

Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only

Histamin ELISA

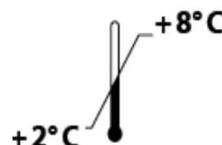
*Zur in-vitro-Bestimmung von Histamin in Vollblut
und Trockenblutproben*

Histamine ELISA

*For the in vitro determination of histamine in whole blood
and dried blood spots*

Gültig ab / Valid from 2025-01-22

REF K 8214



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

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

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Vollblut</i>	4
<i>Trockenblut</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
<i>Biotininterferenz</i>	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	13
<i>Analytische Spezifität</i>	14
12. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	14
13. TECHNISCHE MERKMALE	15
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
15. LITERATUR	16
16. SYMBOLE	17

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser Histamin ELISA ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum quantitativen Nachweis der Konzentration von Gesamt-Histamin in Vollblut und Trockenblutproben.

Der Assay ist ein In-vitro diagnostischer Test zur Verwendung durch professionelle Anwender in einer Laborumgebung. Er kann manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden.

Der Test dient als Hilfsmittel zur Diagnose einer erhöhten Gesamt-Histamin-Konzentration im Blut.

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. Als vasoaktiver Mediator spielt es eine dominierende Rolle bei allergischen Erkrankungen wie Rhinitis allergica (Heuschnupfen), allergischem Asthma bronchiale und Urticaria.

Von klinischem Interesse ist die potenzielle Histamin-Freisetzung aus den Histamin-Reserven in den Vesikeln basophiler Leukozyten, Mastzellen oder Blutplättchen bei Allergien, die durch Bestimmung der Histaminkonzentration aus Vollblut oder Trockenblut abgeschätzt werden kann.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8214	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0015	COPLATE	Kopplungsplatte	12 x 8 Vertiefungen
K 8214	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 3; 10; 30; 60; 120 ng/ml)	6 x 2 ml

K 8214	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml
K 8214	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 ml
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8214	AB	Histamin-Antikörper, peroxidase- markiert, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
K 8214	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 70 ml
K 8214	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*
- Trockenprobenträger wie z.B. DrySpot-ID Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Inkubator 90 °C
- Zentrifuge, 10000 g
- 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

Vollblut

Lagerung

Als Probenmaterial eignet sich heparinisiertes Vollblut. In heparinisiertem Vollblut ist Histamin 3 Tage bei Raumtemperatur oder bei 2-8 °C stabil. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.

Extraktion

1.	50 µl heparinisiertes Vollblut in beschriftete Mikroreaktionsgefäße (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) pipettieren.
2.	1 ml Reaktionspuffer (REABUF) zu jeder Probe pipettieren und gründlich mischen.
3.	Die Proben für 10 Minuten auf 90°C erhitzen.
4.	Anschließend 10 Minuten abkühlen lassen.
5.	Die Proben 5 Minuten bei 10000 g zentrifugieren.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **275 µl** dieses Extraktes derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

Trockenblut

Probengewinnung und -lagerung

Als Probenmaterial eignen sich **50 µl Vollblut**, die auf einen von Immundiagnostik AG freigegebenen Trockenprobenträger aufgetropft und vollständig getrocknet sind. Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind 7 Tage bei Raumtemperatur stabil. Zur längeren Lagerung empfehlen wir, die Karten trocken bei -20°C aufzubewahren.

Extraktion

1.	Filter aus Testbrief entnehmen und in beschriftete Reaktionsgefäße (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) geben.
2.	1 ml Reaktionspuffer (REABUF) zu jeder Probe pipettieren und gründlich mischen.
3.	Die Proben für 10 Minuten auf 90°C erhitzen.
4.	Anschließend 10 Minuten abkühlen lassen.
5.	Die Proben 5 Minuten bei 10000 g zentrifugieren.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **275 µl** dieses Extraktes derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Histamin aus heparinisiertem Vollblut oder Trockenblut. 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 die derivatisierte Probe zusammen mit einem peroxidase-markierten 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.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der extrahierten Proben 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.	<p>25 µl Standard (STD)/Kontrolle (CTRL) in Mikroreaktionsgefäße bzw. in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) pipettieren.</p> <p>275 µl extrahierte Probe in Mikroreaktionsgefäße bzw. in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) pipettieren.</p>
----	--

2.	250 µl Reaktionspuffer (REABUF) nur zu den Standards und Kontrollen in den Reaktionsgefäßen bzw. in der COPLATE pipettieren.
3.	50 µl Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen. Anschließend auf einem Horizontalschüttler 30 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren. <i>Alternativ dazu: 50 µl Derivatisierungsreagenz</i> in jede Vertiefung (STD, CTRL, Probe) der Kopplungsplatte pipettieren und sofort auf einem Horizontalschüttler 30 min 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.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben aus den Mikroreaktionsgefäßen, oder der COPLATE, als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
5.	50 µl Histamin-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Platte mit Folie dicht abkleben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	12-18 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.

11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm 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 405 nm 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 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.

Vollblut und Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 1,91** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können nicht verdünnt werden.

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 ≤ 129 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 Vollblut- und Trockenblut-Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 38) wurde für Vollblut ein Median von 39 ng/ml ermittelt, die 10. und die 90. Perzentile lagen bei 26 bzw. 63 ng/ml. Für Trockenblut wurde ein Median von 46 ng/ml ermittelt, die 10. und 90. Perzentile lagen bei 29 bzw. 72 ng/ml. Daraus ergeben sich folgende Normbereiche:

Histamin-Konzentration in Vollblut: 26 – 63 ng/ml

Histamin-Konzentration in Trockenblut: 29 – 72 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 12

Die Wiederholbarkeit wurde mit 4 Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge identisch) in Einzelbestimmungen bestimmt.

Vollblut

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	30,3	9,1
2	52,6	8,8
3	74,6	9,4
4	87,4	5,4

Trockenblut

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	37,2	7,1
2	51,2	8,0
3	65,0	7,9
4	93,7	9,7

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 12

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 6 Proben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge unterschiedlich) in Doppelbestimmungen bestimmt.

Vollblut

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	26,8	12,4
2	31,7	13,9
3	42,4	9,5
4	59,9	7,4
5	83,8	7,9
6	173,1	11,3

Trockenblut

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	27,9	16,8
2	34,4	8,5
3	48,1	7,6
4	56,2	12,0
5	94,2	7,5
6	176,6	11,6

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 3 Proben mit bekannten Histamin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Vollblut

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
30,9	16,9	47,8	47,0	98,2
	36,9	67,8	69,0	101,6
	56,9	87,8	90,3	102,8
32,9	18,6	49,6	47,4	95,6
	38,6	69,6	66,1	95,0
	58,6	89,6	109,3	122,0
30,0	16,0	47,0	42,6	90,6
	36,0	67,0	62,3	93,0
	56,0	87,0	91,7	105,4

Trockenblut

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
27,4	17,3	44,6	40,9	91,6
	37,3	64,6	59,3	91,7
	57,3	84,6	98,3	116,2
28,4	18,2	45,6	44,2	96,9
	38,2	65,6	54,8	83,6
	58,2	85,6	85,3	99,7
30,0	19,7	47,0	46,0	97,7
	39,7	67,0	56,9	84,9
	59,7	87,0	94,6	108,6

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 4 heparinisierten Vollplutproben mit einer Li-Heparin-Plasmaprobe mit 2,39 ng/ml Histamin-Gehalt nachgewiesen.

Für Histamin in heparinisiertem Vollblut wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 11,9 bis 118,0 ng/ml nachgewiesen mit einer Wiederfindung von 82,8 bis 113,4 %.

Für Histamin in Trockenblut wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 14,2 bis 121,6 ng/ml nachgewiesen mit einer Wiederfindung von 79,7 bis 106,4 %.

Vollblut

Probe [ng/ml]	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
40,6	1:1,5	27,9	23,7	85,2
	1:2	21,5	18,2	84,9
	1:2,5	17,7	14,6	82,9
	1:3	15,1	12,5	82,8
	1:4	11,9	12,4	103,9
56,2	1:1,5	38,3	37,4	97,8
	1:2	29,3	30,2	103,1
	1:2,5	23,9	26,5	110,9
	1:3	20,3	21,3	104,8
	1:4	15,9	15,0	94,8

98,9	1:1,5	66,7	59,2	88,8
	1:2	50,6	44,0	86,9
	1:2,5	41,0	35,4	86,3
	1:3	34,5	33,4	96,6
	1:4	26,5	27,7	104,5
118,0	1:1,5	79,5	82,4	103,7
	1:2	60,2	58,9	97,9
	1:2,5	48,6	50,0	102,9
	1:3	40,9	42,0	102,7
	1:4	31,3	35,5	113,4

Trockenblut

Probe [ng/ml]	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
39,9	1:1,5	27,4	24,7	90,1
	1:2	21,2	19,2	90,8
	1:2,5	17,4	15,5	89,0
	1:3	14,9	13,5	90,7
	1:4	11,8	8,9	75,8
49,7	1:1,5	33,9	33,3	98,1
	1:2	26,0	27,3	104,7
	1:2,5	21,3	21,2	99,5
	1:3	18,2	19,3	106,4
	1:4	14,2	13,3	93,9
78,9	1:1,5	53,4	51,7	96,7
	1:2	40,7	44,1	108,4
	1:2,5	33,0	26,3	79,7
	1:3	27,9	23,2	83,1
	1:4	21,5	22,0	102,0
121,6	1:1,5	81,9	68,0	83,1
	1:2	62,0	50,3	81,1
	1:2,5	50,1	40,7	81,4
	1:3	42,1	34,3	81,5
	1:4	32,2	28,9	89,8

Analytische Sensitivität

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

Vollblut

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 40-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,18 ng/ml.

Trockenblut

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 40-mal der aus Trockenprobenträger extrahierte Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 2,01 ng/ml.

Analytische 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 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 Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Chen Q, Shao L, Li Y, Dai M, Liu H, Xiang N, Chen H. Tanshinone IIA alleviates ovalbumin-induced allergic rhinitis symptoms by inhibiting Th2 cytokine production and mast cell histamine release in mice. *Pharm Biol.* 2022 Dec;60(1):326-333. doi: 10.1080/13880209.2022.2034894. PMID: 35167426; PMCID: PMC8856108.
2. Coulson J, Thompson JP. Paracetamol (acetaminophen) attenuates in vitro mast cell and peripheral blood mononucleocyte cell histamine release induced by N-acetylcysteine. *Clin Toxicol (Phila).* 2010 Feb;48(2):111-4. doi: 10.3109/15563650903520959. PMID: 20136478.
3. Demoly P, Lebel B, Messaad D, Sahla H, Rongier M, Daurès JP, Godard P, Bousquet J. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy.* 1999 May;54(5):500-6. doi: 10.1034/j.1398-9995.1999.00020.x. PMID: 10380783.
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. Matsumoto J, Matsuda H. Mast-cell-dependent histamine release after praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: implications for chemotherapy-related adverse effects. *Parasitol Res.* 2002 Oct;88(10):888-93. doi: 10.1007/s00436-002-0677-5. Epub 2002 Jun 14. PMID: 12209328.
6. Serrier J, Khoy K, Petit G, Parienti JJ, Laroche D, Mariotte D, Le Mauff B. Mediators of anaphylactic reactions: Tryptase and histamine stability in whole blood. *Allergy.* 2021 May;76(5):1579-1583. doi: 10.1111/all.14663. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33202058.

16. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate 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 whole blood
and dried blood spots***

Valid from 2025-01-22

REF **K 8214**



IVD **CE**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.comwww.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

1. INTENDED USE	21
2. INTRODUCTION	21
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	23
<i>Whole blood</i>	23
<i>Dried blood spots</i>	24
7. ASSAY PROCEDURE	24
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Derivatisation procedure</i>	25
<i>Test procedure</i>	25
8. RESULTS	27
9. LIMITATIONS	27
<i>Biotin interference</i>	27
10. QUALITY CONTROL	28
<i>Reference range</i>	28
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>Precision and reproducibility</i>	28
<i>Accuracy – Trueness</i>	29
<i>Linearity</i>	30
<i>Analytical sensitivity</i>	32
<i>Analytical Specificity</i>	32
12. WARNINGS AND PRECAUTIONS	33
13. TECHNICAL HINTS	33
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	33
15. REFERENCES	34
16. SYMBOLS	35

1. INTENDED USE

This Histamine ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative detection of the concentration of total histamine in whole blood and dried blood spots.

The assay is an *in vitro* diagnostic medical device and intended to be used by professional users in a laboratory environment. It can be performed manually or using an automated platform.

The test serves as an aid to diagnosis of an elevated total histamine concentration in blood.

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. As a vasoactive mediator, it plays a dominant role in allergic diseases such as allergic rhinitis (hay fever), allergic bronchial asthma, and urticaria.

Of clinical interest is the potential histamine release from vesicles in basophilic leukocytes, mast cells or platelets in allergies, which can be estimated by determining the histamine concentration from whole blood or dried blood.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 8214	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0015	COPLATE	Plate for derivatisation	12 x 8 wells
K 8214	STD	Standards, ready-to-use (0, 3, 10, 30, 60, 120 ng/ml)	6 x 2 ml
K 8214	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml
K 0001.C.100	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2 ml

K 8214	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 8214	AB	Histamine antibody, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 6 ml
K 8214	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	2 x 70 ml
K 0008.10	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 vial
K 0002.15	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 10 ml
K 0003.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 8214	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*
- Dried blood spot carrier such as DrySpot-ID cat. no. DZ9020ID or DZ9021ID
- 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
- Incubator 90 °C
- Centrifuge, 10000 g
- 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

Whole blood

Sample storage

Heparinised whole blood is suitable as sample material. In heparinised whole blood, histamine is stable for 3 days at room temperature or at 2-8 °C. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.

Extraction

1.	Add 50 µl heparinised whole blood sample in labelled 1.5 ml polypropylene tubes.
2.	Add 1 ml reaction buffer (REABUF) to each sample and mix well.
3.	Heat the samples for 10 minutes at 90°C .
4.	Then let cool for 10 minutes .
5.	Centrifuge for 5 minutes at 10000 g .

To **275 µl** of this extract a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

Dried blood spots

Collection and storage of dried blood spots

50 µl whole blood dripped on a dried sample carrier cleared by Immundiagnostik AG are suitable as sample material after complete drying. We recommend DrySpot-ID (catalogue no. DZ9020ID or DZ9021ID) as dried blood spot carrier. The moistened cards are stable for 7 days at room temperature. For longer storage, store at -20°C in a dry place.

Extraction

1.	Remove filter from sampling device and put it in a labelled 1.5 ml polypropylene tube.
2.	Add 1 ml reaction buffer (REABUF) to each sample and mix well.
3.	Heat the samples for 10 minutes at 90°C .
4.	Then let cool for 10 minutes .
5.	Centrifuge for 5 minutes at 10000 g .

To **275 µl** of this extract 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 heparinised whole blood and dried blood spots. 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 extracted 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 25 µl standard (STD)/ control (CTRL) into the respective vials, or into the wells of the COPLATE. Add 275 µl extracted sample into the respective vials, or into the wells of the COPLATE.
2.	Add 250 µl reaction buffer (REABUF) only to the standards and controls in the vials or the wells of the COPLATE.
3.	Add 50 µl derivatisation reagent into each vial (STD, CTRL, sample) and mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for 30 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker . <i>Alternatively:</i> Add 50 µl derivatisation reagent into each well (STD, CTRL, sample) of the COPLATE and incubate immediately on a horizontal shaker for 30 min 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 2 x 50 µl of the derivatised standards/controls/samples out of the vials, or the COPLATE, and add into the respective wells of the microtiter plate.
5.	Add 50 µl histamine antibody (AB) into each well of the microtiter plate.
6.	Cover the strips tightly with foil and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 12-18 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm 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 405 nm 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 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 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.

Whole blood and dried blood spots

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 1.91** to get the actual concentrations.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range cannot be diluted.

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 ≤ 129 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 in-house studies with whole blood and dried blood samples of apparently healthy persons (n = 38), a median of 39 ng/ml was determined for whole blood, the 10th and 90th percentile were 26 and 63 ng/ml, respectively. For dried blood, a median of 46 ng/ml was determined, the 10th and 90th percentile were 29 and 72 ng/ml, respectively. This results in the following normal ranges:

Histamine concentration in whole blood: 26 – 63 ng/ml

Histamine concentration in dried blood spots: 29 – 72 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Repeatability (Intra-Assay); n = 12

The repeatability was assessed with 4 samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot) in single determinations.

Whole blood

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	30.3	9.1
2	52.6	8.8
3	74.6	9.4
4	87.4	5.4

Dried blood spot

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	37.2	7.1
2	51.2	8.0
3	65.0	7.9
4	93.7	9.7

Reproducibility (Inter-Assay); n = 12

The reproducibility was assessed with 6 samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots) in duplicate determinations.

Whole blood

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	26.8	12.4
2	31.7	13.9
3	42.4	9.5
4	59.9	7.4
5	83.8	7.9
6	173.1	11.3

Dried blood spot

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	27.9	16.8
2	34.4	8.5
3	48.1	7.6
4	56.2	12.0
5	94.2	7.5
6	176.6	11.6

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, histamine spikes with known concentrations were added to 3 different samples.

Whole blood

sample [ng/ml]	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
30.9	16.9	47.8	47.0	98.2
	36.9	67.8	69.0	101.6
	56.9	87.8	90.3	102.8
32.9	18.6	49.6	47.4	95.6
	38.6	69.6	66.1	95.0
	58.6	89.6	109.3	122.0
30.0	16.0	47.0	42.6	90.6
	36.0	67.0	62.3	93.0
	56.0	87.0	91.7	105.4

Dried blood spot

sample [ng/ml]	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
27.4	17.3	44.6	40.9	91.6
	37.3	64.6	59.3	91.7
	57.3	84.6	98.3	116.2
28.4	18.2	45.6	44.2	96.9
	38.2	65.6	54.8	83.6
	58.2	85.6	85.3	99.7
30.0	19.7	47.0	46.0	97.7
	39.7	67.0	56.9	84.9
	59.7	87.0	94.6	108.6

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed with a serial dilution of 4 heparinised whole blood samples with a Li-heparin plasma sample containing 2.39 ng/ml histamine.

For histamine in heparinised whole blood, the method has been demonstrated to be linear from 11.9 to 118.0 ng/ml with a recovery rate of 82.8 to 113.4 %.

For histamine in dried blood spots, the method has been demonstrated to be linear from 14.2 to 121.6 ng/ml with a recovery rate of 79.7 to 106.4 %.

Whole blood

sample [ng/ml]	dilution	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
40.6	1:1.5	27.9	23.7	85.2
	1:2	21.5	18.2	84.9
	1:2.5	17.7	14.6	82.9
	1:3	15.1	12.5	82.8
	1:4	11.9	12.4	103.9
56.2	1:1.5	38.3	37.4	97.8
	1:2	29.3	30.2	103.1
	1:2.5	23.9	26.5	110.9
	1:3	20.3	21.3	104.8
	1:4	15.9	15.0	94.8
98.9	1:1.5	66.7	59.2	88.8
	1:2	50.6	44.0	86.9
	1:2.5	41.0	35.4	86.3
	1:3	34.5	33.4	96.6
	1:4	26.5	27.7	104.5
118.0	1:1.5	79.5	82.4	103.7
	1:2	60.2	58.9	97.9
	1:2.5	48.6	50.0	102.9
	1:3	40.9	42.0	102.7
	1:4	31.3	35.5	113.4

Dried blood spot

sample [ng/ml]	dilution	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
39.9	1:1.5	27.4	24.7	90.1
	1:2	21.2	19.2	90.8
	1:2.5	17.4	15.5	89.0
	1:3	14.9	13.5	90.7
	1:4	11.8	8.9	75.8
49.7	1:1.5	33.9	33.3	98.1
	1:2	26.0	27.3	104.7
	1:2.5	21.3	21.2	99.5
	1:3	18.2	19.3	106.4
	1:4	14.2	13.3	93.9

78.9	1:1.5	53.4	51.7	96.7
	1:2	40.7	44.1	108.4
	1:2.5	33.0	26.3	79.7
	1:3	27.9	23.2	83.1
	1:4	21.5	22.0	102.0
121.6	1:1.5	81.9	68.0	83.1
	1:2	62.0	50.3	81.1
	1:2.5	50.1	40.7	81.4
	1:3	42.1	34.3	81.5
	1:4	32.2	28.9	89.8

Analytical sensitivity

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

Whole blood

The zero-standard was measured 40 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 SD$ and estimated to be 1.18 ng/ml.

Dried blood spot

The zero-standard was extracted from a dried sample carrier and measured 40 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 SD$ and estimated to be 2.01 ng/ml.

Analytical 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.
- 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. Chen Q, Shao L, Li Y, Dai M, Liu H, Xiang N, Chen H. Tanshinone IIA alleviates ovalbumin-induced allergic rhinitis symptoms by inhibiting Th2 cytokine production and mast cell histamine release in mice. *Pharm Biol.* 2022 Dec;60(1):326-333. doi: 10.1080/13880209.2022.2034894. PMID: 35167426; PMCID: PMC8856108.
2. Coulson J, Thompson JP. Paracetamol (acetaminophen) attenuates in vitro mast cell and peripheral blood mononucleocyte cell histamine release induced by N-acetylcysteine. *Clin Toxicol (Phila).* 2010 Feb;48(2):111-4. doi: 10.3109/15563650903520959. PMID: 20136478.
3. Demoly P, Lebel B, Messaad D, Sahla H, Rongier M, Daurès JP, Godard P, Bousquet J. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy.* 1999 May;54(5):500-6. doi: 10.1034/j.1398-9995.1999.00020.x. PMID: 10380783.
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. Matsumoto J, Matsuda H. Mast-cell-dependent histamine release after praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: implications for chemotherapy-related adverse effects. *Parasitol Res.* 2002 Oct;88(10):888-93. doi: 10.1007/s00436-002-0677-5. Epub 2002 Jun 14. PMID: 12209328.
6. Serrier J, Khoj K, Petit G, Parienti JJ, Laroche D, Mariotte D, Le Mauff B. Mediators of anaphylactic reactions: Tryptase and histamine stability in whole blood. *Allergy.* 2021 May;76(5):1579-1583. doi: 10.1111/all.14663. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33202058.

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