

## Arbeitsanleitung / Manual

*Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /  
For professional use only*

# Histamin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Histamin  
in EDTA-Plasma und Urin*

# Histamine ELISA

*For the in vitro determination of histamine  
in EDTA plasma and urine*

Gültig ab / Valid from 2025-01-21

**REF** K 8212



**IVD** **CE**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

## **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

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von Histamin in EDTA-Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

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

Nach Stimulation und Freisetzung bindet es an die vier Rezeptoren H1R, H2R, H3R und H4R der Zielzellen in diversen Geweben und führt unter anderem zur Kontraktion der glatten Muskelzellen, Vasodilatation, erhöhter vaskulärer Permeabilität, erhöhter Mucus-Sekretion, Tachykardie sowie zu Änderungen des Blutdrucks und zu Arrhythmien.

Histamin ist auch einer der Hauptmediatoren bei einer anaphylaktischen Reaktion im Menschen.

Von klinischem Interesse ist außerdem die Quantifizierung der Histamin-Freisetzung aus basophilen Leukozyten bei Allergien.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8212	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 8212	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,3; 0,6; 1,2; 5; 25 ng/ml)	6 x 2 ml
K 8212	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml
K 8212	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8212	AB	Histamin-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
K 8212	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 70 ml

K 8212	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 vial
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2-8 °C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Zum Rekonstituieren die auf dem Etikett angegebene Menge an **DMSO** zugeben und mit dem Vortex-Mixer mehrere Sekunden mischen, **15 min** stehen lassen und zwischendurch vortexen. Es muss vollständig gelöst sein. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift 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

### EDTA-Plasma

- Blut in gekühlte EDTA-Röhrchen abnehmen, durch mehrmaliges Schwenken durchmischen und sofort auf Eis kühlen. Innerhalb von 20 min nach der Blutabnahme bei 900 g 10 min abzentrifugieren.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Die Plasmaproben werden **unverdünnt** verwendet

### Urin

- Als Probe eignet sich Spontanurin. Auch 24 h-Sammelurin ist geeignet: Der gesamte Urin, der während 24 h ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10-15 ml 6 M HCl enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht vermeiden. Für die Messung wird das Gesamtvolumen bestimmt und ein Aliquot entnommen.
- Urinproben werden für die Derivatisierung **1:51 vorverdünnt** (siehe Pipettierschema Derivatisierung).
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

### Lagerung der Proben

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma kann gekühlt bei 2-8 °C bis zu 6 Stunden gelagert werden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.

Spontanurin kann bei 2-8° C bis zu 6 h gelagert werden. Angesäuerte Urinproben sind bei 2-8 °C bis zu 72 h haltbar. Zur längeren Lagerung müssen die Urinproben bei -20 °C aufbewahrt werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Histamin aus EDTA-Plasma oder Urin. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Histamins versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen Histamin-Antikörper in einer mit Histamin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

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

### *Pipettierschema Derivatisierung*

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

**EDTA-Plasmaproben** werden **unverdünnt** im Test eingesetzt.

**Urinproben** werden im **Faktor 1:51** mit Reaktionspuffer wie folgt verdünnt:  
**20 µl** Urinprobe + **1000 µl** Reaktionspuffer (REABUF).

Die Derivatisierung der Standards und Kontrollen sowie der Plasmaproben und verdünnten Urinproben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt.

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

1.	<b>75 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ Plasmaprobe</b> bzw. <b>verdünnte Urinprobe</b> in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	<b>250 µl Reaktionspuffer</b> (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren.
3.	<b>75 µl Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen.
4.	<b>1 Stunde</b> auf einem <b>Horizontalschüttler</b> bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.

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

### *Pipettierschema Testdurchführung*

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

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.

5.	<b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
6.	<b>50 µl Histamin-Antikörper</b> (AB) in jede Vertiefung pipettieren.



7.	Platte mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15-30°C) <b>unter Schütteln</b> inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	<b>12-18 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
11.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
12.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenpezifische 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 60 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.

