



**Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG**

Am Eichenhain 1, 48531 Nordhorn

Telefon: +49-5921-8197 0

Telefax: +49-5921-8197 222

e-mail: [info@ldn.de](mailto:info@ldn.de)

Internet: <http://www.ldn.de>

**LDN<sup>®</sup>**

---

## Instructions for use

# Histamine Stool ELISA

**REF**

**BA E-1200**



**IVD**





## Histamine Stool ELISA

### 1. **Intended use and principle of the test**

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Histamine in stool.

Histamine is quantitatively acylated.

The competitive ELISA kit uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. Analyte concentrations of acylated standards, controls and samples and solid phase bound analyte concentrations compete for a fixed number of antiserum binding sites. When the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antiserum complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standards.

### 2. **Advice on handling the test**

#### 2.1 **Reliability of the test results**

In order to assure a reliable evaluation of the test results it must be conducted according to the instructions included and in accordance with current rules and guidelines (GLP, RILIBÄK, etc.). Special attention must be paid to control checks for precision and correctness during the test; the results of these control checks have to be within the norm range. In case of significant discrepancies between the pre-set assay characteristics of this test and the actual results please contact the manufacturer of the test kit for further instructions.

It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals. The values reported in this test instruction are only indicative.

The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

#### 2.2 **Complaints**

In case of complaints please submit to the manufacturer a written report containing all data as to how the test was conducted, the results received and a copy of the original test printout. Please contact the manufacturer to obtain a reclamation form and return it completely filled in to the manufacturer.

#### 2.3 **Warranty**

This test kit was produced according to the latest developments in technology and subjected to stringent internal and external quality control checks. Any alteration of the test kit or the test procedure as well as the usage of reagents from different charges may have a negative influence on the test results and are therefore not covered by warranty. The manufacturer is not liable for damages incurred in transit.

#### 2.4 **Disposal**

Residual substances and/or all remaining chemicals, reagents and ready for use solutions, are special refuse. The disposal is subject to the laws and regulations of the federation and the countries. About the removal of special refuse the responsible authorities or refuse disposal enterprises inform. The disposal of the kit must be made according to the national official regulations. Legal basis for the disposal of special refuse is the cycle economic- and waste law.

The appropriate safety data sheets of the individual products are available on the homepage. The safety data sheets correspond to the standard: ISO 11014-1.

#### 2.5 **Interference**

Do not mix reagents and solutions from different lots. Consider different transport and storage conditions. Inappropriate handling of test samples or deviations from the test regulation can the results affect. Use no kit components beyond the expiration date. Avoid microbiological contamination of the reagents and the washing water. Consider incubation periods and wash references.

#### 2.6 **Precautions**

Observe the incubation periods and washing instructions. Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin. No smoking, eating or drinking in areas where samples or kit test tubes are handled. When working with kit components or samples, always wear protective gloves and wash your hand thoroughly as soon as you have finished the work. Avoid spraying of any kind. Avoid any skin contact with reagents. Use protective clothing and disposable gloves. All steps have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes. Sodium azide could react with lead and copper tubes and may form highly explosive metal azide. When clearing up, rinse thoroughly with large volumes of water to prevent such formation.

All reagents of this testkit which contain human or animal serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HbsAg and HCV by FDA approved procedures.

All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

### 3. Storage and stability

Store the reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiration date shown on the kit labels. Do not mix various lots of any kit component within an individual assay.

