



Gebrauchsanweisung

Histamin - ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung
von Histamin in humanem
Urin

Heparin-Plasma, EDTA-Plasma,
Heparin-Vollblut (Gesamthistamin)
Stuhl

CE

Teil I Seite 3 -13 CE-IVD

IVD

und für Forschungszwecke in Zellkulturproben

Teil II Seite 14 - 19 nur für Forschungszwecke

RUO

REF HIS00

Σ 96

± 2 \uparrow $+8$
°C 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 16, Nov. 2023

I. Gebrauchsanweisung für die quantitative Bestimmung von Histamin in humanem Urin, Heparin-Plasma, EDTA-Plasma, Heparin-Vollblut (Gesamthistamin) und Stuhl für die In vitro Diagnostik

1. Einleitung und Testprinzip

Histamin gehört in die Gruppe der biogenen Amine und wird aus der Aminosäure Histidin gebildet. Histamin löst im menschlichen Organismus physiologische und pathophysiologische Reaktionen aus. Es ist beteiligt an der Abwehr körperfremder Stoffe und seine pathologischen Reaktionen führen zu Symptomaten wie Allergie und Asthma.

Der Histamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Histamin in humanem Urin, Heparin- und EDTA-Plasma, Heparin-Vollblut (Gesamthistamin) und Stuhl. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird Histamin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylhistamin umgewandelt.

Der Histamin-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 Waschschritt 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

- 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 Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, 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 Testkits 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 Testkits

4.1	Mikrotiterstreifen Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit N-Acylhstamin	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	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 6 ml Acylierungspuffer lösen	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.5	Acylierungspuffer 14 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt	ACYL-BUFF	1 Fläschchen
4.6	Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acylhistamin	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	Acylierungs-Platte für die Probenvorbereitung	ACYL-PLATE	2 Stück
4.12	Acylierungs-Reagenz 3 ml, lyophilisiert, mit Solvent lösen	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.13	Solvent 11 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt	SOLVENT	1 Fläschchen
4.14	Releasepuffer 21 ml, gebrauchsfertig	RELEASE-BUFF	2 Fläschchen
4.15	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL	2 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 50, 100 und 500 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Zentrifuge
- Heizblock bzw. Wasserbad
- 1,5ml Reaktionsgefäße
- Stuhlentnahmeröhrchen

5. Probengewinnung und -lagerung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma

Für den Test kann EDTA-Plasma oder Heparin-Plasma eingesetzt werden.

Auf Grund der niedrigen Konzentrationen im EDTA-Plasma wird die Bestimmung im Heparin-Plasma empfohlen.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert 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. Die Lagerung muss während der Sammlung im Dunkeln erfolgen. 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.

Gesamthistamin

Für den Test sollte Heparin-Vollblut eingesetzt werden. Das Vollblut wird in einem Röhrchen mit Heparin als Antikoagulanzen (z.B. LH-Monovette™) gesammelt und anschließend vorsichtig gemischt.

Stabilität von Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden:

- Mindestens 3 Tage bei 20 - 25 °C (nicht gekühlt); Direktes Sonnenlicht vermeiden
- Mindestens 1 Woche bei -20 °C.

Releasepuffer auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

1. **20 µl Heparin-Vollblut** in einem Reaktionsgefäß vorlegen.
2. **500 µl Releasepuffer** hinzupipettieren und Reaktionsgefäß verschließen. Mischen.
3. 10 Minuten bei ca. 90 °C in einem Heizblock bzw. Wasserbad inkubieren.
4. 10 Minuten in einem kalten Wasserbad (Raumtemperatur) inkubieren.
5. 10 Minuten zentrifugieren: 2.000 g, Raumtemperatur.

50 µl des Überstandes werden zur 6.2 Probenvorbereitung (Acylierung) eingesetzt.

Stuhl

Für die Probennahme müssen die Stuhlentnahmeröhrchen (Kat# HIS-2-05) entsprechend der Gebrauchsanweisung verwendet werden. Diese Stuhlentnahmeröhrchen müssen separat bestellt werden.

Im Labor:

Vor dem Test die Stuhlentnahmeröhrchen über Kopf schwenken oder vortexen.

Vor dem Pipettieren wenige Minuten absetzen lassen oder alternativ 5 Minuten zentrifugieren bei 2.000 g, Raumtemperatur.

Zur Probenentnahme den Klebestreifen entfernen und die blaue Hülse abdrehen.

50 µl des Überstandes werden zur 6.2 Probenvorbereitung (Acylierung) eingesetzt.

Die extrahierten Proben können bis zu 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Für eine längere Lagerung müssen die extrahierten Proben bei ≤ -20 °C eingefroren werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Zur Rekonstitution des lyophilisierten Ausgleichsreagenzes 6 ml des Acylierungspuffers in die Flasche des Ausgleichsreagenzes pipettieren. 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 Acylierungs-Platte markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. **50 µl Standard 1 - 6, 50 µl Kontrolle 1 & 2**
50 µl extrahiertes Heparin-Vollblut für Gesamthistamin (1:26 in Releasepuffer verdünnt, erhitzt: s. 5. Probengewinnung Gesamthistamin)
50 µl extrahierte Stuhlprobe
10 µl Urin
50 µl EDTA-Plasma, 50 µl Heparin-Plasma
in die entsprechenden Vertiefungen der Acylierungs-Platte pipettieren.
2. **50 µl dest. Wasser** in alle Vertiefungen **mit Urin** pipettieren.
3. **50 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen **mit Standards, Kontrollen, extrahiertes Heparin-Vollblut, Stuhl und Urin** pipettieren.
Nicht in Vertiefungen mit EDTA-Plasma und Heparin-Plasmen pipettieren.
4. **50 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen **mit EDTA- und Heparin-Plasmen** pipettieren.
5. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
6. **50 µl gelöstes Acylierungs-Reagenz** in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit Punkt 7. fortfahren.
7. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
8. **50 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

50 µl werden im ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

1. **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** aus der Acylierungs-Platte in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. Platte mit Haftklebefolie abdecken.
Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
3. 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.
4. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt ohne Schütteln inkubieren.
9. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
10. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung

Standard	1	2	3	4	5	6
ng / ml	0	0,3	1	3	10	30
nmol / l	0	2,7	9,0	27	90	270

Umrechnung: Histamin: 1 ng / ml = 9,0 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).

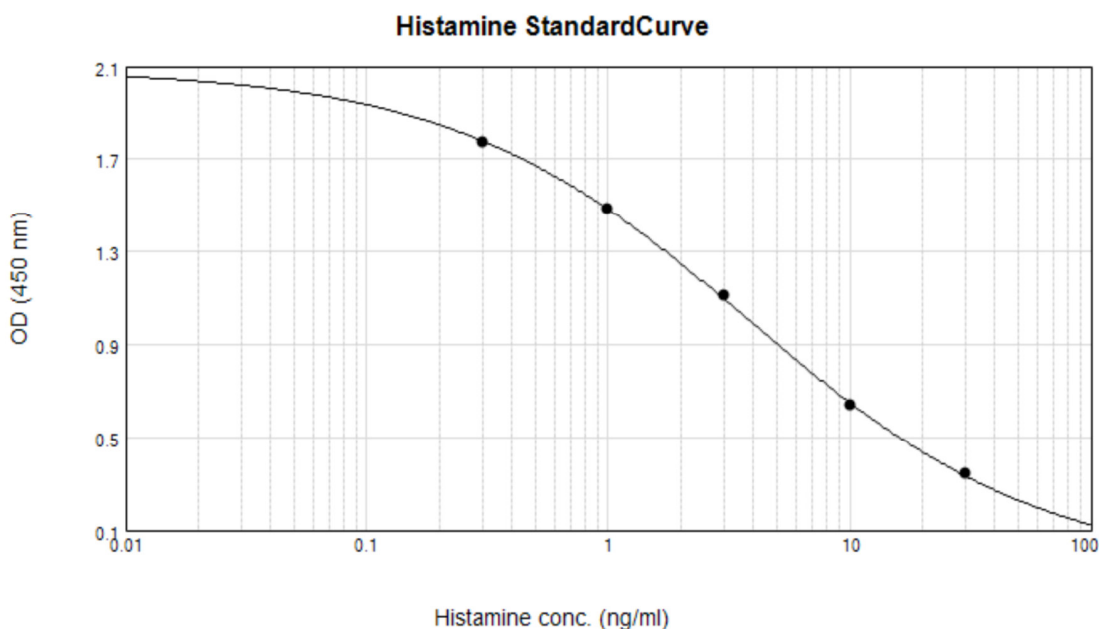
Die Konzentrationen der Kontrollen, EDTA-Plasmen und Heparin-Plasmen können direkt aus der Standardkurve in ng / ml abgelesen werden.