#### EDTA-Plasma

Es wird **kein Faktor** benötigt.

#### Urin

Die ermittelten Ergebnisse für die Urinproben werden mit dem **Verdünnungsfaktor 51** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten (ng/ml = µg/l).

Berechnung der 24 h-Ausscheidung:  $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Umrechnungsfaktor:  $\text{Histamin} [\text{ng}/\text{ml}] \times 8,997 = \text{Histamin} [\text{nmol}/\text{l}]$

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Reaktionspuffer verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*analytische Sensitivität* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 44$  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 Plasma-Proben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n = 36$ ) wurde ein Mittelwert von 0,67 ng/ml ermittelt, bei einer Standardabweichung (SD) von 0,18 ng/ml. Aus Mittelwert + 2 x SD ergibt sich folgender Normbereich:

**EDTA-Plasma:** < 1 ng/ml

Für Urin wurde in einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n = 35$ ) ein Mittelwert von 18,5  $\mu$ g/g Kreatinin ermittelt, bei einer Standardabweichung von 10,6. Aus Mittelwert + 2 x SD ergibt sich folgender Normbereich:

**Urin:** < 40  $\mu$ g Histamin / g Kreatinin

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **EDTA-Plasma**

Intra-Assay (n = 6)

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	1,36	8.9
2	3,06	6.2

Inter-Assay (n=6)

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	0,84	10,0
2	0,54	10,1

#### **Urin**

Intra-Assay (n = 6)

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	10,10	10,5
2	16,02	8,7

Inter-Assay (n = 6)

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	8,49	12,1
2	12,80	8,1

### *Spike-Wiederfindung*

Zwei Proben wurden jeweils mit unterschiedlichen Histamin-Mengen versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug bei Plasma 105,4 %, bei Urin 98,9 % (n = 2).

**EDTA-Plasma**

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
0,96	3	3,96	4,46	112,6
	5	5,96	6,19	103,9
1,01	3	4,01	3,90	97,3
	5	6,01	6,46	107,6

**Urin**

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
10,10	15	25,10	27,51	109,6
	30	40,10	39,88	99,5
16,03	15	31,03	28,02	90,3
	30	46,03	44,28	96,2

*Wiederfindung in der Verdünnung*

Zwei mit Histamin gespikete Proben wurden jeweils mit Reaktionspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug für EDTA-Plasma 102,3 %, für Urin 102,4% (n = 2).

**EDTA-Plasma**

Probe [ng/ml]	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
6,19	1:2	3,09	3,16	102,3
	1:4	1,55	1,70	109,7
6,46	1:2	3,23	2,96	91,6
	1:4	1,62	1,83	113,0

**Urin**

Probe [ng/ml]	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
39,88	1:2	19,94	18,64	93,5
	1:4	9,97	9,99	100,2
44,28	1:2	22,14	21,94	99,1
	1:4	11,07	11,70	105,7

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 75-mal der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,11 ng/ml.