#### 4.1 Contents of the kit

|                  |                      |                                    |              |                                                                           |
|------------------|----------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>BA D-0024</b> | <b>REAC-PLATE</b>    | <b>Reaction Plate</b>              | 1 x 96 wells | ready for use                                                             |
| <b>BA E-0030</b> | <b>WASH-CONC 50x</b> | <b>Wash buffer Concentrate</b>     | 1 x 20 mL    | concentrate, dilute content with dist. water to a final volume of 1000 mL |
| <b>BA E-0055</b> | <b>SUBSTRATE</b>     | <b>Substrate</b>                   | 1 x 12 mL    | ready for use, containing a solution of tetramethylbenzidine (TMB)        |
| <b>BA E-0080</b> | <b>STOP-SOLN</b>     | <b>Stop Solution</b>               | 1 x 12 mL    | ready for use, containing 0.25 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .         |
| <b>BA E-1031</b> | <b>HIS</b>           | <b>Histamine Microtiter Strips</b> | 1 x 96 wells | 12 strips, 8 wells each, break apart, precoated                           |
| <b>BA E-1001</b> | <b>STANDARD A</b>    | <b>Standard A</b>                  | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1002</b> | <b>STANDARD B</b>    | <b>Standard B</b>                  | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1003</b> | <b>STANDARD C</b>    | <b>Standard C</b>                  | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1001</b> | <b>STANDARD D</b>    | <b>Standard D</b>                  | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1005</b> | <b>STANDARD E</b>    | <b>Standard E</b>                  | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1006</b> | <b>STANDARD F</b>    | <b>Standard F</b>                  | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1051</b> | <b>CONTROL 1</b>     | <b>Control 1</b>                   | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1052</b> | <b>CONTROL 2</b>     | <b>Control 2</b>                   | 1 x 4 mL     | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1210</b> | <b>HIS-AS</b>        | <b>Histamine Antiserum</b>         | 1 x 12 mL    | from goat, ready for use                                                  |
| <b>BA E-1211</b> | <b>ACYL-BUFF</b>     | <b>Acylation Buffer</b>            | 2 x 12 mL    | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1212</b> | <b>ACYL-REAG</b>     | <b>Acylation Reagent</b>           | 2 x 1,5 ml   | ready for use                                                             |
| <b>BA E-1240</b> | <b>CONJUGATE</b>     | <b>Enzyme Conjugate</b>            | 1 x 12 ml    | ready for use, anti-goat IgG conjugated with peroxidase                   |

#### 4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated variable precision micropipettes (e.g. 10-100 µL / 100-1,000µL)
- Microtiter plate washing device
- sample tubes with a volume > 5ml
- Eppendorf-tube or similar centrifugation device
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm
- Centrifuge capable of at least 3.000 x g
- Shaker (shaking amplitude 3mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Distilled water
- Vortex mixer

### 5. Sample collection and storage

#### **Stool**

- △ For the collection of stool samples a special Stool- Collection Device is mandatory (REF **BA D-1241**). We prefer to use a complete Stool- Collection- Set (REF **BA D-1200**) Please ask the manufacture for the device or set. Stabilized samples can be stored one week at **RT** (20-25°C) or up to 6 months at 2 – 8 °C.

## 6. Test procedure

Allow reagents and samples to reach room temperature.  
Duplicate measurements are recommended.

### 6.1 Preparation of reagents

#### Wash Buffer

Dilute the 20 mL Wash Buffer Concentrate with distilled water to a final volume of 1000 mL.  
Storage: up to 6 months 2–8°C.

#### Acylation Reagent

The Acylation Reagent has a freezing point of 18.5°C. To ensure that the Acylation Reagent is liquid when being used, it must be ensured that the Acylation Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution before being used. Alternatively the Acylation Reagent can be stored at room temperature (20 – 25°C) separate from the other kit components.

### 6.2 Preparation and acylation

|                                                                                                                   |                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.                                                                                                                | Pipette <b>100 µL of standards, 100 µL of controls</b> and <b>samples</b> (from Stool- Collection Device*) into the respective wells of the <b>Reaction Plate</b> . |
| 2.                                                                                                                | Add <b>25 µL of Acylation Reagent</b> (refer to 6.1) to all wells.                                                                                                  |
| 3.                                                                                                                | Pipette <b>200 µL of Acylation Buffer</b> into all wells.                                                                                                           |
| 4.                                                                                                                | Shake <b>Reaction Plate</b> shortly by hand and incubate <b>15 min at RT</b> (20-25°C).                                                                             |
|  <b>Take 25 µL for the ELISA</b> |                                                                                                                                                                     |

\* The Stool Collection Device has a capacity of 10 mg of stool. It contains 3 ml of Stabilizing Buffer. Therefore, the overall dilution of a stool sample is approximately 1: 300. Assay data must be corrected accordingly (see Chapter 7.)

### 6.3 Histamine ELISA

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.  | Pipette <b>25 µL</b> of the <b>acylated standards, controls and samples</b> into the wells of the <b>Histamine Microtiter Strips</b> .                                                                                                                                                        |
| 2.  | Pipette <b>100 µL</b> of the <b>Histamine Antiserum</b> into all wells.                                                                                                                                                                                                                       |
| 3.  | Incubate <b>30 min at RT</b> (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).<br><b>Alternatively without shaking, shake Histamine Microtiter Strips shortly by hand and incubate for 40 min at RT</b> (20-25°C).                                                                                     |
| 4.  | Discard or aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> each well <b>3 times</b> thoroughly with <b>300 µL Washbuffer</b> . Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.                                                                                               |
| 5.  | Pipette <b>100 µL</b> of the <b>Enzyme Conjugate</b> into all wells.                                                                                                                                                                                                                          |
| 6.  | Incubate for <b>10 min at RT</b> (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).<br><b>Alternatively without shaking, incubate for 20 min at RT</b> (20-25°C).                                                                                                                                       |
| 7.  | Discard or aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> each well <b>3 times</b> thoroughly with <b>300 µL Washbuffer</b> . Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.                                                                                               |
| 8.  | Pipette <b>100 µL</b> of the <b>Substrate</b> into all wells.                                                                                                                                                                                                                                 |
| 9.  | Incubate for <b>15 ± 2 min at RT</b> (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).<br> <b>Alternatively without shaking, incubate for 15 ± 2 at RT</b> (20-25°C).<br><b>Avoid exposure to direct sun light!</b> |
| 10. | Add <b>100 µL</b> of the <b>Stop Solution</b> to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.                                                                                                                                               |
| 11. | <b>Read</b> the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to <b>450 nm</b> and a reference wavelength between 620 nm and 650 nm.                                                                                                               |

## 7. Calculation of results

| Standard                                                                          | Concentration of the standards                                                                         |     |     |       |       |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-------|-------|--------|
|                                                                                   | A                                                                                                      | B   | C   | D     | E     | F      |
| Histamin (ng/ml)*                                                                 | 0                                                                                                      | 0.5 | 1.5 | 5     | 15    | 50     |
| *Histamine stool samples 1:300<br>(after multiplication $\Rightarrow$ ng/g stool) | 0                                                                                                      | 150 | 500 | 1 500 | 5 000 | 15 000 |
| Conversion:                                                                       | Histamine (ng/mL) $\times$ 9 = Histamine (nmol/L)<br>Histamine (ng/g) $\times$ 9 = Histamine (nmol/kg) |     |     |       |       |        |

The calibration curve from which the concentrations in the samples can be taken is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) measured for the standards (linear, y-axis) against the corresponding concentrations (logarithmic, x-axis).  
Use non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

**Controls:** The concentrations of the **Controls 1 & 2** can be read directly from the standard curve.

**Stool samples:** The read concentrations of the **stool samples** have to be **multiplied by 300**.

### 7.1 Quality control

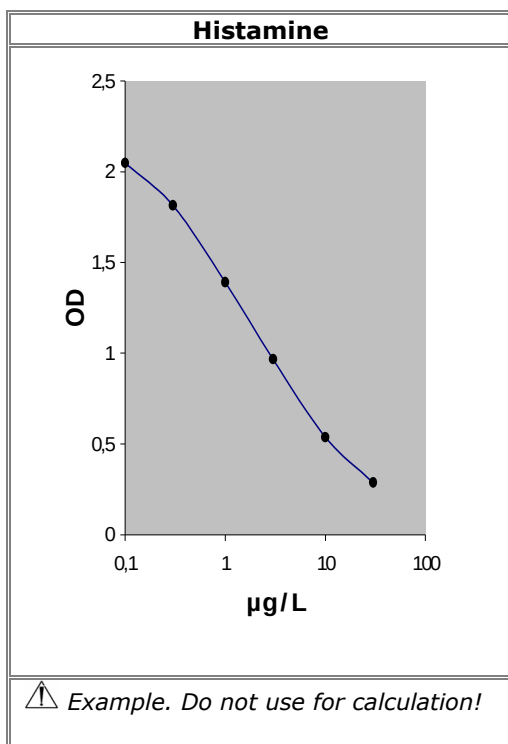
It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit, or other commercially available, controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are printed on the QC-Report.

### 7.2 Calibration

The binding of the antisera and the enzyme conjugates and the activity of the enzyme used are temperature dependent, and the extinction values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the extinction values will be. Corresponding variations also apply to the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20-25°C.