Die abgelesenen Werte für die Urinproben müssen mit dem Faktor 5 multipliziert werden.

Die abgelesenen Werte für die Heparin-Vollblutproben (Gesamthistamin) müssen mit dem Faktor 26 multipliziert werden.

Die abgelesenen Werte für die Stuhlproben müssen mit dem Faktor 150 multipliziert werden. Diese werden als ng/g angegeben.

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
EDTA-Plasma	< 1 ng/ml
Heparin-Plasma	< 4,5 ng/ml
Gesamthistamin	10 - 100 ng/ml
Urin	< 45 µg/Tag
Stuhl	< 600 ng/g

9.2 analytische Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
EDTA-Plasma, Heparin-Plasma	0,09 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
Gesamthistamin	2,3 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
Urin	0,45 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
Stuhl	13,4 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

9.3 analytische Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Histamin	100
1-Methylhistamin	< 0,05
3-Methylhistamin	0,1
1-Methyl-4-imidazol-essigsäure	< 0,0002
Imidazol-4-essigsäure	< 0,0005
L-Histidin	< 0,0002

9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,78 – 12,6	98	96 - 102
Heparin-Plasma	1,8 – 13,0	105	94 - 111
Gesamthistamin	57 – 157	104	99 - 111
Urin	14 – 109	101	93 - 107
Stuhl	206 – 1773	103	92 - 109

9.5 Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	3,1 – 14,2	1 : 5 mit Ausgleichsreag.	107	102 - 110
Heparin-Plasma	3,2 – 16,0	1 : 5 mit Ausgleichsreag.	96	89 - 101
Gesamthistamin	27 – 389	1 : 15 mit dest. Wasser	100	96 - 103
Urin	6,8 - 78	1 : 10 mit dest. Wasser	94	87 - 102
Stuhl	210 – 2052	1 : 10 mit dest. Wasser	97	88 - 102

9.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk
EDTA-Plasma	1,7 – 9,1	10,5 – 7,0 %
Heparin-Plasma	1,6 – 9,9	11,1 – 5,5 %
Gesamthistamin	54 – 158	9,8 – 8,4 %
Urin	13 – 64	8,9 – 9,4 %
Stuhl	179 – 1096	10,6 – 8,7 %

9.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
EDTA-Plasma	LC/MS	$Y = 0,87 \times \text{LC/MS} - 0,06$; $R = 0,979$; $N = 13$
Heparin-Plasma	LC/MS	$Y = 1,01 \times \text{LC/MS} + 0,089$; $R = 0,973$; $N = 28$
Gesamthistamin	Elisa A	$Y = 1,11 \times \text{ELISA A} - 4,71$; $R = 0,994$; $N = 21$
Urin	LC/MS	$Y = 1,05 \times \text{LC/MS} + 3,2$; $R = 0,964$; $N = 32$
Stuhl	Elisa A	$Y = 0,87 \times \text{ELISA A} + 63$; $R = 0,961$; $N = 51$

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 Histamin Elisass 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 dem entsprechenden Medium (s. 9.5 Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Zellkulturproben können nur für Forschungszwecke bestimmt werden.

9.10 Interferenzen












Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

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

Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum	 CE	CE markiert
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten
 RUO	Forschungszwecke		

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

II. Gebrauchsanweisung für die quantitative Bestimmung von Histamin in Zellkulturproben Nur für Forschungszwecke

1. Testprinzip

Der Histamin-ELISA-Kit ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay.

Der Histamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Histamin in Zellkulturproben. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird Histamin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylhistamin umgewandelt.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. 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 Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, 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 Testkits 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.

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 Testkits

4.1	Mikrotiterstreifen Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit N-Acylhistamin	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	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 6 ml Acylierungspuffer lösen	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.5	Acylierungspuffer 14 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt	ACYL-BUFF	1 Fläschchen
4.6	Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acylhistamin	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	Acylierungs-Platte für die Probenvorbereitung	ACYL-PLATE	2 Stück
4.12	Acylierungs-Reagenz 3 ml, lyophilisiert, mit Solvent lösen	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.13	Solvent 11 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt	SOLVENT	1 Fläschchen

4.14	Releasepuffer 21 ml, gebrauchsfertig	RELEASE-BUFF	2 Fläschchen
4.15	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL	2 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

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

5. Probengewinnung

Zellkultur

Zellkulturmedien wie DMEM und RPMI können im Test verwendet werden. Weitere Zellkulturmedien sind vom Anwender zu testen.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Zur Rekonstitution des lyophilisierten Ausgleichsreagenzes 6 ml des Acylierungspuffers in die Flasche des Ausgleichsreagenzes pipettieren. 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 (Zellkulturproben)

Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

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

1. **50 µl Standard 1 - 6, 50 µl Kontrolle 1 & 2 und 50 µl Zellkulturprobe** in die entsprechenden Vertiefungen der Acylierungs-Platte pipettieren.
2. **50 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. **50 µl gelöstes Acylierungs-Reagenz** in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit Punkt 5. fortfahren.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. **50 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
7. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

50 µl werden im ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA (Zellkulturproben)

1. **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** aus der Acylierungs-Platte in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. Platte mit Haftklebefolie abdecken.
Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
3. 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.
4. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Waschen: Wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt ohne Schütteln inkubieren.
9. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
10. 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	0,3	1	3	10	30
nmol / l	0	2,7	9,0	27	90	270

Umrechnung: Histamin: 1 ng / ml = 9,0 nmol / l

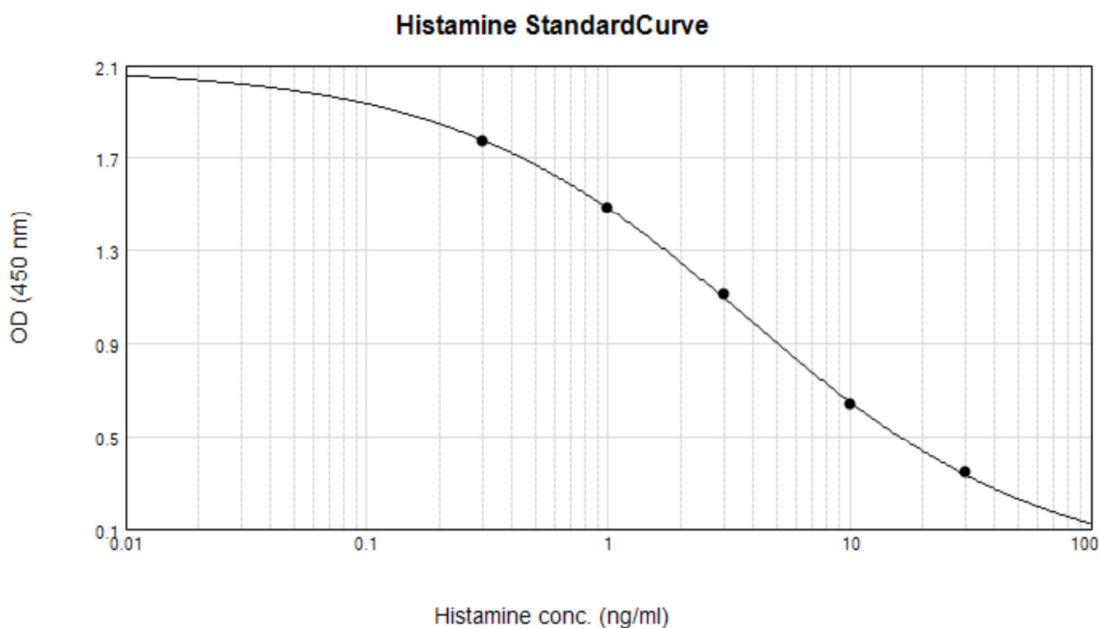
Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

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

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

Die Konzentrationen der Kontrollen sollten innerhalb des im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereichs liegen.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



9. Grenzen der Methode

Ergebnisse für Zellkulturproben sind nur für Forschungszwecke geeignet.

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.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Angaben in µl	Standard	Kontrolle	Heparin-Vollblut	Stuhl	Urin	EDTA-Heparin-Plasma
Standard 1 - 6	50					
Kontrolle 1 & 2		50				
Gesamthistamin Heparin-Vollblut (1:26, erhitzt, s. 5.)			50			
Stuhl				50		
Urin					10	
EDTA- Plasma Heparin- Plasma						50
Dest. Wasser					50	
Ausgleichsreag.	50	50	50	50	50	
Acylierungspuffer						50

Platte 10 Sekunden schütteln

Acylierungsreag.	50	50	50	50	50	50
-------------------------	----	----	----	----	----	----

Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Antiserum	50	50	50	50	50	50
------------------	----	----	----	----	----	----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

50 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

	Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard µl	50		
Acyl. Kontrolle µl		50	
Acyl. Probe µl			50

Platte mit Haftklebefolie abkleben
1 Stunde 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