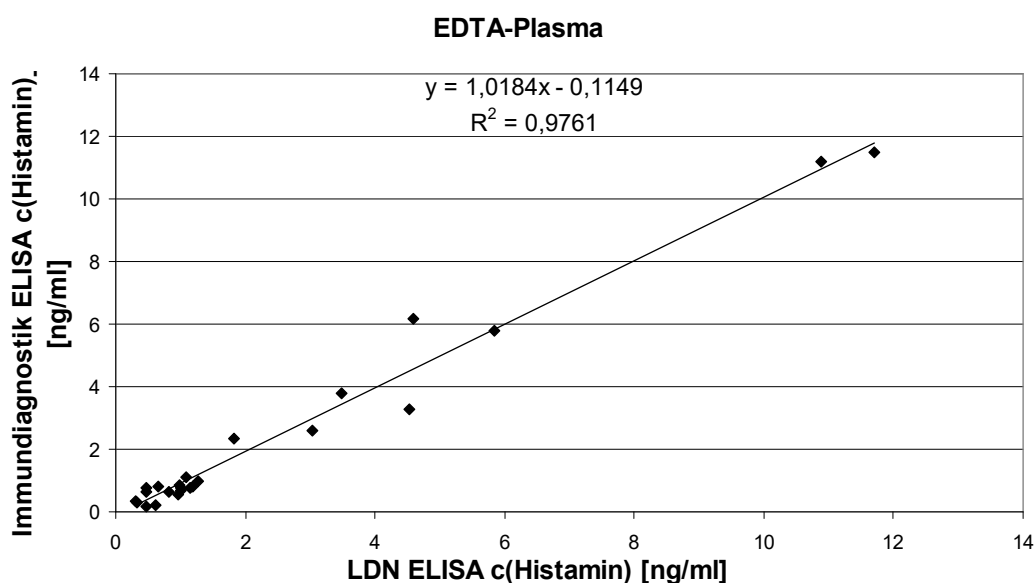
### Spezifität

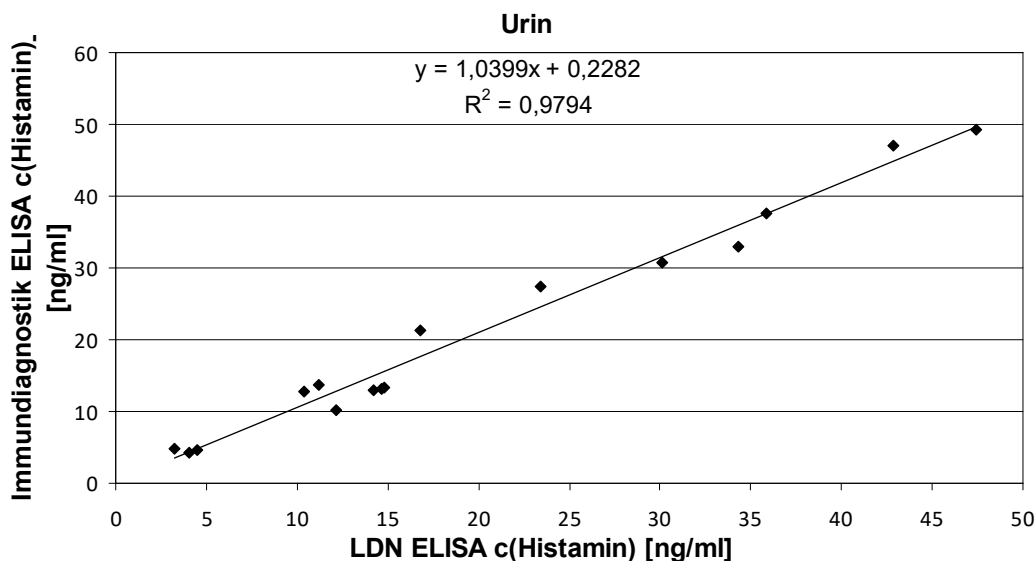
Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Histamin-Reaktivität:

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 %

### ELISA-Vergleich

24 EDTA-Plasmaproben und 16 Urinproben wurden in diesem ELISA sowie in einem kommerziell erhältlichen ELISA gemessen. Die Korrelation betrug  $r = 0,99$  für Plasma und für Urin.





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

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- 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 Immunodiagnostik 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 Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.














### 15. LITERATUR

1. Clement O, Dewachter P, Mouton-Faivre C, Nevoret C, Guilloux L, et al. Immediate Hypersensitivity to Contrast Agents: The French 5-year CIRTACI Study. *EClinical*