 In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm

### 7.3 Typical calibration curve



## 8. Assay characteristics

| Expected Values                              | Reference                    | Histamine |                               |                                   |           |
|----------------------------------------------|------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|
|                                              |                              | Stool     | < 600 ng/g                    |                                   |           |
| Analytical Specificity<br>(Cross Reactivity) | Substance                    |           | Cross Reactivity (%)          |                                   | Histamine |
|                                              | Histamine                    |           | 100                           |                                   |           |
|                                              | 3-Methyl-Histamine           |           | 0.1                           |                                   |           |
|                                              | Tyramine                     |           | 0.01                          |                                   |           |
|                                              | L-Phenylalanine              |           | < 0.001                       |                                   |           |
|                                              | L-Histidine                  |           | < 0.001                       |                                   |           |
|                                              | L-Tyrosine                   |           | < 0.001                       |                                   |           |
|                                              | Tryptamine                   |           | < 0.001                       |                                   |           |
|                                              | 5-Hydroxy-Indole-Acetic Acid |           | < 0.001                       |                                   |           |
| Serotonin                                    |                              | < 0.001   |                               |                                   |           |
| Analytical Sensitivity (Limit of Detection)  |                              | Histamine | 75 ng/g                       | Mean signal (Zero-Standard) - 2SD |           |
| Precision                                    |                              |           |                               |                                   |           |
| Inter-Assay Variation, n = 13                |                              |           | Intra-Assay Variation, n = 39 |                                   |           |
| Sample                                       | Mean ± SD (ng/g)             | CV (%)    | Sample                        | Mean ± SD (ng/g)                  | CV (%)    |
| 1                                            | 868 ± 69                     | 8         | 1                             | 610 ± 73                          | 12        |
| 2                                            | 2 877 ± 161                  | 5.6       | 2                             | 4 690 ± 310                       | 6.6       |
| Linearity                                    |                              |           | Range (ng/g)                  | Range (%)                         | Mean (%)  |
|                                              |                              | Histamine | 5170- 45                      | 85 - 106                          | 100       |
| Recovery                                     |                              |           | Serial dilution up to         | Range (%)                         | Mean (%)  |
|                                              |                              | Histamine | 1:16                          | 92 - 120                          | 103       |

 **For current literature, information about clinical significance or any other information about the test are available on the homepage or contact the manufacturer directly.**

### Symbols:

|                                                                                     |                              |                                                                                     |                  |                                                                                       |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|  | Storage temperature          |  | Manufacturer     |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Expiry date                  | <b>LOT</b>                                                                          | Batch code       | <b>IVD</b>                                                                            | For in-vitro diagnostic use only! |
|  | Consult instructions for use | <b>CONT</b>                                                                         | Content          | <b>CE</b>                                                                             | CE labelled                       |
|  | Caution                      | <b>REF</b>                                                                          | Catalogue number | <b>RUO</b>                                                                            | For research use only!            |



## Histamine Stool ELISA

(Histamin im Stuhl)

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Stuhlproben

### 1. Einleitung

Histamin wurde erstmals 1910 als endogene Substanz pharmakologisch beschrieben. Als biogenes Amin wird es aus der Aminosäure Histidin synthetisiert. Es ist ein wichtiger Mediator vieler biologischer Reaktionen im Körper, bekannt als Vermittler allergischer und pseudoallergischer Reaktionen.

Histamin wird im Körper durch zwei verschiedene Wege metabolisiert. Ein direkter Gegenspieler des Histamins ist das sekretorische Enzym Diaminoxidase (DAO). Ein zweiter intrazellulärer Weg der Regulation läuft über das Enzym Histamin-N-Methyltransferase (HNMT). Beide Systeme ergänzen sich, da die DAO mehr für die Regulation extrazellulär angefallenen Histamins ( z.B.: im Darm) zuständig ist und die HNMT für die intrazelluläre Regulation im Zytosol zuständig ist.

Durch verschiedene Faktoren kann im Körper die Histamin-konzentration beeinflusst werden. Zum einen wird Histamin von Körper selbst gebildet zum anderen über Nahrung aufgenommen. Bestimmte Nahrungsmittel können im Körper gespeichertes Histamin freisetzen.

Die Diaminoxidase (DAO) ist das entscheidende, körpereigene Enzym das für den Abbau von Histamin im Organismus verantwortlich ist. Beim Abbau des über die Nahrung aufgenommen Histamins spielt das Enzym eine zentrale Rolle. Der wichtigste Ort ist der Darm. Liegt ein DAO- Enzymmangel, bzw. eine Hemmung der DAO Aktivität vor, wird Histamin nicht im ausreichenden Maße abgebaut.

Der Histamin- Stuhl Elisa Test gewährleistet eine zuverlässige Quantifizierung von Histamin. Für die Histaminbestimmung in der Stuhlprobe ist ein spezielles Stuhlentnahmebesteck notwendig, das mit einem Stabilisationsmedium den Abbau des Histamins auf dem Transport zum Labor gewährleistet.

Mit der Bestimmung von Histamin im Stuhl erfasst man die akute Histaminbelastung und die Aussage über die Abbaukapazität von Histamin im Darm.

### 2. Testprinzip

Der Histamin ELISA Kit BA E-1200 enthält Materialien für die quantitative Bestimmung von Histamin in Stuhlproben.

Zuerst wird Histamin im Verlauf der Probenvorbereitung zu N-Azyl-Histamin derivatisiert. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antiseren-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem enzymmarkierten Antikörper bestimmt und mit einem Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen. Die Konzentrationen der Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

### 3. Hinweise zum Test

#### 3.1 **Zuverlässigkeit der erhaltenen Messergebnisse**

Für eine zuverlässige Auswertung der Messergebnisse, muss die beschriebene Testdurchführung eingehalten und nach den geltenden Regeln und Richtlinien (GLP, RILIBÄK, usw.) gearbeitet werden. Insbesondere ist auf eine Mitführung von Präzisions- und Richtigkeitskontrollen zu achten, außerdem müssen die Ergebnisse der Kontrollen im gültigen Bereich liegen. Bei auffälligen Diskrepanzen zwischen den für diesen Test vorgegebenen Assaycharakteristika und den gemessenen Werten ist der Hersteller des Testkits zu Rate zu ziehen.

#### 3.2 **Reklamationen**

Bei eventuellen Reklamationen, bitte diese schriftlich und zusammen mit allen Angaben zur Testdurchführung, den Ergebnissen und Original-Testausdrucken (in Kopie) beim Hersteller einreichen. Das entsprechende Reklamationsformular kann beim Hersteller angefordert werden. Bitte vollständig ausfüllen!

#### 3.3 **Gewährleistung**

Dieses Testkit wurde gemäß dem aktuellen Stand der Technik produziert und strengen internen und externen Qualitätskontrollen unterworfen.

Jede Veränderung des Testkits oder des Testablaufs sowie die Verwendung von Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen kann die Testergebnisse negativ beeinflussen. In diesen Fällen besteht kein Anspruch auf Ersatz. Transportschäden sind von der Haftung durch den Hersteller ausgenommen.

### 3.4 Entsorgung

Reststoffe und/ oder alle übriggebliebenen Chemikalien, Reagenzien und angefertigten Gebrauchslösungen, sind Sonderabfälle. Die Entsorgung unterliegt den Gesetzen und Verordnungen des Bundes und der Länder. Über die Beseitigung von Sonderabfällen informieren die zuständigen Behörden oder Abfallentsorgungsunternehmen. Die Testverpackungen sind nach den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen. Gesetzliche Grundlage für die Entsorgung von Sonderabfällen ist das Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz.

Die entsprechenden Sicherheitsdatenblätter der einzelnen Produkte stellen wir gerne zur Verfügung oder sind auf der Hersteller-Internetseite erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen der Norm: ISO 11014-1.

### 3.5 Interferenzen

Reagenzien und Lösungen aus verschiedenen Chargen nicht mischen. Bitte unterschiedliche Transport und Lagerbedingungen beachten

Unsachgemäße Handhabung von Testproben oder Abweichungen von der Testvorschrift können die Ergebnisse beeinflussen. Keine Kitkomponenten über das Verfallsdatum hinaus verwenden. Mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien und des Waschwassers vermeiden. Inkubationszeiten und Waschhinweise beachten.

### 3.6 Warnhinweise

Beachten Sie die Inkubationszeiten und Waschhinweise. Verwenden Sie beim Arbeiten mit den Kitreagenzien oder Proben geeignete Handschuhe und waschen Sie anschließend sorgfältig die Hände. Vermeiden Sie jegliches Spritzen! In den Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien umgegangen wird, ist Essen und Trinken sowie Rauchen untersagt. Nicht mit dem Mund pipettieren!

Verwenden Sie keine Kitkomponenten über das Verfallsdatum hinaus. Reagenzien verschiedener Chargen nicht mischen! Vermeiden Sie mikrobielle Kontamination der Reagenzien und des Waschwassers. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferrohrleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Um dies zu verhindern, muss bei der Entsorgung mit großen Mengen Wasser sorgfältig nachgespült werden.

Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanes Serum oder Plasma enthalten, ergaben bei der Prüfung auf HCV, HBsAG bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solch infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

## 4. Lagerung und Haltbarkeit

Die Testpackung ist – bis auf das Azylierungsreagenz - bei 2-8 °C aufzubewahren. Das Azylierungsreagenz hingegen sollte bei Raumtemperatur gelagert werden. Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung der Komponenten sind auf jedem Kit angegeben. Innerhalb eines Ansatzes sollten nur Reagenzien einer Charge verwendet werden.

### 5.1 Reagenzien im Kit

|                  |                      |                                    |              |                                                                                         |
|------------------|----------------------|------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BA D-0024</b> | <b>REAC-PLATE</b>    | <b>Reaktionsplatte</b>             | 1 x 96 Wells | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-0025</b> | <b>WASH-CONC 50x</b> | <b>Wash Buffer Concentrate</b>     | 1 x 20 mL    | Konzentrat. Inhalt mit destilliertem Wasser auf 1000 ml Endvolumen verdünnen            |
| <b>BA E-0055</b> | <b>SUBSTRATE</b>     | <b>Substrat</b>                    | 1 x 12 ml    | gebrauchsfertig, enthält TMB                                                            |
| <b>BA E-0080</b> | <b>STOP-SOLN</b>     | <b>Stopplösung</b>                 | 1 x 12 ml    | gebrauchsfertig, enthält 0.25 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          |
| <b>BA E-1031</b> | <b>HIS</b>           | <b>Histamin Mikrotiterstreifen</b> | 1 x 96 Wells | 12 Streifen, jeweils 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar, vorbeschichtet mit Azyli-Histamin |
| <b>BA E-1001</b> | <b>STANDARD A</b>    | <b>Standard A</b>                  | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1002</b> | <b>STANDARD B</b>    | <b>Standard B</b>                  | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1003</b> | <b>STANDARD C</b>    | <b>Standard C</b>                  | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1001</b> | <b>STANDARD D</b>    | <b>Standard D</b>                  | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1005</b> | <b>STANDARD E</b>    | <b>Standard E</b>                  | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1006</b> | <b>STANDARD F</b>    | <b>Standard F</b>                  | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1051</b> | <b>CONTROL 1</b>     | <b>Kontrolle 1</b>                 | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1052</b> | <b>CONTROL 2</b>     | <b>Kontrolle 2</b>                 | 1 x 4 ml     | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1210</b> | <b>HIS-AS</b>        | <b>Histamin Antiserum</b>          | 1 x 12 ml    | gebrauchsfertig, blau gefärbt, Ziege-anti-N-azylihistamin Antiserum                     |
| <b>BA E-1211</b> | <b>ACYL-BUFF</b>     | <b>Azylierungspuffer</b>           | 2 x 12 ml    | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1212</b> | <b>ACYL-REAG</b>     | <b>Azylierungsreagenz</b>          | 2 x 1,5 ml   | gebrauchsfertig                                                                         |
| <b>BA E-1240</b> | <b>CONJUGATE</b>     | <b>Enzymkonjugat</b>               | 1 x 12 ml    | gebrauchsfertig, Anti-Ziege-IgG konjugiert mit Peroxidase                               |



## 5.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte variable Präzisionspipetten (z.B. 10-100 µL / 100-1000µL)
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und 620 (650) nm-Filter
- Zentrifuge min. 3000 x g
- Plattenschüttler (Schüttelhub von 3 mm, ca. 600 rpm)
- Vortex-Mischer, - Destilliertes Wasser

## 6. Probenmaterial und Lagerung

⚠ Zum Sammeln, Stabilisieren und Versenden der Stuhlproben ist die Verwendung eines speziellen Stuhlsammelgefäßes erforderlich (Artikelnummer **BA D-1241**). Wie empfohlen, zur einfachen und sauberen Sammlung, ein Stuhlsammelset (Artikelnummer **BA D-1200**). Stabilisierte Proben können bei Raumtemperatur versandt werden und sind mindestens eine Woche bei Raumtemperatur sowie einen Monat bei 2 -8 °C stabil.

## 7. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.  
Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

### 7.1 Vorbereitung der Reagenzien

#### **Waschpuffer**

20 ml Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann bis zu 6 Monate bei 2 – 8 °C gelagert werden.

#### **Azylierungsreagenz**

⚠ Das Azylierungsreagenz hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Um sicherzustellen, dass es bei Gebrauch flüssig ist, sollte es getrennt von den übrigen Kitkomponenten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden. Bei Lagerung im Kühlschrank (2-8°C) muss sichergestellt sein, dass es vor der Verwendung Raumtemperatur angenommen hat und eine homogene, kristallfreie Lösung bildet.

### 7.2 Vorbereitung und Azylierung

|    |                                                                                                                                                                                         |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Jeweils <b>100 µL Standards</b> und <b>Kontrollen</b> sowie <b>100 µL der Proben</b> (aus Stuhlsammelgefäß)* in die entsprechenden Vertiefungen der <b>Reaktionsplatte</b> pipettieren. |
| 2. | <b>25 µL Azylierungsreagenz</b> (siehe 7.1) in alle Vertiefungen pipettieren.                                                                                                           |
| 3. | <b>200 µL Azylierungspuffer</b> in alle Vertiefungen pipettieren.                                                                                                                       |
| 4. | <b>Reaktionsplatte</b> kurz per Hand schütteln; <b>15 Minuten</b> bei <b>RT</b> (20-25°C) inkubieren.                                                                                   |
| ⚠  | Jeweils <b>25 µL</b> werden für den nachfolgenden ELISA verwendet                                                                                                                       |

\* Das Stuhlsammelgefäß nimmt 10 mg Stuhl auf und enthält 3 ml Stabilisierungspuffer.  
Dadurch kommt es zu eine 1: 300 Verdünnung.  
Diese Verdünnung muss bei der Berechnung der Ergebnisse (siehe 8.) berücksichtigt werden.

### 7.3 Histamin ELISA

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.  | <b>25 µL der azylierten Standards, Kontrollen und Proben</b> in die Kavitäten der <b>Histamin Mikrotiterstreifen</b> pipettieren.                                                                                                                                                           |
| 2.  | <b>100 µL Histamin-Antiserum</b> in alle Kavitäten pipettieren.                                                                                                                                                                                                                             |
| 3.  | <b>30 Minuten</b> bei RT (20-25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.<br><b>Alternativ ohne Schüttler:</b> Histamin Mikrotiterstreifen kurz per Hand schütteln und für <b>40 Minuten</b> bei <b>RT</b> (20-25°C) inkubieren.                                                    |
| 4.  | Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen und sorgfältig <b>3 x</b> mit jeweils <b>300 µL Waschpuffer</b> waschen. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.                                 |
| 5.  | <b>100 µL Enzymkonjugat</b> in alle Kavitäten pipettieren.                                                                                                                                                                                                                                  |
| 6.  | <b>10 Minuten</b> bei RT (20-25°C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.<br><b>Alternativ ohne Schüttler:</b> Histamin Mikrotiterstreifen kurz per Hand schütteln und für <b>20 Minuten</b> bei <b>RT</b> (20-25°C) inkubieren.                                                     |
| 7.  | Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen und sorgfältig <b>3 x</b> mit jeweils <b>300 µL Waschpuffer</b> waschen. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.                                 |
| 8.  | <b>100 µL Substrat</b> in alle Kavitäten pipettieren.                                                                                                                                                                                                                                       |
| 9.  | <b>15 ± 2 Minuten</b> bei RT (20-25°C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.<br>⚠ <b>Alternativ ohne Schütteln:</b> Histamin Mikrotiterstreifen kurz per Hand schütteln und für <b>15 ± 2 Minuten</b> bei <b>RT</b> (20-25°C) inkubieren.<br><b>Direktes Sonnenlicht vermeiden!</b> |
| 10. | <b>100 µL Stopplösung</b> in alle Kavitäten pipettieren und kurz per Hand schütteln.                                                                                                                                                                                                        |

- 11. Absorbtion** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten **messen**.

## 8. Berechnung der Ergebnisse

|                                                                               | Standardkonzentrationen                                                                            |     |     |       |       |        |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-------|-------|--------|
| Standard                                                                      | A                                                                                                  | B   | C   | D     | E     | F      |
| Histamin (ng/ml)*                                                             | 0                                                                                                  | 0.5 | 1.5 | 5     | 15    | 50     |
| *Histamin Stuhlproben 1:300<br>(nach Multiplikation $\Rightarrow$ ng/g Stuhl) | 0                                                                                                  | 150 | 500 | 1 500 | 5 000 | 15 000 |
| Umrechnung:                                                                   | Histamin (ng/ml) $\times$ 9 = Histamin (nmol/L)<br>Histamin (ng/g) $\times$ 9 = Histamin (nmol/kg) |     |     |       |       |        |

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechende Standardkonzentration (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) empfohlen.

**Kontrollen:** Die Konzentrationen der Kontrollen können direkt aus der Standardkurve ermittelt werden.

**Stuhlproben:** Die Konzentrationen der **Stuhlproben** müssen mit **300 multipliziert** werden.

### 8.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrolle oder andere kommerzielle Kontrollproben mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen müssen dabei wie die unbekannten Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen dabei innerhalb der Nachweisgrenze liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind im QC Report aufgeführt.

### 8.2 Kalibrierung

Die Reaktion des Antiserums, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 – 25°C.

$\triangle$  Liegt die gemessene Extinktion außerhalb des Messbereichs, so sollte innerhalb von 10 Minuten die Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 405 nm gemessen werden.

### 8.3. Referenzbereich

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

**Erwachsene: < 600 ng/g Stuhl**

$\triangle$  Alkohol und Medikamente können die Aktivität der histaminabbauenden Enzyme stören und zu erhöhten Histaminwerten im Stuhl führen.

## 9. Testcharakteristika

| Spezifität<br>(Kreuzreaktion)                    |                           | Substanz                                                                                       |                         | Kreuzreaktion<br>(%)    Histamin |                                  |                |
|--------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------|
|                                                  |                           | Histamin                                                                                       |                         | 100                              |                                  |                |
|                                                  |                           | 3-Methyl-Histamin                                                                              |                         | 0.1                              |                                  |                |
|                                                  |                           | Tyramin                                                                                        |                         | 0.01                             |                                  |                |
|                                                  |                           | L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Tyrosin,<br>Tryptamin, 5-Hydroxy-Indol- Essigsäure,<br>Serotonin |                         | < 0.001                          |                                  |                |
| Analytische Sensitivität<br>(Limit of Detection) |                           |                                                                                                | Histamin                | 75 ng/g                          | Mittelwert (Null-Standard) - 2SD |                |
| Präzision                                        |                           |                                                                                                |                         |                                  |                                  |                |
| Inter-Assay Variation, n = 13                    |                           |                                                                                                |                         | Intra-Assay Variation, n = 39    |                                  |                |
| Probe                                            | Mittelwert ±<br>SD (ng/g) | CV (%)                                                                                         | Probe                   | Mittelwert ±<br>SD (ng/g)        | CV (%)                           |                |
| 1                                                | 868 ± 69                  | 8                                                                                              | 1                       | 610 ± 73                         | 12                               |                |
| 2                                                | 2 877 ± 161               | 5,6                                                                                            | 2                       | 4 690 ± 310                      | 6,6                              |                |
| Wiederfindung                                    |                           |                                                                                                | Bereich (ng/g)          |                                  | Bereich (%)                      | Mittelwert (%) |
|                                                  |                           | Histamin                                                                                       | 5170- 45                |                                  | 85 - 106                         | 100            |
| Linearität                                       |                           |                                                                                                | Serielle Verdünnung bis |                                  | Bereich (%)                      | Mittelwert (%) |
|                                                  |                           | Histamin                                                                                       | 1:16                    |                                  | 92 - 120                         | 103            |

 **Aktuelle Literatur, Informationen zur klinischen Bedeutung oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

**Symbole:**

|                                                                                     |                                    |                                                                                     |                |                                                                                       |                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|  | Lagertemperatur                    |  | Hersteller     |  | Enthält Testmaterial für <n> Tests |
|  | Verwendbar bis                     |  | Chargennummer  |  | In vitro Diagnostikum              |
|  | Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen |  | Inhalt         |  | CE gekennzeichnet                  |
|  | Achtung                            |  | Katalog-Nummer |  | Nur für Forschungszwecke           |