



## Gebrauchsanweisung

# 1-Methylhistamin ELISA

Enzymimmunoassay für die  
Quantitative Bestimmung von  
**1-Methylhistamin (N-Methylhistamin) in Urin**

CE

IVD

Art. Nr. EA208/96



12 x 8



2 – 8 °C

REF

MHE00 Wesamin GmbH & Co. KG • Graff 1 • 24568 Oersdorf • Germany

Distributor: DLD Diagnostika GmbH • Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany

Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111 • contact@dld-diagnostika.de • www.dld-diagnostika.de



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Testprinzip.....	4
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	5
3	Lagerung und Haltbarkeit.....	6
4	Inhalt des Kits.....	6
5	Probengewinnung.....	8
6	Vorbereitung der Reagenzien.....	9
7	Testdurchführung.....	10
8	Auswertung.....	12
9	Testcharakteristika.....	13
10	Änderungen .....	14
11	Literatur .....	15
	Pipettierschema .....	16

## Verwendete Symbole

<b>IVD</b>	In-Vitro Diagnostikum		CE-markiert
<b>CONT</b>	Inhalt		Verwendbar bis
<b>LOT</b>	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt austreichend für <n> Prüfungen
<b>REF</b>	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Die Symbole der Komponenten des Kits sind im Kapitel 4 *Inhalt des Kits* beschrieben

## 1 Einleitung und Testprinzip

Histamin (Nomenklatur: 2-(4-Imidazolyl)-ethylamin) ist ein Naturstoff, der im menschlichen und tierischen Organismus weit verbreitet ist. Es ist gut wasserlöslich und hat einen basischen Charakter. Histamin gehört biochemisch zu den biogenen Aminen und wird aus der Aminosäure Histidin gebildet. Diese Decarboxylierung erfolgt mit Hilfe des Enzyms Histidin-Decarboxylase. Die Biosynthese des Histamins findet in den Mastzellen, Zellen der Epidermis und der Magenschleimhaut und in den Nervenzellen statt.

Aus Mastzellen und basophilen Granulozyten kann das Histamin explosionsartig freigesetzt werden und zwar bei der Stimulation der Speicherzellen mit dem entsprechenden Allergen. Diese Stimulation erfolgt durch die Bindung des Allergens an die spezifischen IgE-Antikörper auf der Oberfläche der Zielzellen. Wobei dieser Effekt noch nicht bei dem ersten Kontakt mit einem Allergen auftritt. Zunächst erfolgt durch den Erstkontakt die Bildung von Plasmazellen, die spezifische IgE-Antikörper produzieren und freisetzen. Diese binden an die entsprechenden Rezeptoren der Mastzellen (Sensibilisierung). Erst beim nächsten Allergen-Kontakt können die Allergene direkt an die IgE-Antikörper der Mastzellen binden und damit wird die spontane Histaminausschüttung aus der Granula der Mastzellen ausgelöst (allergische Sofortreaktion).

Zirkulierendes Histamin wird durch die Histamin-N-Methyltransferase schnell zu 1-Methylhistamin (N-Methylhistamin) umgesetzt. Die Ausscheidung erfolgt im Urin und dadurch ist die Bestimmung dieses Metaboliten im Urin von Interesse.

Der 1-Methylhistamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem 1-Methylhistamin in humanen Urinproben. Nach der Probenvorbereitung in der Preparation-Platte erfolgt die Derivatisierung in der ELISA-Platte. Dabei wird 1-Methylhistamin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-1-Methylhistamin umgewandelt.

Der 1-Methylhistamin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschritt entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

## 2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur In-Vitro-Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung **Kittel**, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in **4. Inhalt des Testkits und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern**.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführen von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

### 3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6 geregelt.

Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

### 4 Inhalt des Kits

<b>MT-Streifen</b>	<b>STRIPS</b>	12 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar Beschichtet mit N-Acyl-1-Methylhistamin		
<b>Standards 1-6</b>	<b>CAL 1 - 6</b>	6 Flaschen
Je 4 ml, gebrauchsfertig		
<b>Kontrolle 1 &amp; 2</b>	<b>CON 1 &amp; 2</b>	2 Flaschen
Je 4 ml Serum, gebrauchsfertig Bereich: siehe QC-Zertifikat im Kit		
<b>Acylierungspuffer</b>	<b>ACYL-BUFF</b>	1 Flaschen
32 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt		
<b>Acylierungsreagenz</b>	<b>ACYL-REAG</b>	3 Flaschen
3 ml lyophilisiert, mit <b>SOLVENT</b> lösen		
<b>Antiserum</b>	<b>AS</b>	1 Flasche
6 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt Kaninchen-anti-N-Acyl-1-Methylhistamin		Achtung
<b>Enzymkonjugat</b>	<b>CONJ</b>	1 Flasche
13 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase		Achtung

<b>Waschpuffer</b> 20 ml, Konzentrat (50x)	<b>WASH</b>	1 Flasche
<b>Substrat</b> 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	<b>SUB</b>	1 Flasche
<b>Stopplösung</b> 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure	<b>STOP</b>	1 Flasche
<b>Preparation-Platte</b> Für die Probenvorbereitung	<b>PRE-PLATE</b>	2 Stück
<b>Ausgleichsreagenz</b> Lyophilisiert, mit 32ml <b>ACYL-BUFF</b> lösen	<b>EQUA-REAG</b>	1 Flasche
<b>Solvent</b> 11 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt	<b>SOLVENT</b>	1 Flasche

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100 und 300 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Zentrifuge

## 5 Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermeiden werden.

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden.

Sammelurin: Der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6 M Salzsäure (Warnung: Gefahrenhinweise beachten) als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Urinproben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

**Urine vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.**

## 6 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

### 6.1 Ausgleichsreagenz

Zur Rekonstitution des lyophilisierten Ausgleichsreagenzes **EQUA-REAG** den Inhalt des Acylierungspuffers **ACYL-BUFF** vollständig in die Flasche des Ausgleichsreagenzes überführen. Das Ausgleichsreagenz kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler bis zum vollständigen Lösen mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

### 6.2 Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

### 6.3 Acylierungsreagenz

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG** dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 5 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mindestens 3 Stunden stabil. Im Kit sind 3 Flaschen Acylierungs-Reagenz enthalten, sodass der ELISA mehrmals teilbar ist. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das rekonstituierte Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 7 Testdurchführung

### 7.1 Probenvorbereitung Urinproben

Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die für die Probenvorbereitung verwendeten Vertiefungen der Preparation-Platte **PRE-PLATE** markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. Je  
**20 µl Standard 1 - 6** **CAL 1 - 6**,  
**20 µl Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** und  
**20 µl Urinprobe**  
in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Preparation-Platte **PRE-PLATE** pipettieren.
2. Je **300 µl** Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** (s. 6.1) in jede Vertiefung pipettieren.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

**20 µl werden im ELISA eingesetzt.**

## 7.2 ELISA Urinproben

1. **20 µl vorverdünnte Standards, Kontrollen und Urinproben** aus der Preparations-Platte **PRE-PLATE** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.  
Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. **50 µl Acylierungsreagenz ACYL-REAG** (s. 6.3) in jede Vertiefung pipettieren und **sofort** mit dem nächsten Punkt fortfahren.
3. 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. **50 µl Antiserum AS** in jede Vertiefung pipettieren. Bitte **Multipette oder Ähnliches** (keine Einkanal- oder Mehrkanalpipetten) verwenden.
5. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25°C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Vertiefungen entleeren, je mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer WASH** (s. 6.2) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.  
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
7. **100 µl Enzymkonjugat CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
8. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. **100 µl Substrat SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.  
20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt ohne Schütteln inkubieren.
12. **100 µl Stopplösung STOP** in jede Vertiefung pipettieren.  
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

## 8 Auswertung

Standard:	1	2	3	4	5	6
ng / ml	0	10	30	100	300	1000
nmol / l	0	80	240	800	2400	8000

Die OD-Werte (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

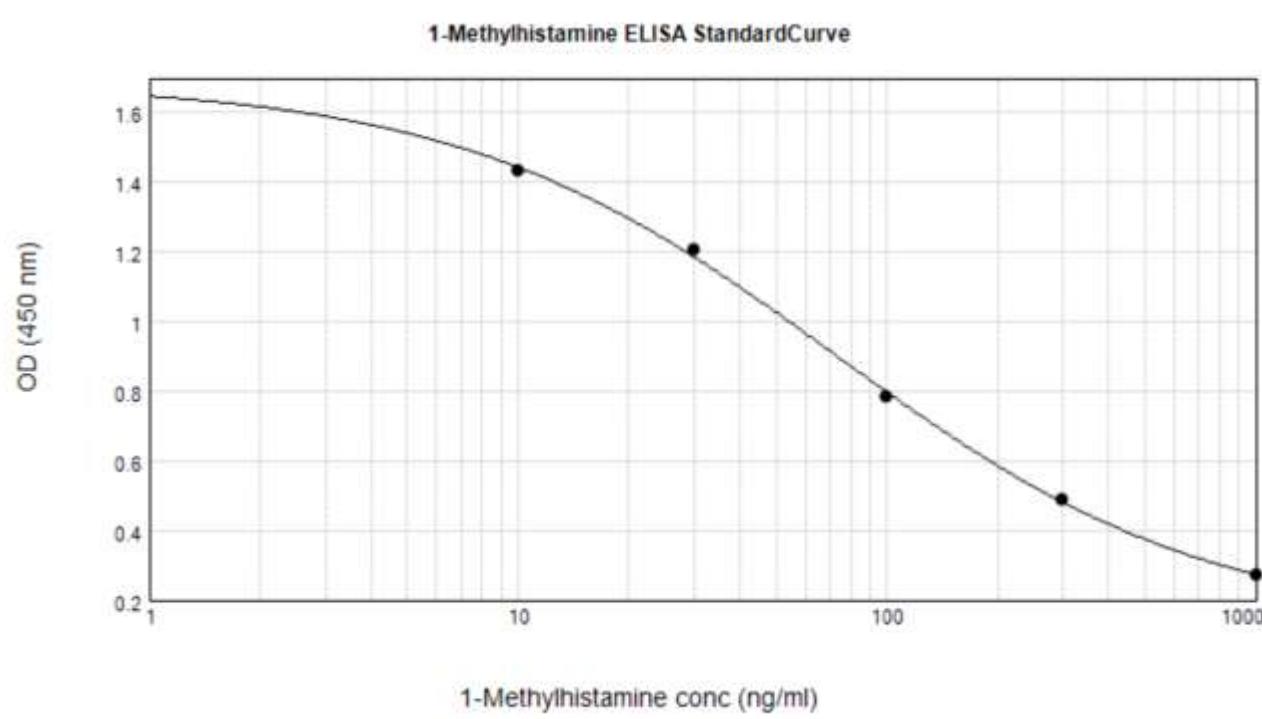
Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ: Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log)

Die Konzentrationen der Kontrollen und Urinproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Umrechnung:

1-Methylhistamin: 1 ng / ml = 8,0 nmol / l

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve:



**Qualitätskontrolle:** Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

## 9 Testcharakteristika

### 9.1 Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
Urin, 24h	< 250 µg/Tag
Urine, spontan	30 - 200 µg / g Kreatinin

### 9.2 Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	3,0	OD <sub>Cal1</sub> - 2xSD

### 9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreakтивит (%)
1-Methylhistamin	100
Histamin	< 0,7
3-Methylhistamin	< 0,07
1-Methyl-4-imidazol-essigsäure	< 0,0025
Imidazol-4-essigsäure	< 0,007
L-Histidin	< 0,0025

### 9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	51 - 324	97	92 - 100

### 9.5 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit dest. Wasser)

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	33 - 339	1 : 10	102	97 - 107

## 9.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk
Urin	52 – 190	6,7 – 6,9 %

## 9.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	LC/MS	$Y = 0,93 \times LC/MS - 9,1; R = 0,993; N = 32$

## 9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Methodenvergleich (9.7) festgestellt.

## 9.9 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des 1-Methylhistamin Elisas ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit destilliertem Wasser verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

## 9.10 Interferenzen

Nicht-angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

## 10 Änderungen

Version \_8: Ergänzungen/Änderungen sind grau hervorgehoben.

Version \_7: Es wurden umfangreiche Änderungen vorgenommen, die in grau hervorgehoben sind. Zellkulturproben und Plasma als Matrix wurden entfernt.

Version \_6: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Die Hersteller- und Distributorangaben wurden geändert. Abschnitte 6, 7 und 8 und Pipettierschemata wurden um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

## 11 Literatur

- Nettis, E.; Colanardi, A.; Ferrannini, A. (2005):  
**Antihistamines as Important Tools for Regulating Inflammation**  
Curr. Med. Chem. – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents, 4, 81-89
- Matsumoto, J.; Matsuda, H. (2002):  
**Mast-cell-dependent histamine release after praziquantel treatment of Schistosoma japonicum infection: implications for chemotherapy-related adverse effects**  
Parasitol Res 88: 888–893
- Belic, A.; Grabnar, I.; Karba, R.; et al. (1999):  
**Interdependence of histamine and methylhistamine kinetics: modelling and simulation approach**  
Computers in Biology and Medicine 29, 361-375
- Martens-Lobenhoffer, J.; Neumann, H. (1999):  
**Determination of 1-methylhistamine and 1-methylimidazoleacetic acid in human urine as a tool for the diagnosis of mastocytosis**  
Journal of Chromatography B, 721, 135–140
- Prell, G.; Green, J.; Elkashaf, A. (1996):  
**The relationship between urine excretion and biogenic amines and their metabolites in cerebrospinal fluid of schizophrenic patients**  
Schizophrenia Research 19, 171-176
- Eberlein-König, B.; Ullmann, S.; Thomas, P.; et al. (1995):  
**Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization**  
Clinical and Experimental Allergy, Volume 25, pages 704-712
- Koller, D.; Rosenkranz, A.; Pirker, C.; et al. (1992):  
**Assessment of histamine release from basophils in whole blood by benzylpenicilloyl poly-L-lysine in penicillin-sensitized patients**  
Allergy: 47: 459-462.
- Marquardt, D.; Wasserman, S. (1982):  
**Mast Cells in Allergic Diseases and Mastocytosis**  
West J Med; 137:195-212
- Butchers, P.; Vardey, C.; Skidmore, I.; et al. (1980):  
**Histamine-Containing Cells from Bronchial Lavage of Macaque Monkeys. Time Course and Inhibition of Anaphylactic Histamine Release**  
Int. Archs Allergy appl. Immun. 62: 205-212

**Pipettierschema****Probenvorbereitung**

		Standard	Kontrolle	Urinprobe
<b>PRE-PLATE:</b>				
CAL 1 – 6	µl	20		
CON 1 & 2	µl		20	
Urin	µl			20
EQUA-REAG	µl	300	300	300

Platte 5 Minuten schütteln  
Jeweils **20 µl** im ELISA einsetzen

**ELISA**

		Verdünnte Standards	Verdünnte Kontrollen	Verdünnte Urinproben
<b>STRIPS:</b>				
Transfer von PRE-PLATE in STRIPS	µl	20	20	20
ACYL-REAG	µl	50	50	50

**Sofort** 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

AS	µl	50	50	50
----	----	----	----	----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln  
4 x waschen

CONJ	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln  
4 x waschen

SUB	µl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln  
20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

STOP	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln  
Messung der Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 Minuten