



## EIA Histamine

**REF** IM2562

### TABLE OF CONTENTS

English . . . . .	2	Ελληνικά (EL) . . . . .	26
Français (FR) . . . . .	6	Čeština (CZ) . . . . .	31
Deutsch (DE) . . . . .	10	Русский (RU) . . . . .	35
Italiano (IT) . . . . .	14	Србија (SR) . . . . .	40
Español (ES) . . . . .	18	APPENDIX . . . . .	44
Dansk (DA) . . . . .	22		

---

ООО «Бекмен Култер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.  
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: [beckman.ru@beckman.com](mailto:beckman.ru@beckman.com)



IMMUNOTECH s.r.o., Radiova 1122/1, 102 00 Prague 10, Czech Republic  
[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)

# EIA Histamine

**REF** IM2562

## ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE IN VITRO DETERMINATION OF HISTAMINE IN BIOLOGICAL SAMPLES

For *in vitro* diagnostic use.

### PRINCIPLE

The enzyme immunoassay of histamine is a competition assay. Histamine of the samples, controls or calibrators is chemically modified into acylated histamine during a first step. Acylated histamine is incubated in monoclonal antibody coated wells in presence of alkaline phosphatase acylated histamine conjugate. After incubation, the wells are rinsed in order to remove non-bound components. The bound enzymatic activity is then measured after the addition of a chromogenic substrate.

### WARNING AND PRECAUTIONS

#### General remarks:

- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- The vials with calibrators and controls should be opened as shortly as possible to avoid excessive evaporation.
- A standard curve must be established with each assay.
- It is recommended to perform the assay in duplicate.
- Bring all reagents to room temperature before pipeting.
- Contact of substrate tablet with skin may adversely affect the product. Handle tablets with forceps.
- Gloves must be worn to avoid contamination by extraneous histamine, e. g. from perspiration.
- Histamine adsorbs on glass, use only plastic pipets, tubes etc.

#### Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide can react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Sodium azide disposal must be in accordance with appropriate local regulations.

#### Materials of human origin

All blood samples should be handled as if capable of transmitting hepatitis or AIDS and waste should be discarded according to the country rules.

### GHS HAZARD CLASSIFICATION

Wash Solution (20x) DANGER



H360 May damage fertility or the unborn child.  
 P201 Obtain special instructions before use.  
 P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.  
 P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Boric Acid 0.1 - 0.3% Sodium Borate Decahydrate 0.1 - 0.3%

Stop Solution (NaOH) DANGER



H314 Causes severe skin burns and eye damage.  
 P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.  
 P301+P330+P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.

Substrate buffer

DANGER



H316 Causes mild skin irritation.  
 H318 Causes serious eye damage.  
 H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P310 Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

P314 Get medical advice/attention if you feel unwell.

P332+P313 If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. Diethanolamine 7 - 10%

Conjugate diluent

DANGER



H360 May damage fertility or the unborn child.  
 P201 Obtain special instructions before use.  
 P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.  
 P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Boric Acid 0.1 - 0.5%

Conjugate

DANGER




H360 May damage fertility or the unborn child.  
 P201 Obtain special instructions before use.  
 P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.  
 P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Boric Acid 0.5 - 1%


DMSO

WARNING



H227 Combustible Liquid  
 H315 Causes skin irritation.

	H319	Causes serious eye irritation.
	H335	May cause respiratory irritation.
	P261	Avoid breathing vapours.
	P280	Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
	P304+P340	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing.
	P312	Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
	P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
	P403+P233	Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.
		Dimethyl Sulfoxide > 95%
Acylation Buffer	DANGER	
		
	H360	May damage fertility or the unborn child.
	P201	Obtain special instructions before use.
	P280	Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
	P308+P313	IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Boric Acid 1 - 5%

 Safety Data Sheet is available at [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION

### Plasma

- collect blood into a chilled tube containing EDTA only and chill immediately on ice
- centrifuge 10 minutes at 900 g at 4°C within 20 minutes of sample collection
- aspirate the upper 2/3 of plasma
- plasma may be diluted in PBS

### Urine

- Collect urine specimen in plastic container. Either freeze sample or add bacteriostatic agent.
- dilute samples 1:25 in PBS

### Histamine release in whole blood

Do not vortex cell suspension.

Blood sampling: collect 1-2 mL of blood into heparine tubes only, do not use EDTA. Keep samples at 18-25°C for a maximum of 24 hours if the assay cannot be done immediately.

Total histamine after cell lysis: Add 50 µL of undiluted blood to 950 µL of distilled water (dilution 1:20). Freeze and thaw twice.

#### Cell challenge:

- **challenge with histamine release agent:** dilute whole blood 1:7 in histamine release buffer (e. g. 500 µL of whole blood + 3 mL of buffer), add 50 µL of the different dilutions of releasing agent to the wells of a plate, then add 100 µL of the 1:7 dilution of whole blood. Incubate plate covered with lid, for 30 minutes at 37°C (all volumes may be doubled if cells are challenged in tubes).
- **spontaneous histamine release:** add 50 µL of histamine release buffer to wells of a plate, then add 100 µL of the 1:7 dilution of whole blood. Incubate plate covered with lid, for 30 minutes at 37°C.