- Medicine*. 2018 Jul 28;1:51-61. doi: 10.1016/ j.eclinm.2018.07. 002. PMID: 31193689; PMCID: PMC6537532.
2. Kakolyri M, Strikou F, Kavallari A, Chliva C, Makris M, Tiligada E. Increased Basal Blood Histamine Levels in Patients with Self-Reported Hypersensitivity to Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(1):24-30. doi: 10.1159/000503968. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31752003.
  3. Kohno R, Cannom DS, Olshansky , XiSC, Krishnappa D, et al. Mast Cell Activation Disorder and Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome: A Clinical Association. *J Am Heart Assoc*. 2021 Sep 7;10(17):e021002. doi: 10.1161/JAHA.121.021002. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34398691; PMCID: PMC8649306
  4. Kovacova-Hanuszkova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(5):498-506. doi:10.1016/j.aller.2015.05.001
  5. Li H, Xiao Y, Li Q, Yee C, Lee JJ, Yu D, et al. The allergy mediator histamine confers resistance to immunotherapy in cancer patients via activation of the macrophage histamine receptor H1. *Cancer Cell*. 2022 Jan 10;40(1):36-52.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2021.11.002. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34822775; PMCID: PMC8779329
  6. Nuñez-Borque E, Fernandez-Bravo S, Yuste-Montalvo A, Esteban V. Pathophysiological, Cellular, and Molecular Events of the Vascular System in Anaphylaxis. *Front Immunol*. 2022 Mar 8;13:836222. doi: 10.3389/fimmu.2022.836222. PMID: 35371072; PMCID: PMC8965328
  7. Shibata Y, Hirota S, Saito I, Asahina A. Diffuse cutaneous mastocytosis: Identification of KIT mutation and long-term follow-up with serum tryptase level. *J Dermatol*. 2021 May;48(5):672-675. doi: 10.1111/1346-8138.15764. Epub 2021 Jan 31. PMID: 33521998
  8. Zou W, Yang S, Chen L, Hu S, Hao G, Hu C. Iodixanol activation of mast cells: Implications in the pathogenesis of iodixanol-induced delayed cutaneous adverse reactions. *Toxicology*. 2022 Jan 15;465:153034. doi: 10.1016/j.tox.2021.153034. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34774977

## 16. SYMBOLE

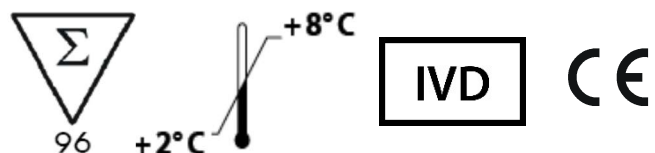
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden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

**Manual***For professional use only*

# Histamine ELISA

*For the in vitro determination of histamine  
in EDTA plasma and urine*

Valid from 2025-01-21

**REF** K 8212**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

## **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

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>21</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>22</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>22</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>23</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>24</b>
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Derivatisation procedure</i>	24
<i>Test procedure</i>	25
<b>8. RESULTS</b>	<b>26</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>27</b>
<i>Biotin interference</i>	27
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>27</b>
<i>Reference range</i>	28
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>28</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	28
<i>Spiking recovery</i>	29
<i>Dilution recovery</i>	29
<i>Analytical sensitivity</i>	30
<i>Specificity</i>	30
<i>Comparison of ELISAs</i>	31
<b>12. WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>31</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>32</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>32</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>33</b>
<b>16. SYMBOLS</b>	<b>34</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of histamine in EDTA plasma and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Histamine is a biogenic amine that derives from the decarboxylation of histidine. It is synthesised in mast cells, basophils, platelets, histaminergic neurons and enterochromaffine cells, where it is stored in vesicles. After stimulation and release, Histamine acts by binding to its 4 receptors (H1R, H2R, H3R and H4R) on target cells in various tissues.

It causes smooth muscle cell contraction, vasodilation, increased vascular permeability, increased mucous secretion, tachycardia, alterations of blood pressure and arrhythmias, among other effects.

In humans, histamine is one of the most important mediators and takes part in the initial phase of an anaphylactic reaction ("immediate type" allergy).

The quantification of histamine release from basophilic leucocytes in allergies is also of clinical interest.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 8212	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 8212	STD	Standards, ready-to-use (0, 0.3, 0.6, 1.2, 5, 25 ng/ml)	6 x 2 ml
K 8212	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml
K 8212	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 8212	AB	Histamine antibody, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 6 ml
K 8212	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	2 x 70 ml
K 8212	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 vial
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 10 ml

K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge
- 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, dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- 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

### EDTA plasma

- Collect blood into a chilled tube containing EDTA only, mix gently by inversion and chill immediately on ice. Centrifuge 10 minutes at 900 *g* at 4 °C within 20 minutes of sample collection.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- EDTA plasma samples are used **undiluted**.

