





Gebrauchsanweisung

1-Methylhistamin - ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
1-Methylhistamin (N-Methylhistamin)
in Urin

CE

IVD

REF	MHE00
	96
	2 – 8 °C

 WESAMIN GmbH & Co.KG /
Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von diagnostischen Artikeln mbH
Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67
E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Version 8, Mai 2022

1. Einleitung und Testprinzip

Histamin (Nomenklatur: 2-(4-Imidazolyl)-ethylamin) ist ein Naturstoff, der im menschlichen und tierischen Organismus weit verbreitet ist. Es ist gut wasserlöslich und hat einen basischen Charakter.

Histamin gehört biochemisch zu den biogenen Aminen und wird aus der Aminosäure Histidin gebildet. Diese Decarboxylierung erfolgt mit Hilfe des Enzyms Histidindecarboxylase.

Die Biosynthese des Histamins findet in den Mastzellen, Zellen der Epidermis und der Magenschleimhaut und in den Nervenzellen statt.

Aus Mastzellen und basophilen Granulozyten kann das Histamin explosionsartig freigesetzt werden und zwar bei der Stimulation der Speicherzellen mit dem entsprechenden Allergen. Diese Stimulation erfolgt durch die Bindung des Allergens an die spezifischen IgE-Antikörper auf der Oberfläche der Zielzellen.

Wobei dieser Effekt noch nicht bei dem ersten Kontakt mit einem Allergen auftritt. Zunächst erfolgt durch den Erstkontakt die Bildung von Plasmazellen, die spezifische IgE-Antikörper produzieren und freisetzen. Diese binden an die entsprechenden Rezeptoren der Mastzellen (Sensibilisierung). Erst beim nächsten Allergen-Kontakt können die Allergene direkt an die IgE-Antikörper der Mastzellen binden und damit wird die spontane Histaminausschüttung aus der Granula der Mastzellen ausgelöst (allergische Sofortreaktion).

Zirkulierendes Histamin wird durch die Histamin-N-Methyltransferase schnell zu 1-Methylhistamin (N-Methylhistamin) umgesetzt. Die Ausscheidung erfolgt im Urin und dadurch ist die Bestimmung dieses Metaboliten im Urin von Interesse.

Der 1-Methylhistamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem 1-Methylhistamin in humanen Urinproben. Nach der Probenvorbereitung in der Preparation-Platte erfolgt die Derivatisierung in der ELISA-Platte. Dabei wird 1-Methylhistamin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-1-Methylhistamin umgewandelt.

Der 1-Methylhistamin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.

- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Eine Gefahrstoffkennzeichnung der Kitkomponenten ist entsprechend der CLP-Verordnung Nr. 1272/2008 nicht erforderlich. Ausführliche Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testbestecks

4.1	Mikrotiterstreifen Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit N-Acyl-1-Methylhistamin	STRIPS	12 Stück
4.2	Standards 1 - 6 Je 4 ml, gebrauchsfertig	CAL 1 - 6	6 Fläschchen
4.3	Kontrolle 1 & 2 Je 4 ml, gebrauchsfertig; Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat	CON 1 & 2	2 Fläschchen
4.4	Acylierungspuffer 32 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt	ACYL-BUFF	1 Fläschchen
4.5	Acylierungsreagenz 3 ml, lyophilisiert, mit Solvent lösen	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.6	Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-1-Methylhistamin	AS	1 Fläschchen
4.7	Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	1 Fläschchen
4.8	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH	1 Fläschchen
4.9	Substrat 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
4.10	Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.11	Preparation-Platte für die Probenvorbereitung	PRE-PLATE	2 Stück
4.12	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 32 ml Acylierungspuffer lösen	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.13	Solvent 11 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt	SOLVENT	1 Fläschchen

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100 und 300 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Zentrifuge

5. Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Urin

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden. Zur Gewinnung des Sammelurins wird der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6 M Salzsäure (Warnung: Gefahrenhinweise beachten) als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

Urine vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Zur Rekonstitution des lyophilisierten Ausgleichsreagenzes den Inhalt des Acylierungspuffers vollständig in die Flasche des Ausgleichsreagenzes überführen. Das Ausgleichsreagenz kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler bis zum vollständigen Lösen mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Waschpuffer **WASH**