- **recovery of released histamine:** centrifuge 5 minutes at 900 g at 4°C and keep the plate on crushed ice after centrifugation, carefully collect 100 µL of supernatant fluid without disturbing cell pellet.

### Liquid samples

Collect samples in plastic tubes.

### Solid samples

Extract histamine with 10 µL per mg of tissue of 0.2N HClO<sub>4</sub>, homogenize by sonication or crush and centrifuge at 10 000 g for 5 minutes at < 4°C. Collect supernatant and clarify by filtration if necessary. Neutralize (pH 6-8) supernatant fluid by addition of an equal volume of 1M of potassium borate. Centrifuge at 10 000 g, 1 minute at <4°C. Collect supernatant fluid in plastic tubes.

### Sample storage

Except for cell challenge whole blood, store all type of sample at < -18°C in plastic tubes if the assay cannot be done immediately.

## MATERIALS PROVIDED

Before opening, all reagents of the kit are stable until the expiry date indicated on the kit labels, if stored at 2-8°C.

Expiry dates printed on vial labels apply to the long-term storage of components by the manufacturer only, prior to assembly of the kit. Do not take into account.

**Anti-histamine antibody-coated plate: 12 x 8 wells** (ready-to-use)

Unused strips have to be stored at 2-8°C in the self-lock bag provided.

**Histamine-alkaline phosphatase conjugate: two vials** (lyophilised)

The vial contains histamine-alkaline phosphatase conjugate lyophilized in presence of bovine serum albumine. Reconstitute the conjugate with the volume of conjugate diluent stated on the vial label and pour the content of both vials with reconstituted conjugate into Vial for conjugate. After reconstitution the conjugate is stable one week at 2-8°C or at < -18°C until the expiration date of the kit.

**Diluent: one 25 mL vial** (ready to use)

The diluent is used to reconstitute the conjugate. The diluent is stable at 2-8°C until expiration date of the kit.

**Calibrators: six 1 mL vials** (ready-to-use)

The vials contain from 0 to approximately 100 nM of non-acylated histamine, in buffer with bovine serum albumine and sodium azide (<0.1%). After opening, store the vial one week at 2-8°C or at < -18°C until the expiration date of the kit. Calibrators are verified to an internal reference standard.

**Control sample: one 1 mL vial** (ready-to-use)

The vial contains non-acylated histamine, in buffer with bovine serum albumine and sodium azide (<0.1%). The expected values are in the concentration range indicated on the vial label. After opening, store the vial one week at 2-8°C or at < -18°C until the expiration date of the kit.

**Acylation reagent: one vial** (powder)

The content of the vial must be dissolved just before use in the volume of DMSO stated on the label. The dissolved reagent is stable at < -18°C until the expiration date of the kit. Avoid repeated freezing and thawing.

**Acylation buffer: one 5 mL vial** (ready-to-use)

After opening, store the vial at 2-8°C until the expiration date of the kit.

**Histamine release buffer: one vial** (lyophilized)

The buffer contains bovine serum albumine. Reconstitute with 25 mL of distilled water. After opening, store the vial at < -18°C until the expiration date of the kit.

**DMSO: one 3 mL vial** (ready-to-use)

Let the solvent equilibrate at 18-25°C until completely melted.

**Wash solution (20x): one 50 mL vial**

Concentrated solution has to be diluted before use. Stability after dilution: one month at 2-8°C or at < -18°C until the expiration date of the kit.

**Substrate buffer: one 30 mL vial** (ready-to-use)

The substrate buffer is a diethanolamine-HCl solution.

**Substrate: two tablets**

The substrate paranitrophenyl phosphate working solution is prepared at least 30 minutes before use, by dissolving one tablet in 15 mL of substrate

buffer. The solution is stable 24 hours at 2-8°C or stored at < -18°C until the expiration date of the kit.

**Stop solution: one 6 mL vial** (ready-to-use)

This solution is a 1N NaOH solution. The solution is stable at 2-8°C until the expiration date of the kit.

**Vial for conjugate: one vial**

Empty vial for fusion of reconstituted conjugates.

## MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

### For the immunoassay:

- plastic tubes (3 or 5 mL)
- precision micropipets (20-200, 200-1,000 µL)
- repeating micropipets (25, 200 µL)
- "vortex" type mixer
- microtiter plate shaker
- microtiter plate washer (optional)
- microtiter plate reader (405-414 nm)

For histamine release:

- spherical or conical wells microtiter plates (or plastic tubes)
- 37°C water bath
- refrigerated centrifuge for plates (or tubes)

For solid sample processing:

- Perchloric acid (HClO<sub>4</sub>).
- Potassium borate (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## PROCEDURE

### Preparation of reagents

- Let the reagents come to room temperature.
- Reconstitute the histamine release buffer with 25 mL of distilled water.
- Dissolve just before use acylation reagent with the volume of DMSO stated on the label. If several vials are needed, pool after dissolution.
- Reconstitute the conjugates with the volume of diluent stated on the vial labels. Wait 20 minutes before mixing. Then pour the content of both vials with reconstituted conjugate into Vial for conjugate.
- Pour the content of the wash solution concentrated vial into 950 mL of distilled water and homogenize.
- Prepare the substrate in dissolving one tablet in 15 mL of substrate buffer at least 30 minutes before use.