### Urine

- It is possible to use spontaneous as well as 24-h urine. 24-h urine: The total volume of urine excreted during 24 h is collected in a bottle containing 10-15 ml of 6 M HCl as preservative. Avoid exposure to direct sunlight. Determine total volume for calculation of results.
- Urine samples are **diluted 1:51** for derivatisation (see derivatisation procedure).
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.

For sample preparation, a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

### Sample Storage

Freshly collected EDTA plasma can be stored for up to 6 hours at 2-8 °C. For longer storage keep plasma samples frozen at -20 °C. Avoid repeated thawing and freezing.

Spontaneous urine is stable for up to 6 hours at 2-8 °C. Acidified urine samples can be stored at 2-8 °C up to 72 h. For longer periods, store urine samples frozen at -20 °C. Avoid repeated thawing and freezing.



## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of histamine in EDTA plasma or urine. This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

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

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

### *Derivatisation procedure*

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

For **EDTA plasma** samples **no dilution** is required.

Dilute **urine samples** with reaction buffer by **factor 1:51**, as follows:

**20 µl** urine sample + **1000 µl** reaction buffer (REABUF).

Derivatisation of standards, controls, plasma samples and diluted urine samples is carried out in vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials).

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

1.	Add <b>75 µl standard</b> (STD)/ <b>control</b> (CTRL)/ <b>plasma sample</b> or <b>diluted urine sample</b> in the corresponding vials.
2.	Add <b>250 µl reaction buffer</b> (REABUF) into each vial (STD, CTRL, sample).
3.	Add <b>75 µl derivatisation reagent</b> into each vial (STD, CTRL, sample), and <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer.
4.	Incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30 °C) on a horizontal <b>shaker</b> .

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

### *Test procedure*

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet. 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.

5.	For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/ samples</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
6.	Add <b>50 µl histamine antibody</b> (AB) into each well of the microtiter plate.
7.	Cover the plate tightly with foil and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
8.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
9.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
10.	Incubate for <b>12-18 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .
11.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.

- |     |  |
|-----|--|
| 12. | Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm (690 nm) as a reference. |
|-----|--|

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

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

Derivatisation of the samples is possible in 60 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 8. RESULTS

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

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

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

### EDTA plasma

**No factor** is required for the calculation of results from plasma samples.

### Urine

The obtained histamine levels of urine samples have to be multiplied by the **dilution factor of 51** to get the actual concentrations (ng/ml = µg/l).

Calculation of 24 h excretion:  $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Conversion:  $\text{histamine} [\text{ng}/\text{ml}] \times 8.997 = \text{histamine} [\text{nmol}/\text{l}]$

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can be diluted with reaction buffer and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

*highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

*analytical sensitivity × sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 44$  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 plasma samples of apparently healthy persons (n = 36) a mean value of 0.67 ng/ml was calculated. The standard deviation (SD) was 0.18 ng/ml. The following normal range was calculated from mean value + 2 SD:

**EDTA plasma: < 1 ng/ml**

For urine, a mean value of 18.5 µg/g creatinine was calculated based on internal studies with samples of apparently healthy persons (n = 35). The standard deviation (SD) was 10.6. The following normal range was calculated from mean value + 2 SD:

**Urine: < 40 µg histamine / g creatinine**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **EDTA plasma**

Intra assay (n = 6)

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	1.36	8.9
2	3.06	6.2

Inter assay (n = 6)

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	0.84	10.0
2	0.54	10.1

#### **Urine**

Intra-Assay (n = 6)

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	10.10	10.5
2	16.02	8.7

Inter-Assay (n = 6)

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	8.49	12.1
2	12.80	8.1

### *Spiking recovery*

Two samples were spiked with different histamine concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 105.4 % for plasma and 98.9% for urine (n = 2).