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG**

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent lösen und mindestens 5 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mindestens 3 Stunden stabil. Im Kit sind 3 Flaschen Acylierungs-Reagenz enthalten, sodass der ELISA mehrmals teilbar ist. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das rekonstituierte Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die für die Probenvorbereitung verwendeten Vertiefungen der Preparation-Platte markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. **20 µl Standard 1 - 6, 20 µl Kontrolle 1 & 2, 20 µl Urin** in die entsprechenden Vertiefungen der Preparation-Platte pipettieren.
2. **300 µl Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

20 µl werden im ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

1. **20 µl vorverdünnte Standards, Kontrollen und Proben** aus der Preparation-Platte in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. **50 µl Acylierungsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit Punkt 3. fortfahren.
3. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. **50 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren. Bitte **Multipette oder Ähnliches** (keine Einkanal- oder Mehrkanalpipetten) verwenden.
5. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
7. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt ohne Schütteln inkubieren.
10. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung und Beurteilung

Standard	1	2	3	4	5	6
ng / ml	0	10	30	100	300	1000
nmol / l	0	80	240	800	2400	8000

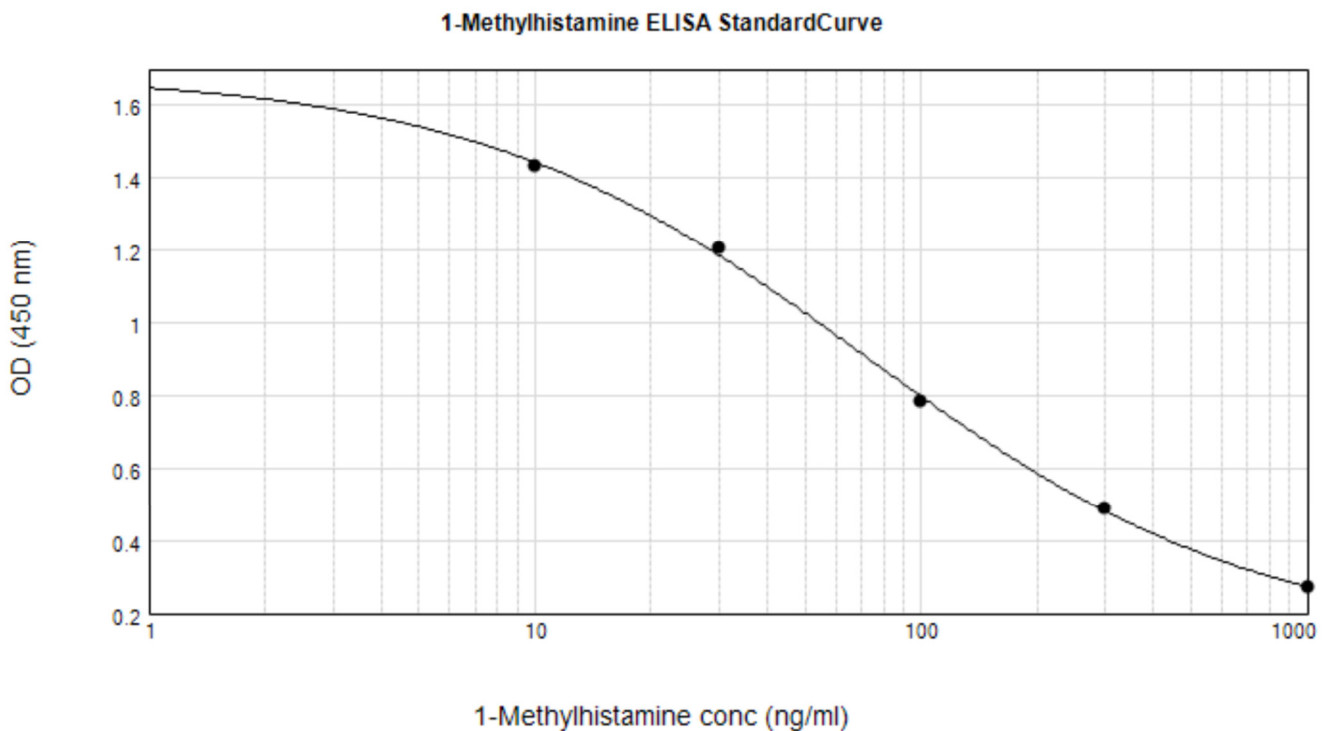
Umrechnung: 1-Methylhistamin: 1 ng / ml = 8,0 nmol / l

Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen und Urinproben können direkt aus der Standardkurve in ng / ml abgelesen werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

9. Testcharakteristika

9.1 Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
Urin, 24 h	< 250 µg/Tag
Urin, spontan	30 - 200 µg / g Kreatinin

9.2 Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	3,0	OD _{Cal1} - 2xSD

9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
1-Methylhistamin	100
Histamin	< 0,7
3-Methylhistamin	< 0,07
1-Methyl-4-imidazol-essigsäure	< 0,0025
Imidazol-4-essigsäure	< 0,007
L-Histidin	< 0,0025

9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	51 - 324	97	92 - 100

9.5 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit dest. Wasser)

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	33 - 339	1 : 10	102	97 - 107

9.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk
Urin	52 – 190	6,7 – 6,9 %

9.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	LC/MS	$Y = 0,93 \times LC/MS - 9,1$; $R = 0,993$; $N = 32$

9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Methodenvergleich (9.7) festgestellt.

9.9 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des 1-Methylhistamin Elisas ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit destilliertem Wasser verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

9.10 Interferenzen

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

10. Literatur


- Nettis, E.; Colanardi, A.; Ferrannini, A. (2005):
Antihistamines as Important Tools for Regulating Inflammation
Curr. Med. Chem. – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents, 4, 81-89
- Matsumoto, J.; Matsuda, H. (2002):
Mast-cell-dependent histamine release after praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: implications for chemotherapy-related adverse effects
Parasitol Res 88: 888–893
- Belic, A.; Grabnar, I.; Karba, R.; et al. (1999):
Interdependence of histamine and methylhistamine kinetics: modelling and simulation approach
Computers in Biology and Medicine 29, 361-375
- Martens-Lobenhoffer, J.; Neumann, H. (1999):
Determination of 1-methylhistamine and 1-methylimidazoleacetic acid in human urine as a tool for the diagnosis of mastocytosis
Journal of Chromatography B, 721, 135–140
- Prell, G.; Green, J.; Elkashef, A. (1996):
The relationship between urine excretion and biogenic amines and their metabolites in cerebrospinal fluid of schizophrenic patients
Schizophrenia Research 19, 171-176
- Eberlein-König, B.; Ullmann, S.; Thomas, P.; et al. (1995):
Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization
Clinical and Experimental Allergy, Volume 25, pages 704-712
- Koller, D.; Rosenkranz, A.; Pirker, C.; et al. (1992):
Assessment of histamine release from basophils in whole blood by benzylpenicilloyl poly-L-lysine in penicillin-sensitized patients
Allergy: 47: 459-462.
- Marquardt, D.; Wasserman, S. (1982):
Mast Cells in Allergic Diseases and Mastocytosis
West J Med; 137:195-212
- Butchers, P.; Vardey, C.; Skidmore, I.; et al. (1980):
Histamine-Containing Cells from Bronchial Lavage of Macaque Monkeys. Time Course and Inhibition of Anaphylactic Histamine Release
Int. Archs Allergy appl. Immun. 62: 205-212

11. Verwendete Symbole


 In-Vitro-Diagnostikum

 Inhalt


 Chargenbezeichnung


 Hersteller


 Bestellnummer

 CE markiert

 Verwendbar bis

 Temperaturbegrenzung

 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

 Gebrauchsanweisung beachten

Die Symbole der Komponenten des Kits sind im Kapitel 4 **Inhalt des Testbestecks** beschrieben.

Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standard	Kontrolle	Urin
Standard 1 - 6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Urin	µl			20
Ausgleichsreag.	µl	300	300	300

Platte 5 Minuten schütteln

20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Standard	µl	20		
Kontrolle	µl		20	
Probe	µl			20
Acyl. Reagenz	µl	50	50	50

Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Antiserum	µl	50	50	50
------------------	----	----	----	----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
-----------------	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln

20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100
--------------------	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm