

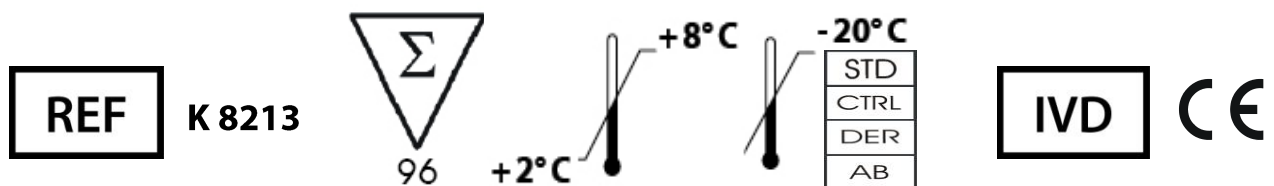
# Histamin ELISA Kit

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

# Histamine ELISA Kit

*For the in vitro determination histamine in stool*

Gültig ab / Valid from 2015-03-03



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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

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

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>	<b>4</b>
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	6
<i>Lagerung der Proben</i>	6
<b>6. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	7
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	8
<b>7. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>8. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>9. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
<i>Referenzwerte</i>	10
<b>10. 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>11. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>12</b>
<b>12. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>13</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von von Histamin in Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 8213MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 8213KP	COPLATE	Kopplungsplatte	12 x 8 Vertiefungen
K 8213ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml
K 8213KO1 K 8213KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 2 ml
K 8213WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8213EP	EXBUF	Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 75 ml
K 8213AB	AB	Histamin-Antikörper, Peroxidase- markiert, lyophilisiert	6 x 1 Fläschchen
K 8213VR	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 11 ml
K 8213RP	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8213DR	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	4 x 1 Fläschchen
K 8213LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 10 ml
K 8213TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8213AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

### 3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

\* 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).

### 4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEIN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 4 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** werden eingefroren bei **-20°C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Standards und Kontrollen können bis zu 3 x

wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.

- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.
- Das **Derivatisierungsreagenz (DER)** wird bei **-20°C** gelagert. 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, 10 min stehen lassen und zwischendurch vortexen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des DER in 4 Gefäße ist der ELISA in 4 Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der Peroxidase-markierte **Histamin-Antikörper (AB)** wird bei **-20°C** gelagert und vor Gebrauch mit **1,5 ml Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** rekonstituiert. Der Antikörperverdünnungspuffer muss dazu auf **Raumtemperatur** gebracht werden. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist der Rest zu verwerfen. Durch die Aufteilung des AB in 6 Gefäße ist der ELISA in mehrere Ansätze teilbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### *Stuhlprobenextraktion*

Der Extraktionspuffer (EXBUF) ist gebrauchsfertig. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

**Stuhlaufbereitungssystem (SAS)** (Artikel-Nr. K 6998SAS)

#### ***Stuhlröhrchen - Anwendung***

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

**SAS mit 1,5 ml Puffer:**

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen (EXBUF):	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS 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) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** Extraktionspuffer (EXBUF) **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
- c) 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.
- d) Das Röhrchen solange mischen 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.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen mindestens 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkisfarbener 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:            1:100**

### *Probenverdünnung*

Der Überstand aus der Probenextraktion (Verdünnung I) wird **1:2** mit Extraktionspuffer (EXBUF) weiter verdünnt. Zum Beispiel:

**100 µl Überstand** (Verdünnung I) + **100 µl EXBUF**, mischen  
= **1:2 (Verdünnung II)**

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

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **25 µl der Verdünnung II** (SAMPLE) mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Histamin versetzt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

### *Lagerung der Proben*

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

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

## **6. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *Testprinzip*

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Histamins versetzt. Anschließend wird in einer mit Histamin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte die derivatisierte Probe zusammen mit einem Peroxidase-markierten 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. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

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 Probenvorbereitung*

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der verdünnten Stuhlproben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in den Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) durchgeführt.

Alternativ dazu kann die Derivatisierung auch in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen) durchgeführt werden.

Wir empfehlen 48 Derivatisierungen durchzuführen, welche jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufgetragen werden.

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

2. Je **25 µl Standard (STD), 25 µl Kontrolle (CTRL)** bzw. **25 µl Probe aus Verdünnung II (SAMPLE)** in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) bzw. in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.

3. **250 µl Reaktionspuffer (REABUF)** in alle Vertiefungen (STD, CTRL, SAMPLE) der COPLATE bzw. in alle Reaktionsgefäße pipettieren.

4. **50 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Vertiefungen (STD, CTRL, SAMPLE) der COPLATE pipettieren und sofort auf einem **Horizontalschüttler** (180-240 rpm) **30 min bei Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.

*Alternativ dazu:* **50 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren und **gründlich mischen**, z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem **Horizontalschüttler** (180-240 rpm) **30 min bei Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.

**2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.



### Pipettierschema Testdurchführung

5.	Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung in einem <b>Protokollblatt</b> markieren.
6.	Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden. Bitte beachten: <b>Platte nicht waschen</b> .
7.	<b>2 x 50 µl der vorbereiteten, derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
8.	<b>50 µl Histamin-Antikörper (AB)</b> in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.
9.	Platte mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15-30°C) auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) inkubieren.
10.	Inhalt der Platte verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	<b>100 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	<b>12-18 min</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (15-30°C) im Dunkeln inkubieren.*
13.	<b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
14.	<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. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

## 7. 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.

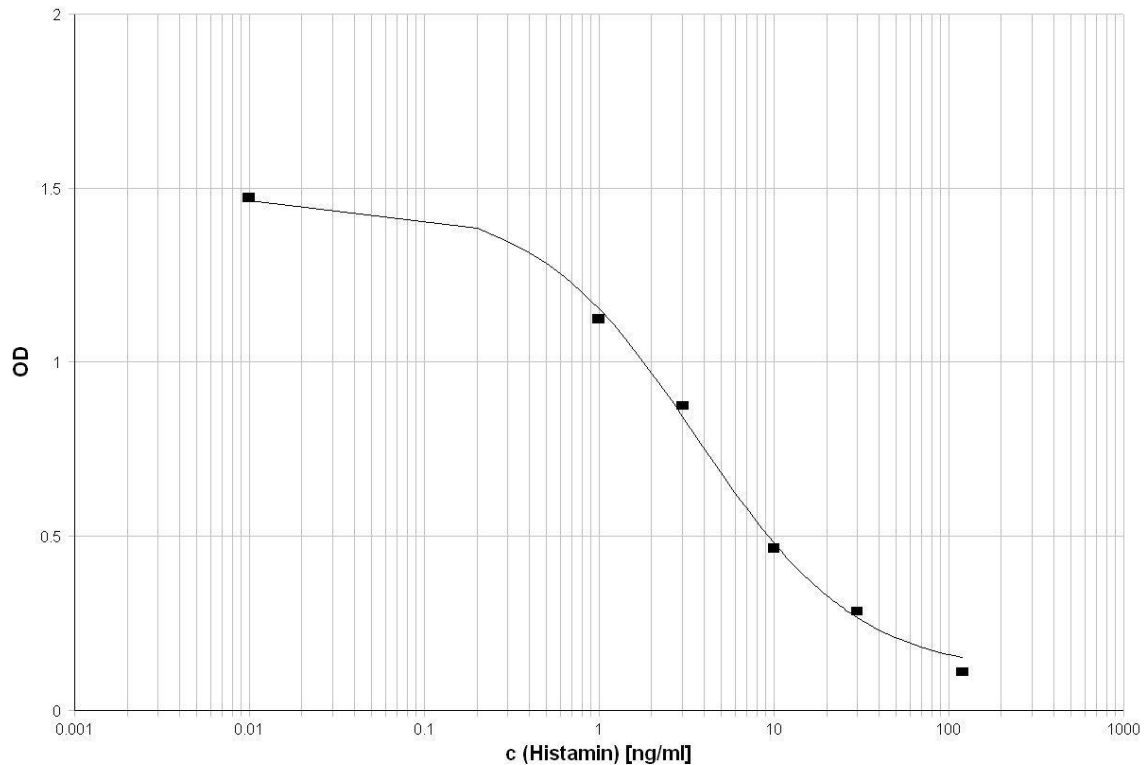
### Stuhlproben

Die ermittelten Histamin-Konzentrationen werden mit dem **Faktor 200** multipliziert (1 ng/ml entspricht 1 ng/g Stuhl).

Sollte ein anderer Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

## Musterkalibrierkurve



## 8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD niedriger ist als die des höchsten Standards, sollten mit Extraktionspuffer (EXBUF) stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

## 9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### *Referenzwerte*

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n=36$ ) wurde ein **Median** von **455 ng/ml** ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay (n=16)**

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	355	8,4
2	1234	7,3

#### **Inter-Assay (n=6)**

Probe	Histamin [ng/ml]	VK [%]
1	225	10,3
2	1012	5,7
3	2369	6,8

### *Spike-Wiederfindung*

Eine Stuhlprobe wurde mit unterschiedlichen Histamin-Mengen versetzt (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 94,8 % (n=9).

Spike [ng/ml]	Histamin erwartet [ng/ml]	Histamin gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
0		262	
300	562	484	86,1
2400	2662	2755	103,5

### *Wiederfindung in der Verdünnung*

Eine mit Histamin gespikete Stuhlprobe wurde verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 87,6 % (n=9).

Verdünnung	Histamin erwartet [ng/ml]	Histamin gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
original		901	
1:2	450	374	83,1
1:4	225	207	92,1

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 75 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,11 ng/ml. Bei Berücksichtigung der Stuhlprobenverdünnung ergibt sich eine Nachweisgrenze von 22 ng/ml (22 ng/g Stuhl).

Probe	Mittelwert [OD]	2 Standardabweichungen (2 x SD)	Nachweisgrenze Histamin (Stuhl) [ng/ml]
Standard Null	1,991	0,19	$0,11 \times 200 = 22$

### Spezifität

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

3-Methyl-Histamin	< 0,1 %
Tyramin	< 0,001%
L-Phenylalanin	< 0,0002%
L-Histidin	< 0,0002%
L-Tyrosin	< 0,0002%
Tryptamin	< 0,0002%
5-Hydroxy-Indol-Essigsäure	< 0,0002%
Serotonin	< 0,0002%

## 11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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.

## 12. 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 Mindesthaltbarkeitsdatums 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 im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 13. 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 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.

**Verwendete Symbole:**

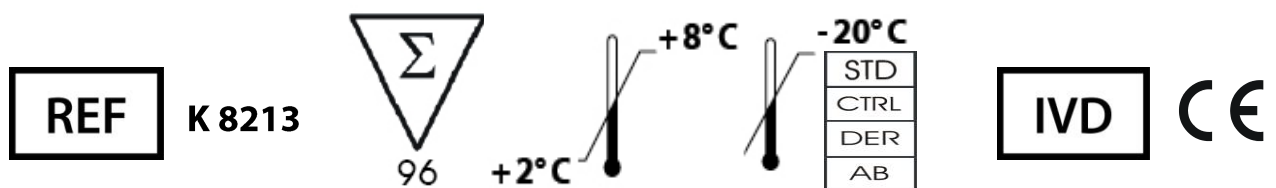
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

Manual

# Histamine ELISA Kit

*For the in vitro determination of histamine in stool*

Gültig ab / Valid from 2015-03-03



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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

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

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



## Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES</b>	<b>19</b>
<i>Extraction of the stool sample</i>	19
<i>Dilution of samples</i>	20
<i>Storage of samples</i>	20
<b>6. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>21</b>
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Sample preparation procedure</i>	21
<i>Test procedure</i>	22
<b>7. RESULTS</b>	<b>23</b>
<b>8. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>9. QUALITY CONTROL</b>	<b>25</b>
<i>Reference range</i>	25
<b>10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Spiking recovery</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	26
<i>Analytical sensitivity</i>	26
<i>Specificity</i>	27
<b>11. PRECAUTIONS</b>	<b>27</b>
<b>12. TECHNICAL HINTS</b>	<b>27</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>28</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of histamine in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 8213MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8213KP	COPLATE	Plate for Derivatization	12 x 8 wells
K 8213ST	STD	Standards, ready to use (0; 1; 3; 10; 30; 120 ng/ml)	6 x 2 ml
K 8213KO1 K 8213KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready to use (see specification for range)	2 x 2 ml
K 8213WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 8213EP	EXBUF	Extraction buffer, ready to use	2 x 75 ml
K 8213AB	AB	Histamine antibody, peroxidase-labeled, lyophilized	6 x 1 vial
K 8213VR	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready to use	1 x 11 ml
K 8213RP	REABUF	Reaction buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 8213DR	DER	Derivatization reagent, lyophilized	4 x 1 vial
K 8213LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 10 ml
K 8213TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 8213AC	STOP	ELISA 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.

## 3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*

- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 *g*
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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).

#### 4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The buffer concentrate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- Store **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20°C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Store the **derivatization reagent (DER)** at **-20°C**. Bring to room temperature before opening. Dissolve the content of one vial in **DMSO** as stated on the label. Allow the content of the vial to dissolve for 10 min and mix thoroughly

with a vortex-mixer. DER must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into 4 performances by providing 4 DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- Store the peroxidase conjugated **histamine antibody (AB)** at **-20°C**. Reconstitute with **1.5 ml of antibody dilution buffer (ABBUF)**. Allow the antibody dilution buffer to reach **room temperature** before use. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest after use. The ELISA kit can be separated into several performances by providing 6 AB vials.
- All other test reagents are ready for use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

### *Extraction of the stool sample*

The extraction buffer (EXBUF) is ready to use. We recommend the following sample preparation:

#### **Stool Sample Application System (SAS)** (Cat. No. K 6998SAS)

##### ***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:

##### ***SAS with 1.5 ml buffer:***

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer volume (EXBUF):	1.5 ml
Dilution factor:	1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS 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) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of extraction buffer (EXBUF) before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick exhibits 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.
- d) Shake 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.
- e) 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 turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution I:            1:100**

### *Dilution of samples*

Dilute the supernatant of the sample extraction (dilution I) **1:2** with extraction buffer (EXBUF). For example:

**100 µl supernatant** (dilution I) + **100 µl EXBUF**, mix well  
= **1:2 (dilution II)**

This results in a final dilution of **1:200**.

To **25 µl of dilution II** (SAMPLE) a derivatization reagent (DER) is added for derivatization of histamine (details are given in the sample preparation procedure).

### *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 2 days at room temperature. For longer storage keep frozen at -20 °C.

## 6. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for histamine derivatization. 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 immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. Therefore, the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the histamine concentration in the sample.

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 color changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color 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 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.

### *Sample preparation procedure*

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and diluted stool samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in the wells of the COPLATE.

Alternatively, reaction vials (e.g. 1.5 ml vials) can be used.

We recommend carrying out 48 derivatizations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plate.

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

2. Add **25 µl of standards (STD), 25 µl of controls (CTRL) and 25 µl of samples from dilution II (SAMPLE)** in the wells of the COPLATE or in the corresponding vials.
3. Add **250 µl of reaction buffer (REABUF)** into each well (STD, CTRL, SAMPLE) of the COPLATE or into each vial.
4. Add **50 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each well (STD, CTRL, SAMPLE) of the COPLATE and incubate immediately on a **horizontal shaker** (180-240 rpm) **for 30 min at room temperature** (15-30°C).  
*Alternatively:* Add **50 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE), **mix thoroughly** by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer and incubate for **30 min at room temperature** (15-30°C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).

**2 x 50 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE)** are used in the ELISA as duplicates.

### *Test procedure*

5. Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/samples (SAMPLE) in duplicate on a **protocol sheet**.
6. Take as many microtiter plate strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.  
Please note: **Do not wash the plate**.
7. For the analysis in duplicate take **2 x 50 µl** of the **derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)** out of the COPLATE or vials and add into the respective wells of the microtiter plate (PLATE).
8. Add **50 µl of histamine antibody (AB)** into each well of the microtiter plate.
9. Cover the plate tightly with foil and incubate for **1 hour at room temperature** (15-30°C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).

10. Discard the contents of each well and wash **5 times** with **250 µl of diluted wash buffer**. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
11. Add **100 µl** of **TMB substrate (SUB)** into each well.
12. Incubate for **12-18 min** at **room temperature** (15-30°C) in the dark\*.
13. Add **100 µl** of **stop solution (STOP)** into each well, mix thoroughly.
14. 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 color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color 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. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 7. 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 automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

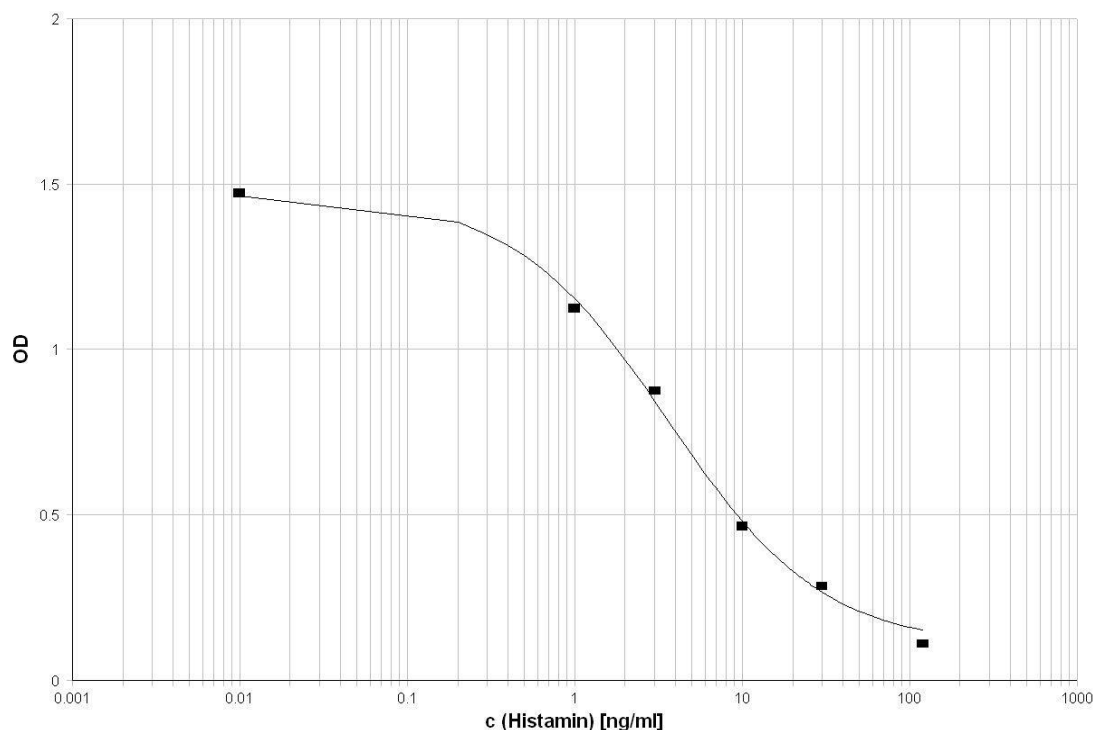
### Stool samples

The obtained histamine levels of the stool samples have to be multiplied by the dilution factor of **200** (1 ng/ml = 1 ng/g stool).

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

In the following, an example of a calibration curve is given; do not use it for the calculation of your results.

### Example of calibration curve



## 8. LIMITATIONS

Samples with an OD lower than the OD of the highest standard should be further diluted with extraction buffer (EXBUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

## 9. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

### *Reference range*

Based on internal studies with stool samples of apparently healthy persons (n=36) a **median of 455 ng/ml** was calculated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra assay (n=16)**

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	355	8.4
2	1234	7.3

#### **Inter assay (n=6)**

sample	histamine [ng/ml]	CV [%]
1	225	10.3
2	1012	5.7
3	2369	6.8

### *Spiking recovery*

One sample was spiked with different histamine concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 94.8 % (n=9).

spike [ng/ml]	histamine expected [ng/ml]	histamine measured [ng/ml]	recovery [%]
0		262	
300	562	484	86.1
2400	2662	2755	103.5

### *Dilution recovery*

One spiked sample was diluted and measured in this assay. The mean recovery rate was 87.6 % (n=9).

dilution	histamine expected [ng/ml]	histamine measured [ng/ml]	recovery [%]
original		901	
1:2	450	374	83,1
1:4	225	207	92,1

### *Analytical sensitivity*

The zero-standard was measured 75 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 \text{ SD}$  and estimated to be 0,11 ng/ml. Considering the dilution factor, the detection limit is calculated to be 22 ng/ml (22 ng/g stool).

sample	mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	detection limit histamine (stool) [ng/ml]
zero-standard	1.991	0.19	$0.11 \times 200 = 22$

## Specificity

Specificity was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to histamine. The specificity is calculated in percent in relation to the histamine binding activity.

3-methyl-histamine	< 0,1 %
tyramine	<0,001%
L-phenylalanine	<0,0002%
L-histidine	<0,0002%
L-tyrosine	<0,0002%
tryptamine	<0,0002%
5-hydroxy-Indole-acetic acid	<0,0002%
serotonine	<0,0002%

## 11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.

## 12. 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 analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.

### 13. 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.

#### **Used symbols:**

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by