



Arbeitsanleitung

Histamin - ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Histamin
in EDTA-Plasma, Heparin-Plasma,
Heparin-Vollblut (Gesamthistamin) und Urin
und für Forschungszwecke in Zellkulturproben

CE

IVD

REF	HIS00
Σ	96
$+2$ \uparrow $+8$ $^{\circ}\text{C}$	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 11, Nov 2020

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 Symptomen wie Allergie und Asthma.

Der Histamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Histamin in humanen EDTA- und Heparin-Plasmen, Heparin-Vollblut (Gesamthistamin), Urinproben und für Forschungszwecke in Zellkulturproben. 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

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, 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 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 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.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testbestecks* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.




- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist 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	STRIPS		12 Stück
	Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Histamin			
4.2	Standards 1 - 6	CAL 1 - 6		6 Fläschchen
	Je 4 ml, gebrauchsfertig			
4.3	Kontrolle 1 & 2	CON 1 & 2		2 Fläschchen
	Je 4 ml, gebrauchsfertig; Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat			
4.4	Acylierungspuffer	ACYL-BUFF		1 Fläschchen
	6 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt			
4.5	Acylierungsreagenz	ACYL-REAG		3 Fläschchen
	1,5 ml, lyophilisiert, mit Solvent auflösen			
4.6	Solvent	SOLVENT	 Gefahr	 Achtung
	5,5 ml, gebrauchsfertig, enthält Aceton			
4.7	Antiserum	AS		1 Fläschchen
	5,5 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acylhistamin			
4.8	Enzymkonjugat	CONJ		 Achtung
	12 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase			
4.9	Waschpuffer	WASH		1 Fläschchen
	20 ml, Konzentrat (50x)			
4.10	Substrat	SUB		1 Fläschchen
	12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig			

4.11	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.12	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	2 Stück
4.13	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit dest. Wasser lösen Volumen: siehe Fläschchenetikett	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.14	Releasepuffer 21 ml, gebrauchsfertig	RELEASE-BUFF	2 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 50 und 100 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Zentrifuge
- Heizblock bzw. Wasserbad

5. Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

5.1 EDTA-Plasma und Heparin-Plasma

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

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.

5.2 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 als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. 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.

Urinproben müssen vor der Verwendung 1:15 mit Wasser verdünnt werden.

5.3 Zellkultur

Zellkulturmedien wie DMEM und RPMI können im Test verwendet werden.

Weitere Zellkulturmedien sind vom Anwender zu testen.

5.4 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.

Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 20 - 25 °C gelagert werden. Die Proben dürfen nicht bei 2 – 8 °C gelagert werden, da sonst die Leukozyten verklumpen könnten. Direktes Sonnenlicht vermeiden.

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

1. **20 µl Heparin-Vollblut** in einem Reaktionsgefäß vorlegen.
2. **480 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.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser lösen (Volumen: siehe Fläschchenetikett), kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler 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 des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 1,5 ml Solvent lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung (Acylierung)

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. **50 µl Standard 1 - 6, 50 µl Kontrolle 1 & 2, 50 µl EDTA-Plasma, 20 µl Heparin-Plasma, 50 µl Urin (1:15 in Wasser verdünnt) 50 µl Heparin-Vollblut für Gesamthistamin (1:25 in Releasepuffer verdünnt, erhitzt: s. Probengewinnung 5.4 Gesamthistamin) 50 µl Zellkulturprobe**
in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. **50 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. **50 µl dest. Wasser** in alle Vertiefungen **mit EDTA- und Heparin-Plasmen** pipettieren.
4. **50 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen **mit Standards, Kontrollen, Urin, Heparin-Vollblut - und Zellkulturproben** pipettieren.
30 µl gelöstes Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen **mit Heparin-Plasmen** pipettieren.
Nicht in Vertiefungen mit EDTA-Plasmaproben pipettieren.
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
5. Bitte beachten: Solvent reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen. Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche besitzen.
Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das gelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.
10 µl gelöstes Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit Punkt 6. fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
6. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte **offen** schütteln.
7. **50 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte **offen** schütteln.
50 µl werden im ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

1. **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. 1 Stunde 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. 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, kurz mischen.
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	0,2	0,6	2	6	25
nmol / l	0	1,8	5,4	18	54	225

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).