#### **EDTA plasma**

sample [ng/ml]	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]	recovery [%]
0.96	3	3.96	4.46	112.6
	5	5.96	6.19	103.9
1.01	3	4.01	3.90	97.3
	5	6.01	6.46	107.6

#### **Urine**

sample [ng/ml]	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]	recovery [%]
10.10	15	25.10	27.51	109.6
	30	40.10	39.88	99.5
16.03	15	31.03	28.02	90.3
	30	46.03	44.28	96.2

### *Dilution recovery*

Two spiked samples were diluted with reaction buffer. The mean recovery rate was 102.3 % for plasma and 102.4 % for urine (n = 2).

**EDTA plasma**

sample [ng/ml]	dilution	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]	recovery [%]
6.19	1:2	3.09	3.16	102.3
	1:4	1.55	1.70	109.7
6.46	1:2	3.23	2.96	91.6
	1:4	1.62	1.83	113.0

**Urine**

sample [ng/ml]	dilution	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]	recovery [%]
39.88	1:2	19.94	18.64	93.5
	1:4	9.97	9.99	100.2
44.28	1:2	22.14	21.94	99.1
	1:4	11.07	11.70	105.7

*Analytical sensitivity*

The zero standard was measured 75 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 SD$  and estimated to be 0.11 ng/ml.