### Preparation of samples: acylation

The assay procedure includes an acylation step for samples, calibrators or controls. The acylated samples are quite stable and may be stored 3 days at 2-8°C.

### Procedure

Acylation step	Immunological step	Enzymatic step	Reading
To clean plastic tubes, add 25µL of acylation buffer, 100 µL of calibrator, control or sample, 25 µL of acylation solution and vortex immediately.	To antibody coated wells add 50 µL of acylated sample, control or calibrator and 200 µL of conjugate. Incubate 2 hours at 2-8°C with shaking (350 rpm).*	Wash 3 times with 350 µL of diluted wash solution.** Add 200 µL of substrate. Incubate 30 minutes at 18-25°C with shaking (350 rpm)* in the dark.	Add 50 µL of stop solution.  Read absorbance at 405-414 nm.

\* Alternatively incubate 18 hours without shaking at 2-8°C. Then, enzymatic step needs to be reduced to 20 minutes.

\*\* Plate washing: This step is essential to obtain the expected kit performance. After washing, wells must not dry prior to the addition of the next reagent.

Using a microtiter plate washer

Select a three cycle plate washing program that meets the following cycle criteria:

- Fluid in wells must be completely aspirated
- Wells must be filled to the rim with the wash solution
- Wash solution must be injected rapidly (typically one second to fill one well)
- After the three cycles, wash solution must be completely aspirated

Manual procedure

Repeat at least three cycles as follows:

- Turn plate upside-down and shake vigorously over the sink
- Fill wells with wash solution, the solution may run over the rim of the wells
- Turn plate upside-down and shake vigorously over the sink, and firmly tap the inverted microtiter plate onto a clean absorbent paper

## RESULTS

Results are obtained from the standard curve by interpolation. The curve serves for the determination of histamine concentration in samples measured at the same time as the calibrators.

### Standard curve

The results in the quality control department were calculated using *spline* curve fit with *B/T* or *B/B<sub>0</sub>* on the logit vertical axis and analyte concentration of the calibrators on the log horizontal axis (nM).

Other data reduction methods may give slightly different results.

Calibrators	Histamine (nM)	Absorbance	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1.523	100
1	0.90	1.428	93.2
2	2.60	1.269	81.8
3	8.20	0.969	60.1
4	24.0	0.623	35.2
5	83.0	0.328	13.9

(Example of standard curve, do not use for calculation.)

### Samples

- Plasma concentrations correspond to values read off the standard curve.
- Values obtained for released histamine must be multiplied by 10.5.
- Values obtained for total histamine must be multiplied by 20.
- Other samples results must be corrected for the proper dilution factor.

## EXPECTED VALUES

We recommend each laboratory to establish its own reference values. The following values obtained from healthy subjects are indicative only.

- Plasma: < 10 nM (1 ng/mL)
- Whole blood: 200-2,000 nM (20-200 ng/mL)
- Positive cell challenge: >10% of total histamine
- Spontaneous histamine release: < 5% of total histamine
- Urine: 10-35 µg/g of creatinin

## QUALITY CONTROL

Good laboratory practices imply that control samples be used regularly to ensure the quality of the results obtained. These samples must be processed exactly the same way as the assay samples, and it is recommended to analyze their results using appropriate statistical methods.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address: imunochem@beckman.com

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(For more details, see the data sheet "APPENDIX")

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

**Sensitivity**

**Analytical sensitivity:** 0.52 nM

**Specificity**

The immunoassay is specific of histamine.

**Precision****Intra-assay**

EDTA plasma samples were assayed 25 times in the same series. The coefficients of variation were found below or equal to 11.0%.

**Inter-assay**

EDTA plasma samples were assayed in duplicate in 10 different series. Coefficients of variation were found below or equal to 13.6%.

**Accuracy****Dilution test**

High-concentration EDTA plasma samples were serially diluted with the zero calibrator. The recovery percentages obtained were between 95.1% and 119%.

**Recovery test**

Low-concentration EDTA plasma samples were spiked with know quantities of histamine. The recovery percentages obtained were between 92.2% and 119%.

**Measurement range** (from analytical sensitivity to highest calibrator):

0.52 to approximately 100 nM.

**LIMITATIONS**

The non-respect of the instructions in this package insert may affect results significantly. Results should be interpreted in the light of the total clinical presentation of the patient, including clinical history, data from additional tests and other appropriate information.

**Interference**

Do not use hemolyzed, lipemic or icteric samples.

Pregnant women blood contains high levels of diamine oxydase and cannot be used.

Material containing amine other than histamine at a concentration in excess of 10 mM interferes with the acylation of histamine.