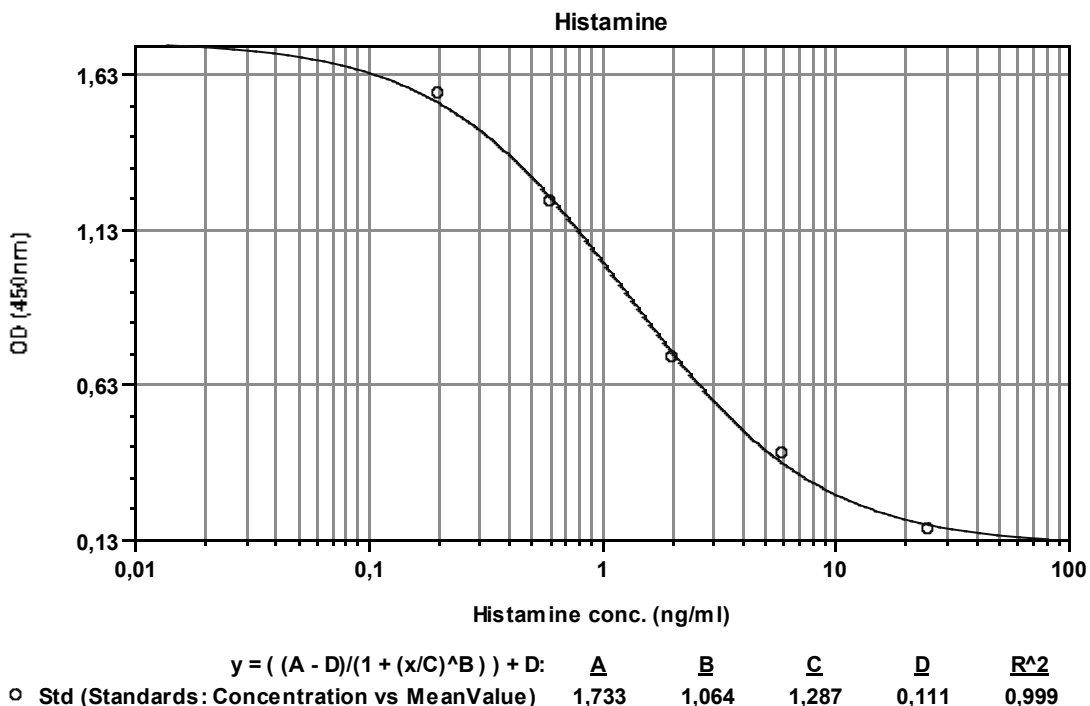
Die Konzentrationen der Kontrollen, EDTA-Plasma- und Zellkulturproben können direkt aus der Standardkurve in ng / ml abgelesen werden.

Die abgelesenen Werte für die Heparin-Plasmaproben müssen mit dem Faktor 2,5 multipliziert werden.

Die abgelesenen Werte für die Urinproben müssen mit dem Faktor 15 multipliziert werden.

Die abgelesenen Werte für die Heparin-Vollblutproben (Gesamthistamin) müssen mit dem Faktor 25 multipliziert 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
EDTA-Plasma	< 1 ng/ml
Heparin-Plasma	< 4,5 ng/ml
Gesamthistamin	10 - 100 ng/ml
Urin	< 45 µg/Tag

9.2 Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
EDTA-Plasma, Zellkulturprobe	0,06 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
Heparin-Plasma	0,15 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
Gesamthistamin	1,5 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
Urin	0,9 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Histamin	100
1-Methylhistamin	0,054
3-Methylhistamin	0,13
1-Methyl-4-imidazol-essigsäure	< 0,0001
Imidazol-4-essigsäure	< 0,0002
L-Histidin	< 0,0001

