i>	<i>a17</i>			<i>a25</i>		<i>a33</i>	<i>a37</i>
F	STD6		<i>a6</i>		<i>a14</i>	<i>a18</i>			<i>a26</i>		<i>a34</i>	<i>a38</i>
G	CTRL1		<i>a7</i>		<i>a15</i>	<i>a19</i>			<i>a27</i>		<i>a35</i>	<i>a39</i>
H	CTRL2		<i>a8</i>		<i>a16</i>	<i>a20</i>			<i>a28</i>		<i>a36</i>	<i>a40</i>

bold = 37 °C aliquots

italic = 4 °C aliquots

Day 2:

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

7.	Pipette 25 µl of the 37 °C aliquots from the INCPLATE into the respective wells of the COPLATE .
8.	Add 250 µl reaction buffer (REABUF) into each well (STD, CTRL, aliquots) of the COPLATE.
9.	Add 50 µl derivatisation reagent into each well (STD, CTRL, aliquots) of the COPLATE. Mix thoroughly on a horizontal shaker . We recommend shaking at 1100 rpm with an orbit of 2 mm to achieve complete mixing.
10.	Incubate the COPLATE for 30 min on a horizontal shaker at room temperature (15-30 °C).

Example of plate layout COPLATE (derivatisation), optimised for multichannel pipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	a1	<i>a1</i>	a9	<i>a9</i>	a17		a21	<i>a21</i>	a29	<i>a29</i>	a37
B	STD2	a2	<i>a2</i>	a10	<i>a10</i>	a18		a22	<i>a22</i>	a30	<i>a30</i>	a38
C	STD3	a3	<i>a3</i>	a11	<i>a11</i>	a19		a23	<i>a23</i>	a31	<i>a31</i>	a39
D	STD4	a4	<i>a4</i>	a12	<i>a12</i>	a20		a24	<i>a24</i>	a32	<i>a32</i>	a40
E	STD5	a5	<i>a5</i>	a13	<i>a13</i>	<i>a17</i>		a25	<i>a25</i>	a33	<i>a33</i>	<i>a37</i>
F	STD6	a6	<i>a6</i>	a14	<i>a14</i>	<i>a18</i>		a26	<i>a26</i>	a34	<i>a34</i>	<i>a38</i>
G	CTRL1	a7	<i>a7</i>	a15	<i>a15</i>	<i>a19</i>		a27	<i>a27</i>	a35	<i>a35</i>	<i>a39</i>
H	CTRL2	a8	<i>a8</i>	a16	<i>a16</i>	<i>a20</i>		a28	<i>a28</i>	a36	<i>a36</i>	<i>a40</i>

bold = 37 °C aliquots

italic = 4 °C aliquots

Test procedure

Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

11.	For the analysis in duplicate take 2 x 50 µl of the derivatised standards/ controls/ aliquots out of the COPLATE and add into the respective wells of the microtiter plates (PLATE).
12.	Add 50 µl histamine antibody (AB) into each well of the microtiter plate.
13.	Cover the strips tightly with foil and incubate for 1 hour at 18-25 °C on a horizontal shaker . We recommend shaking at 500 rpm with an orbit of 2 mm.

14.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
15.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
16.	Incubate for 12-18 min* at 18-25 °C in the dark .
17.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
18.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm 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 405 nm against 620 nm (690 nm) as a reference.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

Example of plate layout PLATE 1, optimised for multichannel pipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	a1	a1	<i>a1</i>	<i>a1</i>	a9	a9	<i>a9</i>	<i>a9</i>	a17	a17
B	STD2	STD2	a2	a2	<i>a2</i>	<i>a2</i>	a10	a10	<i>a10</i>	<i>a10</i>	a18	a18
C	STD3	STD3	a3	a3	<i>a3</i>	<i>a3</i>	a11	a11	<i>a11</i>	<i>a11</i>	a19	a19
D	STD4	STD4	a4	a4	<i>a4</i>	<i>a4</i>	a12	a12	<i>a12</i>	<i>a12</i>	a20	a20
E	STD5	STD5	a5	a5	<i>a5</i>	<i>a5</i>	a13	a13	<i>a13</i>	<i>a13</i>	<i>a17</i>	<i>a17</i>
F	STD6	STD6	a6	a6	<i>a6</i>	<i>a6</i>	a14	a14	<i>a14</i>	<i>a14</i>	<i>a18</i>	<i>a18</i>
G	CTRL1	CTRL1	a7	a7	<i>a7</i>	<i>a7</i>	a15	a15	<i>a15</i>	<i>a15</i>	<i>a19</i>	<i>a19</i>
H	CTRL2	CTRL2	a8	a8	<i>a8</i>	<i>a8</i>	a16	a16	<i>a16</i>	<i>a16</i>	<i>a20</i>	<i>a20</i>

Example of plate layout PLATE 2, optimised for multichannel pipette:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	a21	a21	<i>a21</i>	<i>a21</i>	a29	a29	<i>a29</i>	<i>a29</i>	a37	a37
B	STD2	STD2	a22	a22	<i>a22</i>	<i>a22</i>	a30	a30	<i>a30</i>	<i>a30</i>	a38	a38
C	STD3	STD3	a23	a23	<i>a23</i>	<i>a23</i>	a31	a31	<i>a31</i>	<i>a31</i>	a39	a39
D	STD4	STD4	a24	a24	<i>a24</i>	<i>a24</i>	a32	a32	<i>a32</i>	<i>a32</i>	a40	a40
E	STD5	STD5	a25	a25	<i>a25</i>	<i>a25</i>	a33	a33	<i>a33</i>	<i>a33</i>	<i>a37</i>	<i>a37</i>
F	STD6	STD6	a26	a26	<i>a26</i>	<i>a26</i>	a34	a34	<i>a34</i>	<i>a34</i>	<i>a38</i>	<i>a38</i>
G	CTRL1	CTRL1	a27	a27	<i>a27</i>	<i>a27</i>	a35	a35	<i>a35</i>	<i>a35</i>	<i>a39</i>	<i>a39</i>
H	CTRL2	CTRL2	a28	a28	<i>a28</i>	<i>a28</i>	a36	a36	<i>a36</i>	<i>a36</i>	<i>a40</i>	<i>a40</i>

bold = 37 °C aliquots

italic = 4 °C aliquots

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 using 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 4°C aliquot and 37°C aliquot is divided by the concentration of the 4°C aliquot.

$$\text{HERO [\%]} = \frac{c(\text{Histamin})_{4^{\circ}\text{C aliquot}} - c(\text{Histamin})_{37^{\circ}\text{C aliquot}}}{c(\text{Histamin})_{4^{\circ}\text{C aliquot}}} \times 100$$

9. LIMITATIONS

Biotin interference

Samples containing a biotin concentration of ≤ 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 that each laboratory establishes 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, instrument, day and kit lot) in single determinations.

Sample	Mean value 37°C aliquot [%]	Mean value 4°C aliquot [%]	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, instruments, days and kit lots) in duplicate determinations.

Samples from	Mean value 37°C aliquot [%]	Mean value 4°C aliquot [%]	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 sample buffer 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. WARNINGS AND 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. Küfner 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. Küfner 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, Küfner 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.

4. Kellner KH. Automatic Immunoassay For Biogenic Amines. European Patent 2 612 147 B1. March 30, 2016

16. 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