

Vertrieb durch:

FROST Diagnostika GmbH

Speyerer Str. 74

67166 Otterstadt

www.frostdiagnostika.de

Tel: 06232 600 487 0

Fax: 06232 600 487 60

info@frostdiagnostika.de



Arbeitsanleitung

Histamine Stool ELISA

(Histamin im Stuhl)

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Histamin in Stuhlproben



REF

BA 10-1200

IVD



Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG

Am Eichenhain 1, 48531 Nordhorn

Telefon: +49-5921-8197 0

Telefax: +49-5921-8197 222

e-mail: manz@ldn.de

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

LDN[®]

Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG

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 10-1200 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-Antikörper-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. **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.

4. Reagenzien im Kit

BA 3024	REAC-PLATE	Reaktionsplatte	1 x 96 Wells	gebrauchsfertig
BA 10-0030	WASH-CONC 25x	Waschpuffer-Konzentrat	1 x 20 ml	Konzentrat. Inhalt mit destilliertem Wasser auf 500 ml Endvolumen verdünnen
BA 10-0055	SUBSTRATE	Substrat	1 x 11 ml	gebrauchsfertig, enthält TMB
BA 10-0080	STOP-SOLN	Stopplösung	1 x 11 ml	gebrauchsfertig, enthält 0.25 M H ₂ SO ₄
BA 10-1031	HIS	Histamin Mikrotiterstreifen	1 x 96 Wells	12 Streifen, jeweils 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar, vorbeschichtet mit Azyll-Histamin
BA 10-1241	SAMPLE-BUFF	Probenpufferkonzentrat	2 x 50 ml	Konzentrat. Inhalt eines Fläschchens jeweils mit destilliertem Wasser auf 500 ml Endvolumen verdünnen
BA 10-3101	STANDARD A	Standard A	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3102	STANDARD B	Standard B	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3103	STANDARD C	Standard C	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3104	STANDARD D	Standard D	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3105	STANDARD E	Standard E	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3106	STANDARD F	Standard F	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3110	HIS-AS	Histamin Antiserum	1 x 11 ml	gebrauchsfertig, blau gefärbt, Ziege-anti-N-azyllhistamin Antiserum
BA 10-3111	ACYL-BUFF	Azylierungspuffer	1 x 22 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3112	ACYL-REAG	Azylierungsreagenz	2 x 1,5 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3140	CONJUGATE	Enzymkonjugat	1 x 11 ml	gebrauchsfertig, Anti-Ziege-IgG konjugiert mit Peroxidase
BA 10-3151	CONTROL 1	Kontrolle 1	1 x 4 ml	gebrauchsfertig
BA 10-3152	CONTROL 2	Kontrolle 2	1 x 4 ml	gebrauchsfertig

5. Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte variable Präzisionspipetten (z.B. 10-100 µL / 100-1000µL)
- Waschorrüttelung 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 11-1241**). Wie empfohlen, zur einfachen und sauberen Sammlung, ein Stuhlsammelset (Artikelnummer **BA 11-1200**). 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

Probenpuffer

50 ml Probenpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen. Der gebrauchsfertige Probenpuffer kann bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) bei 2 – 8 °C gelagert werden.

Waschpuffer

20 ml Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann bei 2 – 8 °C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) 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 100 µL Standards und Kontrollen sowie 100 µL der Proben (aus Stuhlsammelgefäß) in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2.	25 µL Azylierungsreagenz (siehe 7.1) in alle Vertiefungen pipettieren.
3.	200 µL Azylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
4.	Reaktionsplatte kurz per Hand schütteln; 15 Minuten bei RT (20-25°C) inkubieren.
▲	Jeweils 25 µL werden für den nachfolgenden ELISA verwendet

7.3 Histamin ELISA

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

Standard	Standardkonzentrationen					
	A	B	C	D	E	F
Histamin (ng/ml)*	0	0.5	1.5	5	15	50
*Histamin Stuhlproben 1:300 (nach Multiplikation ⇒ ng/g Stuhl)	0	150	500	1 500	5 000	15 000
	Histamin (ng/ml) x 9 = Histamin (nmol/L) Histamin (ng/g) x 9 = Histamin (nmol/kg)					

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen 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 unbekanntenen 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.

■ *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

■ *Alkohol und Medikamente können die Aktivität der histaminabbauenden Enzyme stören und zu erhöhten Histaminwerten im Stuhl führen.*

9. Testcharakteristika

Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz			Kreuzreaktion (%) Histamin	
	Histamin			100	
	3-Methyl-Histamin			0.1	
	Tyramin			0.01	
	L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Tyrosin, Tryptamin, 5-Hydroxy-Indol- Essigsäure, Serotonin			< 0.001	
Analytische Sensitivität (Limit of Detection)		Histamin	75 ng/g	Mittelwert (Null-Standard) - 2SD	
Präzision					
Inter-Assay Variation, n = 13			Intra-Assay Variation, n = 39		
Probe	Mittelwert ± SD (ng/g)	CV (%)	Probe	Mittelwert ± SD (ng/g)	CV (%)
1	868 ± 69	8	1	61 ± 7,3	12
2	2 877 ± 161	5.6	2	4 690 ± 310	6,6
Widerfindung	Bereich (ng/g)		Bereich (%)		Mittelwert (%)
	Histamin	5170- 45	85 - 106		100
Linearität	Serielle Verdünnung bis		Bereich (%)		Mittelwert (%)
	Histamin	1:16	92 - 120		103

10. Hinweise zum Test

10.1 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.

10.2 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!

10.3 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.

10.4 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.

10.5 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.

10.6 Warnhinweise

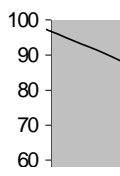
Beachten Sie die Inkubationszeiten und Waschhinweise. Verwenden Sie beim Arbeiten mit den Kitreagenzien oder Proben geeignete Handschuhe und waschen Sie anschließend sorgfältig die Hände. Vermeiden Sie jegliches Spritzen! In den Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien umgegangen wird, ist Essen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



Aktuelle Literatur und weitere Informationen senden wir auf Anfrage gerne zu.



Endete Symbole:

	Enthält Testmaterial für <n> Teste		Hersteller		Lagertemperatur
	Katalog-Nummer		Chargennummer		Verwendbar bis
	In vitro Diagnostikum		Inhalt		Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen
	Gebrauch nur zu Forschungszwecken		Achtung		