Phenol inhibits histamine release.

Histamine may be a component of allergen such as hymenopteran venom.

---

## EIA Histamine

**REF** IM2562

### ENZYMO IMMUNO ESSAI POUR LE DOSAGE IN VITRO DE L'HISTAMINE DANS LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Pour un usage diagnostique *in vitro*.

### PRINCIPE

Le dosage immunoenzymatique de l'histamine est un dosage par compétition. L'histamine des échantillons, contrôles ou calibrateurs est initialement chimiquement modifiée en histamine acylée. L'histamine acylée est ensuite incubée dans des puits recouverts d'anticorps monoclonal, en présence d'histamine acylée conjuguée à de la phosphatase alcaline. Après incubation, les puits sont lavés pour éliminer les composants non liés. L'activité enzymatique liée est mesurée par addition d'un substrat chromogène. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de la courbe standard.

### AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

#### Précautions générales

- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Les flacons de calibrateurs et de contrôles doivent être ouverts des temps aussi courts que possible afin d'éviter une évaporation trop importante.
- Effectuer simultanément la courbe standard et le dosage des échantillons.
- Il est recommandé de réaliser les dosages en double.
- Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire avant utilisation.
- Manipuler le substrat avec des pinces, le contact avec la peau peut altérer ce réactif.
- Le port de gants est recommandé pour éviter une contamination par de l'histamine exogène produite par transpiration.
- L'histamine s'adsorbe sur le verre, utiliser exclusivement du matériel en plastique : pipettes, tubes etc.

#### L'azoture de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme agent de conservation. L'azoture de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre ou le laiton pour former des azides métalliques explosifs. L'élimination de l'azoture de sodium doit se faire conformément aux réglementations locales en vigueur.

#### Les produits d'origine humaine

Tous les échantillons de sang doivent être manipulés comme étant susceptibles de contenir les virus de l'hépatite ou du SIDA et les déchets doivent éliminés selon les réglementations nationales en vigueur.

### CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Wash Solution (20x)

DANGER



H360

Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.

P201

Se procurer les instructions avant utilisation.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P308+P313

EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.

Acide borique 0,1 - 0,3 %  
Borate de sodium décahydraté 0,1 - 0,3 %

Stop Solution (NaOH)

DANGER



H314

Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P301+P330+P331

EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. Ne PAS faire vomir.

P303+P361+P353

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : rincer la peau à l'eau.

P305+P351+P338

EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P310

EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Hydroxyde de sodium 3 - 6 %

Substrate buffer

DANGER



H316

Provoque une légère irritation cutanée.

H318

Provoque de graves lésions des yeux.

H373

Risque d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P305+P351+P338

EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P310

EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P314

Demander un avis médical/Consulter un médecin en cas de malaise.

P332+P313

En cas d'irritation cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

Diéthanolamine 7 - 10 %

Conjugate diluent

DANGER



H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.  
 P201 Se procurer les instructions avant utilisation.  
 P280 Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.  
 P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.  
 Acide borique 0,1 - 0,5 %

Conjugate

DANGER



H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.  
 P201 Se procurer les instructions avant utilisation.  
 P280 Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.  
 P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.  
 Acide borique 0,5 - 1 %

DMSO

ATTENTION



H227 Liquide combustible  
 H315 Provoque une irritation cutanée.  
 H319 Provoque une sévère irritation des yeux.  
 H335 Peut irriter les voies respiratoires.  
 P261 Éviter de respirer les vapeurs.  
 P280 Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.  
 P304+P340 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.  
 P312 Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.  
 P337+P313 Si l'irritation des yeux persiste : demander un avis médical/consulter un médecin.  
 P403+P233 Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.  
 Diméthyle sulfoxyde > 95 %

Acylation Buffer

DANGER



H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.  
 P201 Se procurer les instructions avant utilisation.  
 P280 Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.  
 P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.  
 Acide borique 1 - 5 %

**SDS**

La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## PRÉLÈVEMENT, PRÉPARATION, CONSERVATION ET DILUTION DES ÉCHANTILLONS

### Plasma

- recueillir le sang dans des tubes contenant de l'EDTA exclusivement et refroidir immédiatement dans la glace.
- séparer le plasma des cellules par centrifugation 10 minutes à 900 g, à 4 °C dans les 20 minutes qui suivent le prélèvement
- prélever les 2/3 supérieurs du plasma
- les échantillons plasmatiques peuvent être dilués en PBS

### Urine

- Recueillir l'urine dans un flacon en plastique sur un agent bactériostatique, ou congeler l'échantillon.
- diluer l'urine au 1/25 en PBS

### Histamino-libération dans le sang total

Ne jamais vortexer les suspensions cellulaires.

**Prélèvement sanguin :** recueillir 1 à 2 mL de sang total sur héparine exclusivement. Ne pas utiliser d'EDTA. Si l'histamino-libération ne peut être faite immédiatement, conserver le tube à 18-25 °C pendant 24 heures au maximum.

**Histamine totale, lyse cellulaire :** prélever 50 µL de sang total et diluer au 1/20 par 950 µL d'eau distillée. Congeler et décongeler 2 fois le tube.