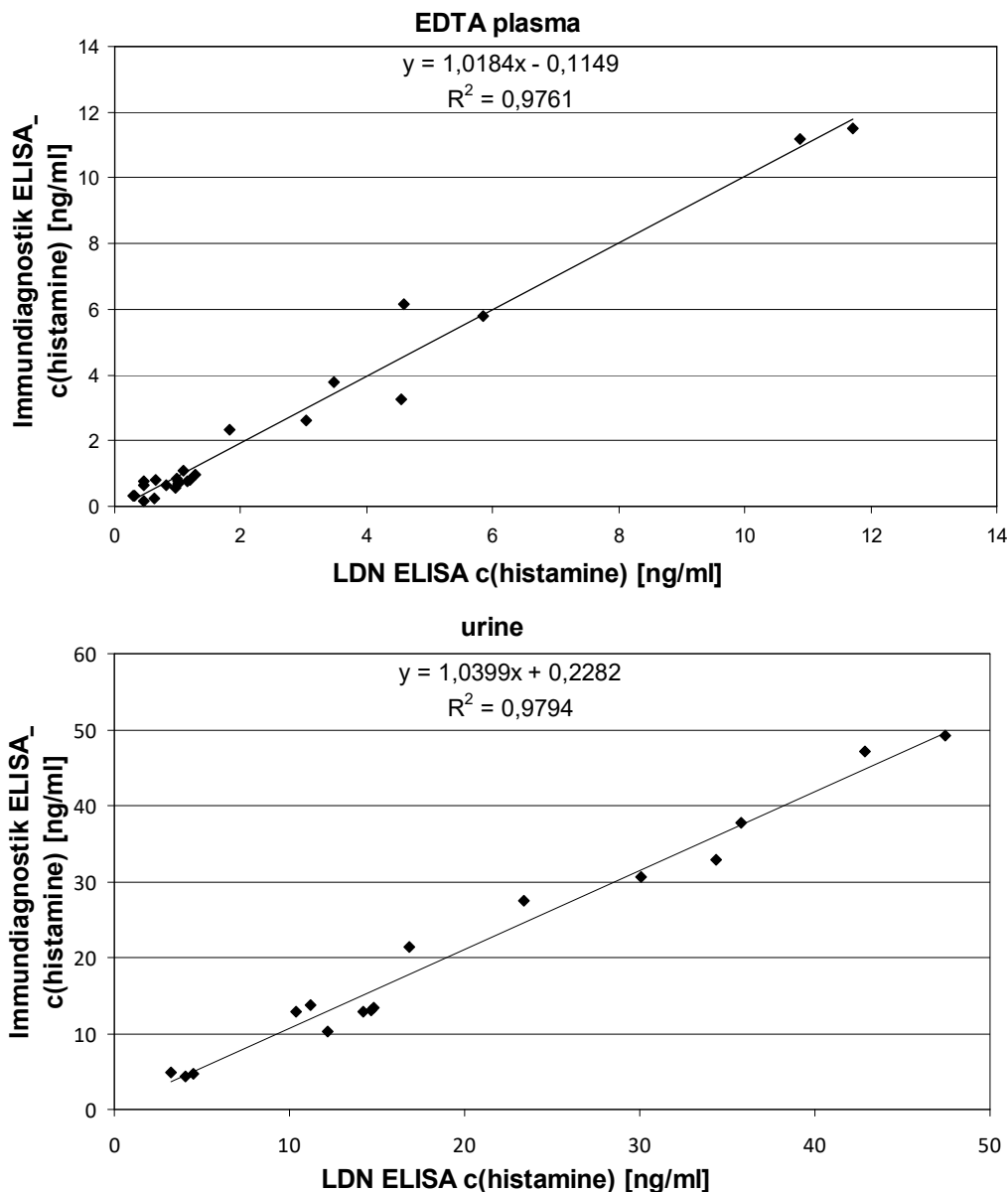
*Specificity*

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 %

## Comparison of ELISAs

24 EDTA plasma samples and 16 urine samples were measured with this ELISA and with a commercially available ELISA. The correlation was  $r = 0.99$  for plasma and for urine.



## 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 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 Immunodiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Clement O, Dewachter P, Mouton-Faivre C, Nevoret C, Guilloux L, et al. Immediate Hypersensitivity to Contrast Agents: The French 5-year CIRTACI Study. *EClinical Medicine*. 2018 Jul 28;1:51-61. doi: 10.1016/j.eclinm.2018.07.002. PMID: 31193689; PMCID: PMC6537532.
2. Kakolyri M, Strikou F, Kavallari A, Chliva C, Makris M, Tiligada E. Increased Basal Blood Histamine Levels in Patients with Self-Reported Hypersensitivity to Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(1):24-30. doi: 10.1159/000503968. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31752003.
3. Kohno R, Cannom DS, Olshansky , XiSC, Krishnappa D, et al. Mast Cell Activation Disorder and Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome: A Clinical Association. *J Am Heart Assoc*. 2021 Sep 7;10(17):e021002. doi: 10.1161/JAHA.121.021002. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34398691; PMCID: PMC8649306
4. Kovacova-Hanuszkova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(5):498-506. doi:10.1016/j.aller.2015.05.001
5. Li H, Xiao Y, Li Q, Yee C, Lee JJ, Yu D, et al. The allergy mediator histamine confers resistance to immunotherapy in cancer patients via activation of the macrophage histamine receptor H1. *Cancer Cell*. 2022 Jan 10;40(1):36-52.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2021.11.002. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34822775; PMCID: PMC8779329
6. Nuñez-Borque E, Fernandez-Bravo S, Yuste-Montalvo A, Esteban V. Pathophysiological, Cellular, and Molecular Events of the Vascular System in Anaphylaxis. *Front Immunol*. 2022 Mar 8;13:836222. doi: 10.3389/fimmu.2022.836222. PMID: 35371072; PMCID: PMC8965328
7. Shibata Y, Hirota S, Saito I, Asahina A. Diffuse cutaneous mastocytosis: Identification of KIT mutation and long-term follow-up with serum tryptase level. *J Dermatol*. 2021 May;48(5):672-675. doi: 10.1111/1346-8138.15764. Epub 2021 Jan 31. PMID: 33521998
8. Zou W, Yang S, Chen L, Hu S, Hao G, Hu C. Iodixanol activation of mast cells: Implications in the pathogenesis of iodixanol-induced delayed cutaneous adverse reactions. *Toxicology*. 2022 Jan 15;465:153034. doi: 10.1016/j.tox.2021.153034. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34774977

## 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