9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,6 – 13,4	101	93 - 111
Heparin-Plasma	0,8 – 36,0	104	87 - 112
Gesamthistamin	40 – 145	101	96 - 106
Urin	6,1 – 140,6	98	94 - 103
Zellkultur	1,0 – 12,9	104	91 - 121

9.5 Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,5 – 10,0	1 : 20 mit Ausgleichsreag.	106	96 - 111
Heparin-Plasma	0,9 – 13,7	1 : 15 mit Ausgleichsreag.	102	93 - 109
Gesamthistamin	22 – 148	1 : 7 mit dest. Wasser	103	96 - 106
Urin	7 - 142	1 : 20 mit dest. Wasser	96	81 - 102
Zellkultur	1,1 – 10,3	1 : 10 mit dest. Wasser	106	99 - 111

9.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
EDTA-Plasma	1,2 – 8,7	6,1 - 6,5 %	1,1 – 3,3	6,2 – 7,3 %
Heparin-Plasma	2,5 – 11,8	6,3 – 5,0 %	2,1 – 10,8	8,9 – 4,4 %
Gesamthistamin	36 – 102	9,3 – 6,8 %	36,4 – 128	11,2 – 6,3 %
Urin	24,1 – 89,6	6,6 – 5,7 %	15,7 – 43,7	7,2 – 11,3 %
Zellkultur	1,5 – 5,1	6,3 – 8,6 %	1,3 – 4,1	10,5 – 6,5 %

9.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
EDTA-Plasma	LC/MS	$Y = 1,22 \times \text{LC/MS} - 0,33; R = 0,950; N = 24$
EDTA-Plasma	Elisa A	$Y = 0,96 \times \text{ELISA A} + 0,19; R = 0,893; N = 43$
EDTA-Plasma	Elisa B	$Y = 1,22 \times \text{ELISA B} - 0,89; R = 0,936; N = 41$
EDTA-Plasma	Elisa C	$Y = 0,65 \times \text{ELISA C} - 0,01; R = 0,920; N = 45$
Heparin-Plasma	LC/MS	$Y = 1,03 \times \text{LC/MS} - 0,22; R = 0,987; N = 16$
Gesamthistamin	LC/MS	$Y = 1,13 \times \text{LC/MS} + 0,65; R = 0,993; N = 10$
Urin	LC/MS	$Y = 0,98 \times \text{LC/MS} + 1,7; R = 0,978; N = 32$
Urin	Elisa A	$Y = 1,06 \times \text{ELISA A} - 2,2; R = 0,965; N = 56$
Urin	Elisa B	$Y = 1,16 \times \text{ELISA B} - 2,1; R = 0,936; N = 22$
Urin	Elisa C	$Y = 0,88 \times \text{ELISA C} + 6,7; R = 0,944; N = 20$

9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit den Referenzbereichen (9.1) und den Methodenvergleichen (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.











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

11. Verwendete Symbole

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

Pipettierschema Probenvorbereitung

Angaben in μl	Standard	Kontrolle	EDTA-Plasma	Heparin-Plasma	Urin (1:15 verd.)	Heparin-Vollblut	Zellkultur
Standard 1 - 6	50						
Kontrolle 1 & 2		50					
EDTA-Plasma			50				
Heparin-Plasma				20			
Urin (1:15 verd.)					50		
Gesamthistamin Heparin-Vollblut (1:25, erhitzt, s. 5.4)						50	
Zellkultur							50
Acylierungspuffer	50	50	50	50	50	50	50
Dest. Wasser			50	50			
Ausgleichsreag.	50	50		30	50	50	50

Platte 10 Sekunden schütteln

Acylierungsreag.	10	10	10	10	10	10	10
-------------------------	----	----	----	----	----	----	----

Sofort 15 Minuten bei Raumtemperatur **offen** schütteln

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

30 Minuten bei Raumtemperatur **offen** schütteln

50 μl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

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

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 \pm 5 Minuten bei Raumtemperatur **abgedeckt (Box)**, ohne schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm