

## Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /  
For professional use only

# Histamin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Histamin in Stuhl*

# Histamine ELISA

*For the in vitro determination of histamine in stool*

Gültig ab / Valid from 2025-02-03

REF


**K 8213**

$\Sigma$  96

REF

**K 8213.20**

$\Sigma$  20 x 96

+2°C  +8°C

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>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</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>
<i>Probenstabilität und -lagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	7
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</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>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Spezifität</i>	12
<b>12. HINWEISE UND VORSICHTSMASSAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>14</b>
<b>16. SYMBOLE</b>	<b>16</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der Histamin-Assay K 8213 ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) für professionelle Laboranwender zum quantitativen Nachweis der Konzentration von freiem Histamin im Stuhl von Patienten jeden Alters und Geschlechts.

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

Der Nachweis einer erhöhten gastrointestinalen Histamin-Konzentration im Stuhl von Patienten dient als diagnostisches Hilfsmittel, um einen behandelnden Therapeuten über die Notwendigkeit der Verschreibung einer angemessenen diätetischen Maßnahme wie der Einnahme von Probiotika oder der Empfehlung einer histaminarmen Diät zu informieren.

## 2. EINLEITUNG

Histamin ist ein biologisches Amin, ein Neurotransmitter und ein Gewebshormon, das für essentielle physiologische Funktionen wie die Zellproliferation/Zelldifferenzierung, die Blutbildung und die Regeneration bedeutend ist<sup>[1;2;3]</sup>. Zudem beeinflusst Histamin eine Reihe von Immunreaktionen, die mit Allergien und Entzündungen einhergehen. Hohe Histaminspiegel führen zu einer erhöhten Magen-Darm-Motilität<sup>[4;5]</sup>, einer gesteigerten Schleimhautpermeabilität<sup>[6]</sup> und einer starken Überempfindlichkeit des Magen-Darm-Trakts, was mit der Entstehung eines Reizdarmsyndroms in Verbindung gebracht werden kann<sup>[7;8]</sup>.

Die Überstände von Kolonproben von Ratten mit Reizdarmsyndrom wiesen erhöhte Histaminwerte auf<sup>[9]</sup>. Gallardo et al. beobachteten einen 9,32-fach erhöhten Histamingehalt im Stuhl bei Kindern mit Durchfall aufgrund von enteropathogenen *E. coli*<sup>[10]</sup>. Dagegen verbessern Ernährungsformen, die den Histamingehalt senken, die Histaminsynthese vermindern oder den Histaminabbau erhöhen, nachweislich die Symptome bei Reizdarmsyndrom-Patienten<sup>[11;12;13]</sup>.

Histamin wird endogen synthetisiert, z. B. von Mastzellen und Basophilen. Darüber hinaus wurden Mikroorganismen der darmansässigen Mikrobiota als histaminproduzierende Quellen identifiziert<sup>[1;14;15]</sup>, die den Krankheitsverlauf eines Reizdarmsyndroms ungünstig beeinflussen. Andererseits sind Probiotika, die kein Histamin produzieren, für die Behandlung des Reizdarmsyndroms von Vorteil<sup>[16;17;18]</sup>.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Histamin ein wichtiger Faktor für die Darmgesundheit ist. Es beeinflusst die Magen-Darm-Motilität, die Schleimhautpermeabilität und die Überempfindlichkeit des Magen-Darm-Trakts.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge für Art.-Nr.	
			K 8213	K 8213.20
K 8213	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen	20 x 12 x 8 Vertiefungen
K 0015	COPLATE	Kopplungsplatte	12 x 8 Vertiefungen	
K 8213	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml	10 x 6 x 2 ml
K 8213	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml	10 x 2 ml
K 8213	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml	10 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml	20 x 100 ml
K 7999.100	IDK® Amino Extract	Extraktionspuffer <i>IDK® Amino Extract</i> , gebrauchsfertig	2 x 100 ml	
K 8213	AB	Histamin-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 6 ml	20 x 6 ml
K 8213	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 70 ml	20 x 70 ml
K 8213	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 vial	20 vials
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml	20 x 7 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml

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

## 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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

### *Probenstabilität und -lagerung*

**Rohstuhl** kann bis zu 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Zur längeren Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

**Stuhlextrakt** kann bis zu 7 Tage bei Raumtemperatur oder bei 2-8 °C gelagert werden. Zur längeren Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

### *Stuhlprobenextraktion*

Wir empfehlen, das mit **IDK® Amino Extract** (Extraktionspuffer) **befüllte Stuhlprobenvorbereitungssystem (Artikel-Nr. K 7999)** zu verwenden.

Der Extraktionspuffer IDK® Amino Extract ist gebrauchsfertig. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

#### ***Stuhlprobenröhrchen - Anwendung***

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

#### ***Stuhlprobenröhrchen mit 0,75 ml Puffer:***

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen (IDK® Amino Extract):	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe der befüllten Stuhlprobenröhrchen wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- b) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde). Der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- c) Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist

darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.

- d) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- e) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

**Verdünnung I:                    1:50**

### *Probenverdünnung*

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:4 mit Extraktionspuffer (IDK® Amino Extract)** weiter verdünnt. Zum Beispiel:

**100 µl** Suspension (Verdünnung I) + **300 µl** IDK® Amino Extract, mischen  
= **1:4 (Verdünnung II)**.

Dies entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:200**.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **25 µl der Verdünnung II** derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

## **7. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Histamin aus Stuhl. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung werden Standards, Kontrollen und extrahierte Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Histamins versetzt. Anschließend wird in einer mit Histamin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte die derivatisierte Probe zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen Histamin-Antikörper 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.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Stuhlproben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt. Alternativ dazu kann die Derivatisierung auch in den Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) durchgeführt werden.

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

1.	<b>25 µl Standard (STD)/Kontrolle (CTRL)/ Probe aus Verdünnung II</b> in Mikroreaktionsgefäße bzw. in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) pipettieren.
2.	<b>250 µl Reaktionspuffer (REABUF)</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) bzw. in jede Vertiefung der Kopplungsplatte pipettieren.
3.	<b>50 µl Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem <b>Horizontalschüttler 30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren.  <i>Alternativ dazu:</i> <b>50 µl Derivatisierungsreagenz</b> in jede Vertiefung (STD, CTRL, Probe) der Kopplungsplatte pipettieren und sofort auf einem <b>Horizontalschüttler 30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und 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.

4.	<b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen, oder der COPLATE, als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
5.	<b>50 µl Histamin-Antikörper</b> (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Platte mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15-30°C) <b>unter Schütteln</b> inkubieren.
7.	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.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	<b>12-18 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	<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 automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:

Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 30 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

## 8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 200** multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II), um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten. Sollte ein anderer Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Extraktionspuffer (IDK® Amino Extract) stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung 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:

*LoB* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 1333$  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*

#### **1 g Stuhl entspricht 1 ml.**

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n = 36$ ) wurde ein Mittelwert von 481 ng/g ermittelt, bei einer Standardabweichung (SD) von 239 ng/g. Aus Mittelwert + 2 x SD ergibt sich folgender Normbereich:

Histamin-Konzentration im Stuhl:  $< 959$  ng/g

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay (n = 12)**

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	689	8,8
2	1331	8,3

#### **Inter-Assay (n = 10)**

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	361	7,7
2	1502	8,8

### *Spike-Wiederfindung*

Zwei Stuhlproben wurden mit unterschiedlichen Histamin-Mengen versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 98,2 %.

Probe	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A			175,0	
	400	575,0	555,0	96,5
	1320	1495,0	1579,0	105,6
B			232,0	
	400	632,0	583,0	92,2
	1320	1552,0	1530,0	98,6

### *Wiederfindung in der Verdünnung*

Zwei mit Histamin gespikte Stuhlproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 91,8 %.

Probe	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:200		2157,4	
	1:400	1078,7	987,6	91,6
	1:800	539,4	468,4	86,8
	1:1600	269,7	261,8	97,1
B	1:200		3155,4	
	1:400	1577,7	1647,6	104,4
	1:800	788,9	718,4	91,1
	1:1600	394,4	327,3	83,0

### Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,49 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,77 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 1,00 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

### Spezifität

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

3-Methylhistamin	< 0,1 %
Tyramin	< 0,001 %
L-Phenylalanin	< 0,0002 %
L-Histidin	< 0,0002 %
L-Tyrosin	< 0,0002 %
Tryptamin	< 0,0002 %
5-Hydroxyindolessigsäure	< 0,0002 %
Serotonin (5-Hydroxytryptamin)	< 0,0002 %

## 12. HINWEISE UND VORSICHTSMASSAHMEN

- 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.
- *IDK*<sup>®</sup> ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

















## 15. LITERATUR

1. Barcik W, Wawrzyniak M, Akdis CA, O'Mahony L. Immune regulation by histamine and histamine-secreting bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 2017, 48, 108–113.
2. Smolinska S, Jutel M, Cramer R, O'Mahony L. Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* 2014, 69, 273–281.
3. 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
4. Neuhuber W, Wörl J. Monoamines in the enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* 2018 Dec;150(6):703-709. doi: 10.1007/s00418-018-1723-4.
5. Tokita Y, Akiho H, Nakamura K, Ihara E, Yamamoto M. Contraction of gut smooth muscle cells assessed by fluorescence imaging. *J Pharmacol Sci.* 2015 Mar;127(3):344-51.
6. Potts RA, Tiffany CM, Pakpour N, Lokken KL, Tiffany CR, Cheung K, Tsohis RM, Luckhart S. Mast cells and histamine alter intestinal permeability during malaria parasite infection. *Immunobiology.* 2016 Mar;221(3):468-74.



7. Fabisiak A, Włodarczyk J, Fabisiak N, Storr M, Fichna J. Targeting Histamine Receptors in Irritable Bowel Syndrome: A Critical Appraisal. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2017, 23, 341–348.
8. Nam Y, Min YS, Sohn UD. Recent advances in pharmacological research on the management of irritable bowel syndrome. *Arch. Pharm. Res.* 2018, 41, 955–966.
9. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007, 132, 26–37.
10. Gallardo P, Izquierdo M, Vidal RM, Soto F, Ossa JC, Farfan MJ. Gut Microbiota-Metabolome Changes in Children With Diarrhea by Diarrheagenic E. coli. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(September):1-10. doi:10.3389/fcimb.2020.00485
11. McIntosh K, Reed DE, Schneider T, Dang F, Keshteli AH, De Palma G, Madsen K, Bercik P, Vanner S. FODMAPs alter symptoms and the metabolome of patients with IBS: a randomised controlled trial. *Gut.* 2017 Jul;66(7):1241-1251. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311339. Erratum in: *Gut.* 2019 Jul;68(7):1342
12. Neree AT, Soret R, Marcocci L, Pietrangeli P, Pilon N, Mateescu MA. Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. *Sci Rep.* 2020 Dec 9;10(1):21563. doi: 10.1038/s41598-020-78134-3
13. Camilleri M, Boeckxstaens G. Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut.* 2017 May;66(5):966-974. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313425. Epub 2017 Feb 23.
14. Barcik W, Pugin B, Brescó MS, Westermann P, Rinaldi A, Groeger D, Van Elst D, Sokolowska M, Krawczyk K, Frei R, et al. Bacterial secretion of histamine within the gut influences immune responses within the lung. *Allergy* 2019, 74, 899–909.
15. Schink M, Konturek PC, Tietz E, et al. Microbial patterns in patients with histamine intolerance. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(4):579-593. doi:10.26402/jpp.2018.4.09
16. Choi IY, Kim J, Kim SH, Ban OH, Yang J, Park MK. Safety Evaluation of *Bifidobacterium breve* IDCC4401 Isolated from Infant Feces for Use as a Commercial Probiotic. *J Microbiol Biotechnol.* 2021 Jul 28;31(7):949-955. doi: 10.4014/jmb.2103.03041
17. Sharikadze O, Zubchenko S, Maruniak S, Yuriev S. Investiagtion of protective effects of synbiotics on allergopathy formation. *Georgian Med News.* 2018 Jul-Aug;(280-281):90-94.
18. Pithva S, Shekh S, Dave J, Vyas BR. Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014 May;173(1):259-77. doi: 10.1007/s12010-014-0839-9.

## 16. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaprodukte 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 stool***

Valid from 2025-02-03

**K 8213**

96

**K 8213.20**

20 x 96

**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>20</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>21</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>22</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>22</b>
<i>Stability and storage of samples</i>	22
<i>Extraction of the stool samples</i>	23
<i>Dilution of samples</i>	24
<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>	28
<i>Dilution recovery</i>	29
<i>Analytical sensitivity</i>	29
<i>Specificity</i>	29
<b>12. WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>30</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>30</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>31</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>31</b>
<b>16. SYMBOLS</b>	<b>33</b>

## 1. INTENDED USE

The histamine assay K 8213 is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) intended for professional laboratory users for the quantitative detection of the free histamine concentration in stool from patients of any age and gender.

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

The detection of an elevated gastrointestinal histamine concentration in the stool of a patient is used as a diagnostic aid to inform the treating therapist about the necessity to prescribe appropriate dietetic interventions, such as the intake of probiotics or the recommendation of a low-histamine diet.

## 2. INTRODUCTION

Histamine is a biological amine, transmitter and tissue hormone important for essential physiological functions such as cell proliferation/differentiation, haematopoiesis, and regeneration<sup>[1;2;3]</sup>. It influences a number of immune responses associated with allergies and inflammation. In irritable bowel syndrome (IBS) high histamine levels lead to Increased gastrointestinal (GI) motility<sup>[4;5]</sup>, increased mucosal permeability<sup>[6]</sup> and more GI hypersensitivity, which may be associated with the pathogenesis of IBS<sup>[7;8]</sup>.

Supernatants from colonic samples of rats with IBS were found to have increased histamine levels<sup>[9]</sup>. Gallardo et al. found 9.32-fold increased histamine stool levels in children with diarrhea due to diarrheagenic *E. coli*<sup>[10]</sup>. Diets, that reduce histamine levels, or decrease histamine synthesis, or increase histamine degradation have been shown to improve symptoms in IBS patients<sup>[11;12;13]</sup>.

Histamine is synthesised endogenously, e.g. by mast cells and basophils. In addition, resident gut microbial species have been identified as histamine-producing sources<sup>[1;14;15]</sup>, that are unfavourable in IBS. On the other hand, probiotics that do not produce histamine are beneficial for the treatment of IBS<sup>[16;17;18]</sup>.

In conclusion, histamine which is produced endogenously and by the microbiota is an important player in gut health and affects GI motility, mucosal permeability and GI hypersensitivity.

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity for cat.no.	
			K 8213	K 8213.20
K 8213	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells	20 x 12 x 8 wells
K 0015	COPLATE	Plate for derivatisation	12 x 8 wells	
K 8213	STD	Standards, ready-to-use (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml	10 x 6 x 2 ml
K 8213	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml	10 x 2 ml
K 8213	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml	10 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml	20 x 100 ml
K 7999.100	IDK® Amino Extract	Extraction buffer <i>IDK® Amino Extract</i> , ready-to-use	2 x 100 ml	
K 8213	AB	Histamine antibody, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 6 ml	20 x 6 ml
K 8213	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 70 ml	20 x 70 ml
K 8213	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 vial	20 vials
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml	20 x 7 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml	20 x 15 ml

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

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex

- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

## 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Bring to room temperature before opening and dissolve the content of the vial in **DMSO** as stated on the label. Allow to dissolve for **15 min** and mix thoroughly with a vortex-mixer. Ensure that it is completely dissolved. **The derivatisation reagent** (reconstituted DER) can be stored at **2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Stability and storage of samples*

**Raw stool** is stable for 2 days at room temperature. For longer storage keep frozen at -20 °C.

**Stool extract** is stable for 7 days at room temperature or at 2-8 °C. For longer storage keep frozen at -20 °C.



## *Extraction of the stool samples*

We recommend using the **stool sample preparation system filled with IDK® Amino extract** (extraction buffer), **Cat No. K 7999**.

The extraction buffer IDK® Amino Extract is ready-to-use. We recommend the following sample preparation:

### ***Stool sample tube – Instructions for use***

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer:

#### ***Stool sample tube with 0.75 ml buffer:***

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer volume (IDK® Amino Extract):	0.75 ml
Dilution factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the stool sample tubes as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenization using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place the dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped of, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- c) Vortex the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~10 minutes improves the result.
- d) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution I:            1:50**

### *Dilution of samples*

Dilute the supernatant of the sample extraction (dilution I) **1:4 with extraction buffer (IDK® Amino Extract)**. For example:

**100 µl** supernatant (dilution I) + **300 µl** IDK® Amino Extract, mix well  
= **1:4 (dilution II)**. This results in a final dilution of **1:200**.

To **25 µl of dilution II** a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

## **7. ASSAY PROCEDURE**

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of histamine in stool. 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.

Derivatisation of standards, controls and diluted stool samples is carried out in reaction vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials). Alternatively, the derivatisation can be carried out in the wells of the COPLATE.

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>25 µl standard</b> (STD)/ <b>control</b> (CTRL)/ <b>sample from dilution II</b> into the respective vials, or into the wells of the COPLATE.
2.	Add <b>250 µl reaction buffer</b> (REABUF) into each vial (STD, CTRL, sample), or into each well of the COPLATE.
3.	Add <b>50 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. Incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> . <i>Alternatively:</i> Add <b>50 µl derivatisation reagent</b> into each well (STD, CTRL, sample) of the COPLATE and incubate immediately on a <b>horizontal shaker</b> for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C).

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and 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.

4.	For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/samples</b> out of the vials, or the COPLATE, and add into the respective wells of the microtiter plate.
5.	Add <b>50 µl histamine antibody</b> (AB) into each well of the microtiter plate.
6.	Cover the strips tightly with foil and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
7.	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.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>12-18 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .
10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.

- |     |  |
|-----|--|
| 11. | 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 observing 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 30 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 8. RESULTS

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

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

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

## Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 200** (dilution I x dilution II) to get the actual concentrations.

In case another dilution factor has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can be further diluted with extraction buffer (IDK® Amino Extract) and re-assayed. Please consider this higher dilution 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:

*LoB × sample dilution factor to be used*

LoB see chapter "Performance Characteristics".

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 1333$  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***1 g stool is equivalent to 1 ml.**

Based on internal studies with stool samples of apparently healthy persons (n = 36) a mean value of 481 ng/g was calculated. The standard deviation (SD) was 239 ng/g. The following normal range was calculated from mean value + 2 x SD:

Histamine concentration in stool: < 959 ng/g

We recommend that each laboratory establishes its own reference range.

**11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS***Precision and reproducibility***Intra-assay (n = 12)**

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	689	8.8
2	1331	8.3

**Inter-assay (n = 10)**

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	361	7.7
2	1502	8.8

*Spiking recovery*

Two samples were spiked with different histamine concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 98.2 %

sample	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]	recovery [%]
A			175.0	
	400	575.0	555.0	96.5
	1320	1495.0	1579.0	105.6
B			232.0	
	400	632.0	583.0	92.2
	1320	1552.0	1530.0	98.6

### *Dilution recovery*

Two spiked samples were diluted and measured in this assay. The mean recovery rate was 91.8 %.

sample	dilution	expected [ng/ml]	measured [ng/ml]	recovery [%]
A	1:200		2157.4	
	1:400	1078.7	987.6	91.6
	1:800	539.4	468.4	86.8
	1:1600	269.7	261.8	97.1
B	1:200		3155.4	
	1:400	1577.7	1647.6	104.4
	1:800	788.9	718.4	91.1
	1:1600	394.4	327.3	83.0

### *Analytical sensitivity*

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	0.49 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.77 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	1.00 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

### *Specificity*

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to histamine. The specificity is calculated in percent, in relation to the histamine-binding activity:

3-methylhistamine	< 0.1 %
tyramine	< 0.001 %
L-phenylalanine	< 0.0002 %
L-histidine	< 0.0002 %
L-tyrosine	< 0.0002 %
tryptamine	< 0.0002 %
5-hydroxyindoleacetic acid	< 0.0002 %
serotonin (5-hydroxytryptamine)	< 0.0002 %

## 12. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain ProClin or thimerosal as bactericides. ProClin and thimerosal are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact. **Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during 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.
- *IDK*<sup>®</sup> is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Barcik W, Wawrzyniak M, Akdis CA, O'Mahony L. Immune regulation by histamine and histamine-secreting bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 2017, 48, 108–113.
2. Smolinska S, Jutel M, Cramer R, O'Mahony L. Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* 2014, 69, 273–281.
3. 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
4. Neuhuber W, Wörl J. Monoamines in the enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* 2018 Dec;150(6):703-709. doi: 10.1007/s00418-018-1723-4.
5. Tokita Y, Akiho H, Nakamura K, Ihara E, Yamamoto M. Contraction of gut smooth muscle cells assessed by fluorescence imaging. *J Pharmacol Sci.* 2015 Mar;127(3):344-51.
6. Potts RA, Tiffany CM, Pakpour N, Lokken KL, Tiffany CR, Cheung K, Tsolis RM, Luckhart S. Mast cells and histamine alter intestinal permeability during malaria parasite infection. *Immunobiology.* 2016 Mar;221(3):468-74.
7. Fabisiak A, Włodarczyk J, Fabisiak N, Storr M, Fichna J. Targeting Histamine Receptors in Irritable Bowel Syndrome: A Critical Appraisal. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2017, 23, 341–348.
8. Nam Y, Min YS, Sohn UD. Recent advances in pharmacological research on the management of irritable bowel syndrome. *Arch. Pharm. Res.* 2018, 41, 955–966.

9. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007, 132, 26–37.
10. Gallardo P, Izquierdo M, Vidal RM, Soto F, Ossa JC, Farfan MJ. Gut Microbiota-Metabolome Changes in Children With Diarrhea by Diarrheagenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(September):1-10. doi:10.3389/fcimb.2020.00485
11. McIntosh K, Reed DE, Schneider T, Dang F, Keshteli AH, De Palma G, Madsen K, Bercik P, Vanner S. FODMAPs alter symptoms and the metabolome of patients with IBS: a randomised controlled trial. *Gut.* 2017 Jul;66(7):1241-1251. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311339. Erratum in: *Gut.* 2019 Jul;68(7):1342
12. Neree AT, Soret R, Marcocci L, Pietrangeli P, Pilon N, Mateescu MA. Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. *Sci Rep.* 2020 Dec 9;10(1):21563. doi: 10.1038/s41598-020-78134-3
13. Camilleri M, Boeckxstaens G. Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut.* 2017 May;66(5):966-974. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313425. Epub 2017 Feb 23.
14. Barcik W, Pugin B, Brescó MS, Westermann P, Rinaldi A, Groeger D, Van Elst D, Sokolowska M, Krawczyk K, Frei R, et al. Bacterial secretion of histamine within the gut influences immune responses within the lung. *Allergy* 2019, 74, 899–909.
15. Schink M, Konturek PC, Tietz E, et al. Microbial patterns in patients with histamine intolerance. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(4):579-593. doi:10.26402/jpp.2018.4.09
16. Choi IY, Kim J, Kim SH, Ban OH, Yang J, Park MK. Safety Evaluation of *Bifidobacterium breve* IDCC4401 Isolated from Infant Feces for Use as a Commercial Probiotic. *J Microbiol Biotechnol.* 2021 Jul 28;31(7):949-955. doi: 10.4014/jmb.2103.03041
17. Sharikadze O, Zubchenko S, Maruniak S, Yuriev S. Investiagtion of protective effects of synbiotics on allergopathy formation. *Georgian Med News.* 2018 Jul-Aug;(280-281):90-94.
18. Pithva S, Shekh S, Dave J, Vyas BR. Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014 May;173(1):259-77. doi: 10.1007/s12010-014-0839-9.

## 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