### Stimulation cellulaire :

- agent histamino-libérateur :** préparer une série de tubes ou puits contenant 50 µL de l'agent histamino libérateur à tester à différentes concentrations et ajouter à chaque tube ou puits 100 µL de sang total dilué au 1/7 en tampon d'histamino-libération (ex. 500 µL de sang total + 3 mL de tampon). Incuber les tubes ou la plaque avec un couvercle 30 minutes à 37 °C.
- histamino-libération spontanée :** distribuer 100 µL de sang dilué au 1/7 en tampon d'histamino-libération dans un tube ou puits contenant 50µL de tampon d'histamino-libération. Incuber le tube ou la plaque avec un couvercle 30 minutes à 37 °C. Les volumes peuvent être doublés si les stimulations cellulaires sont réalisées en tube.
- Récupération de l'histamine libérée :** centrifuger à <4 °C pendant 5 minutes à 900 g, puis placer la plaque sur de la glace pilée. Prélever 100 µL de surnageant en prenant soin de ne pas pipeter le culot de cellules.

### Autres échantillons liquides

Recueillir les échantillons dans des tubes en plastique.

### Echantillons solides

Extraire l'histamine à raison de 10 µL de HClO<sub>4</sub> 0,2N par milligramme de tissu, broyer ou soniquer puis centrifuger à 10 000 g pendant 5 minutes à <4 °C. Recueillir le surnageant et filtrer si nécessaire, puis neutraliser à pH 6-8 en

ajoutant le même volume de borate de potassium 1 M. Centrifuger à 10000 g, 1 minute à <4 °C, recueillir le surnageant dans un tube plastique.

#### Conservation des échantillons

Conserver tout type d'échantillon à l'exception des stimulations cellulaires, dans des tubes en plastique à < -18 °C si le dosage n'est pas réalisé immédiatement.

## MATÉRIEL FOURNI

Tous les réactifs de la trousse conservés non ouverts à 2-8 °C sont stables jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette de la trousse.

Dates d'expiration imprimées sur les étiquettes des flacons, concernent uniquement le stockage à long terme des réactifs par le fabricant, avant l'assemblage de la trousse. Ne pas en tenir compte.

**Plaque de microtitration : 12 x 8 puits revêtus d'anticorps anti-histamine** (prêts à l'emploi)

Conserver à 2-8 °C les puits non utilisés dans le sachet à glissière fourni.

**Conjugué histamine-phosphatase alcaline : 2 flacons** (lyophilisés)

Le flacon contient un conjugué lyophilisé de phosphatase histamine-alcaline en présence d'albumine sérique d'origine bovine. Reconstituer le conjugué à l'aide du volume de diluant conjugué indiqué sur l'étiquette du flacon et verser le contenu des deux flacons de conjugué reconstitué dans le flacon de conjugué. Après reconstitution, le conjugué est stable pendant une semaine à 2-8 °C ou à < -18 °C jusqu'à la date d'expiration du kit.

**Diluant : un flacon de 25 mL** (prêt à l'emploi)

Le diluant est utilisé pour reconstituer le conjugué. Après ouverture, conserver le flacon à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**Calibrateurs : 6 flacons de 1 mL** (prêts à l'emploi)

Les flacons de calibrateur contiennent entre 0 à environ 100 nM d'histamine non-acylée, en solution en présence d'albumine sérique bovine et d'azide de sodium (<0,1 %). Après ouverture, conserver les flacons une semaine à 2-8 °C ou aliquotés à < -18 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse. Les calibrateurs sont validés sur un standard interne de référence.

**Sérum de contrôle : 1 flacon de 1 mL** (prêt à l'emploi)

Le flacon de contrôle contient de l'histamine non-acylée, en solution en présence d'albumine sérique bovine et d'azide de sodium (<0,1 %). Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon. Après ouverture, conserver le flacon une semaine à 2-8 °C ou aliquoté à < -18 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**Réactif d'acylation : un flacon** (poudre)

Le contenu du flacon doit être dissout juste avant utilisation du volume de DMSO indiqué sur l'étiquette. Le réactif dissout est stable à < -18 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur le kit. Éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

**Tampon d'acylation : 1 flacon de 5 mL** (prêt à l'emploi)

Après ouverture, conserver les flacons à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**Tampon d'histamino-libération : 1 flacon** (lyophilisé)

Le tampon contient de la sérum albumine bovine. Reconstituer le contenu du flacon par 25 mL d'eau distillée. Après ouverture, conserver les flacons à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**DMSO : 1 flacon de 3 mL** (prêt à l'emploi)

Laisser le DMSO s'équilibrer à 18-25 °C jusqu'à fusion complète.

**Solution de lavage (20x) : un flacon de 50 mL**

Diluer 50 mL de la solution de lavage concentrée (20 X) avec 950 mL d'eau distillée. La dilution est stable un mois à 2-8 °C ou à < -18 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**Tampon substrat : 1 flacon de 30 mL** (prêt à l'emploi)

Ce tampon contient de la diéthanolamine.

**Substrat : 2 tablettes**

La solution de substrat (para-nitro phényl phosphate) se prépare au moins 30 minutes avant utilisation en dissolvant une tablette dans 15 mL de tampon. La solution est stable 24 heures à 2-8 °C ou à < -18 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**Solution d'arrêt : 1 flacon de 6 mL** (prête à l'emploi)

Ce tampon contient de la soude 1N. Après ouverture, conserver le flacon à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

**Flacon de conjugué : un flacon**

Vider le flacon destiné à la fusion des conjugués reconstitués.

## MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

En plus de l'équipement de laboratoire usuel, il est nécessaire d'utiliser le matériel suivant :

**Pour l'immunoessai :**

- tubes plastique (3 ou 5 mL)
- micropipettes de précision (20-200, 200-1 000 µL)
- micropipettes à répétition (25, 200 µL)
- agitateur de type "vortex"
- agitateur de microplaque
- laveur de microplaque (optionnel)
- lecteur de microplaque (405-414 nm)

**Pour l'histamino-libération:**

- plaques de microtitration à puits à fond rond ou conique (ou tubes en plastique)
- étuve à 37 °C ou bain marie
- centrifugeuse réfrigérée pour plaques (ou tubes)

**Pour les dosages d'échantillons solides:**

- Acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>).
- Borate de potassium (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## PROCÉDURE

**Préparation des réactifs**

- Equilibrer les réactifs à température ambiante.
- Reconstituer le tampon d'histamino-libération avec 25 mL d'eau distillée.
- Dissoudre juste avant utilisation du réactif d'acylation dans le volume de DMSO indiqué sur l'étiquette. Si plusieurs flacons sont nécessaires, grouper après dissolution.
- Reconstituer les conjugués à l'aide du volume de diluant indiqué sur les étiquettes des flacons. Attendre 20 minutes avant de mélanger. Puis verser le contenu des deux flacons de conjugué reconstitué dans le flacon de conjugué.
- Diluer le contenu du flacon de solution de lavage concentrée dans 950mL d'eau distillée et homogénéiser.
- Dissoudre une tablette de substrat dans 15 mL de tampon substrat au minimum 30 minutes avant utilisation.

**Préparation des échantillons : acylation**

Le protocole du dosage comprend une étape d'acylation des échantillons, calibrateurs et contrôles. L'histamine acylée est très stable et les échantillons acylés peuvent être conservés 3 jours à 2-8 °C.

**Procédure**

Acylation	Etape immunologique	Etape enzymatique	Lecture
Dans un tube propre, ajouter 25 µL de tampon d'acylation 100 µL de calibrateur, contrôle ou échantillon 25µL de solution d'acylation et vortexer immédiatement.	Déposer dans les puits 50 µL de calibrateur, contrôle ou d'échantillon acylé puis 200µL de conjugué. Incuber 2 heures à 2-8 °C avec agitation* (350 rpm).	Laver trois fois avec 350 µL la solution de lavage diluée.** Ajouter 200 µL de substrat. Incuber 30 minutes à 18-25 °C sous agitation (350 rpm)* à l'obscurité.	Ajouter 50 µL de solution d'arrêt.          Lire l'absorbance à 405-414 nm.

\* Laisser incuber 18 heures sans secouer à 2-8 °C. La phase enzymatique doit ensuite être réduite à 20 minutes.



\*\* lavage des plaques : cette étape est essentielle pour obtenir les performances attendues. Après le lavage, les puits ne doivent pas sécher avant l'ajout du réactif suivant.

Avec un laveur automatique

Sélectionner un cycle de trois lavages qui réponde aux critères suivants:

- Le liquide doit être complètement aspiré dans les puits.
- Les puits doivent être remplis jusqu'au bord avec la solution de lavage.
- La solution de lavage doit être injectée rapidement (par exemple 1 seconde par puits)
- à la fin des 3 cycles, la solution de lavage doit être complètement aspirée.

Lavage manuel

Répéter au moins 3 fois le cycle suivant :

- Renverser vigoureusement la plaque au-dessus de l'évier
- Remplir les puits jusqu'au bord avec la solution de lavage (les puits peuvent déborder)
- Renverser vigoureusement la plaque au-dessus de l'évier et la dernière fois, tapoter fermement la plaque renversée sur du papier absorbant.

## RÉSULTATS

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux d'histamine des échantillons dosés en même temps que les calibrateurs.

### Courbe standard

Les résultats obtenus par le service chargé du contrôle de la qualité ont été calculés en utilisant un ajustement de courbe *spline* avec  $B/T$  ou  $B/B_0$  sur l'axe vertical logit et la concentration en substance à analyser des calibrateurs sur l'axe horizontal logarithmique (nM).

L'utilisation d'un autre mode de calcul peut conduire à des résultats légèrement différents.

Calibrateurs	Histamine (nM)	Absorbance	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Exemple de courbe standard, ne pas utiliser pour les calculs).

### Echantillons

- Concentrations plasmatiques : lecture directe sur la courbe.
- Histamino libération, corriger d'un facteur de dilution 10,5.
- Histamine totale, corriger d'un facteur de dilution 20.
- Autres échantillons, corriger du facteur de dilution utilisé.

## VALEURS ATTENDUES

Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de références. Les valeurs suivantes, déterminées chez des sujets présumés sains, sont données à titre indicatif.

- Plasma : <10 nM (1 ng/mL)
- Sang total : 200-2 000 nM (20-200 ng/mL)
- Histamino-libération positive : > 10 % l'histamine totale correspondant
- Histamino-libération spontanée : < 5 % de l'histamine totale correspondant
- Urine : 10-35 µg/g de créatinine

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosage pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter notre service Support Technique. E-mail : [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## PERFORMANCES DU DOSAGE

(Voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

Les données représentatives ne sont fournies qu'à titre d'illustration. Les performances obtenues dans les laboratoires individuels peuvent varier.

### Sensibilité

**Sensibilité analytique** : 0,52 nM

### Spécificité

Le dosage est spécifique de l'histamine.

### Précision

#### Intra-essai

Des échantillons plasma EDTA ont été dosés 25 fois dans une même série. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 11,0 %.

#### Inter-essais

Des échantillons plasma EDTA ont été dosés dans 10 séries différentes en doublet. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 13,6 %.

### Exactitude

#### Epreuve de dilutions

Des échantillons plasma EDTA de concentration élevée ont été dilués dans le calibrateur zéro de la trousse. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 95,1 et 119 %.

#### Epreuve de surcharge

Des quantités connues d'histamine ont été ajoutées à des échantillons plasma EDTA de faible concentration. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 92,2 % et 119 %.

**Plage de mesure** (de la sensibilité analytique au calibrateur le plus élevé) :

0,52 à approximativement 100 nM.

## LIMITES

Le non-respect des recommandations indiquées dans cette notice peut avoir un impact significatif sur les résultats. Les résultats doivent être interprétés à la lumière du dossier clinique complet du patient, incluant l'historique clinique et les données des tests additionnels et toute autre information appropriée.

### Interférences

Ne pas utiliser de spécimens hémolysés, icteriques ou lipémiques.

Le sang des femmes enceintes contient d'importantes quantités de diamine oxydase et ne doit pas être dosé.

Des échantillons contenant des amines autres que l'histamine à une concentration supérieure à 10 mM interfèrent avec l'acylation de l'histamine.

Le phénol inhibe la libération d'histamines.

L'histamine peut être un composant de certains allergènes comme le venin d'hyménoptère.

# EIA Histamine

**REF** IM2562

## IMMUNOENZYMOMETRISCHER ASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE IN VITRO BESTIMMUNG VON HISTAMIN IN BIOLOGISCHEN PROBEN

*In-vitro*-Diagnostikum.

### PRINZIP

Der Enzymimmunoassay für die Histaminbestimmung ist ein kompetitiver Assay. Im ersten Schritt wird Histamin von Proben, Kontrollen oder Kalibrators mittels einer chemischen Reaktion in azyliertes Histamin umgewandelt. Im zweiten Schritt wird das azylierte Histamin zusammen mit einem Histamin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Kavitäten inkubiert. Nach der Inkubation werden die Kavitäten gewaschen um ungebundene Komponenten zu entfernen. Die gebundene enzymatische Aktivität wird dann durch die Zugabe eines chromogenen Substrats gemessen.

### WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

#### Allgemeinhinweise:

- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Die Kalibrator- und Kontrollfläschchen sollten so kurz wie möglich geöffnet werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Die Reagenzien sollten Raumtemperatur haben vor dem Pipettieren.
- Der Kontakt der Substrat-Tablette mit Haut kann das Produkt beschädigen, benutzen Sie Pinzetten.
- Das Tragen von Handschuhe wird empfohlen, um eine Kontamination mit exogenem Histamin (z. B; Schweiß) zu vermeiden.
- Histamin adsorbiert an Glas, verwenden Sie nur Plastikmaterial: Pipetten, Röhrchen usw.

#### Natriumazid

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing reagieren und dabei explosive Metallazide bilden. Natriumazid muss entsprechend den örtlichen behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

#### Bestandteile menschlichen Ursprungs

Mit allen Blutproben ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche Ansteckungsgefahr mit Hepatitis oder AIDS bestünde und Abfälle entsprechend den jeweiligen Länderbestimmungen entsorgt werden.

### GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Wash Solution (20x) **GEFAHR**



H360

Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

P201

Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P308+P313

BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.  
Borsäure 0,1 - 0,3 %  
di-Natriumtetraborat-Decahydrat 0,1 - 0,3 %

Stop Solution (NaOH) **GEFAHR**



H314

Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

P280

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P301+P330+P331

BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.

P303+P361+P353

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Haut mit Wasser abwaschen.

P305+P351+P338

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P310

Sofort GIFTNOTRUFZENTRALE oder Arzt anrufen.  
Natriumhydroxid 3 - 6 %

Substrate buffer

**GEFAHR**



H316

Verursacht leichte Hautreizungen.

H318

Verursacht schwere Augenschäden.

H373

Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.

P280

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P305+P351+P338

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P310

Sofort GIFTNOTRUFZENTRALE oder Arzt anrufen.

P314

Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P332+P313

Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.  
Diethanolamin 7 - 10 %

**GEFAHR**



H360

Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

P201

Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

Conjugate diluent

	P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Borsäure 0,1 - 0,5 %

P308+P313

BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.  
Borsäure 1 - 5 %

Conjugate

GEFAHR



	H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
	P201	Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
	P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Borsäure 0,5 - 1 %

DMSO

ACHTUNG



	H227	Brennbare Flüssigkeit.
	H315	Verursacht Hautreizungen.
	H319	Verursacht schwere Augenreizung.
	H335	Kann die Atemwege reizen.
	P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
	P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P304+P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
	P312	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
	P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
	P403+P233	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Dimethylsulfoxid > 95 %

Acylation Buffer

GEFAHR



	H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
	P201	Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
	P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.



Das Sicherheitsdatenblatt ist auf [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs) verfügbar.

## PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND -VERDÜNNUNG

### Plasma

- Das Blut in kalten Röhrchen, die nur EDTA enthalten, sammeln und sofort in Eis stellen
- zentrifugation 10 min bei 900g, 4 °C innerhalb von 20 min nach Probenentnahme
- Die oberen 2/3 des Plasmas absaugen
- Plasma Proben können in PBS verdünnt werden

### Urin

- Urin in Plastikgefäßen sammeln, versetzt mit Bakterioostatika, oder direkt einfrieren.
- Urinproben vor Austestung 1:25 in PBS verdünnen

### Histaminfreisetzung in Vollblut

Die Zellsuspensionen dürfen nicht gevortext werden;

Blutentnahme: nehmen Sie 1 bis 2 mL totales Blut ab, das nur Heparin enthält (nicht EDTA!). Wenn Histaminfreisetzung verschoben werden muss, sollte das Röhrchen bei 18-25 °C maximal 24 Stunden gelagert werden.

Totales Histamin nach Zellyse: 50 µL totales Blut abnehmen und mit 950 µL destilliertem Wasser 1:20 verdünnen. Das Röhrchen zweimal auftauen und einfrieren.

### Stimulation der Zellen:

- **Histaminfreisetzung:** Das Vollblut 1:7 mit Histamin-Freisetzungspuffer verdünnen (z.B. 500 µL Vollblut + 3 mL Puffer). Geben Sie 50 µL verschiedener Verdünnungen des Histaminfreisetzungsstimulators in die Röhrchen oder Kavitäten, dann 100 µL des 1:7 verdünnten Blutes. Die Platte zudecken und 30 Minuten bei 37 °C inkubieren (für Stimulation in Röhrchen können die Volumen verdoppelt werden.)
- **Spontane Histaminfreisetzung:** 50 µL Histamin-Freisetzungspuffer in die Kavitäten einer Platte geben, dann 100 µL des 1:7 verdünnten Blutes zugeben. Die Platte zudecken und 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- **Gewinnung des freigesetzten Histamins:** 5 Minuten mit 900g bei 4 °C zentrifugieren und sofort in Eis stellen. Nehmen Sie vorsichtig 100 µL des Überstandes ab, ohne das Pellet zu stören

### Flüssige Proben

Sammeln Sie die Proben in Plastikröhrchen

### Gewebeproben

Das Histamin mit 10 µL 0.2N HClO<sub>4</sub> pro mg Gewebe extrahieren. Das Gewebe mit Ultraschall oder einem Gewebhomogenisator homogenisieren und bei 10000g bei 4 °C zentrifugieren. Den Überstand sammeln und, wenn notwendig, durch Filtration aufreinigen. Den Überstand durch Zugabe des gleichen Volumens 1M Kaliumumborat neutralisieren (pH 6-8) und für 1 Minute bei 10000 g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand in Plastikröhrchen sammeln.

### Lagerung der Proben

Bei Verzögerung des Immunoassays, sollten die Proben bei < -18 °C in Plastikröhrchen gelagert werden, ausgenommen die Proben aus der Zell-stimulation.

## MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Die Reagenzien im ungeöffneten Kit sind, bei Lagerung von 2-8 °C, verwendbar bis zum Verfallsdatum.

Auf die Fläschchen gedruckte Verfallsdaten betreffen nur die Langzeitlagerung beim Hersteller, vor der Zusammensetzung des Kits. Bitte nicht beachten.

**Platten mit anti-Histamin Antikörpern beschichtet: 12 x 8 Kavitäten** (gebrauchsfertig)

Ungenutzte Streifen können bei 2–8 °C in der mitgelieferten selbstverschließenden Tüte gelagert werden.

**Histamin-Alkalische Phosphatase-Konjugat: 2 Fläschchen** (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält Histamin-Alkali-Phosphatase-Konjugat, das in der Gegenwart von Rinderserumalbumin lyophilisiert wurde. Rekonstituieren Sie das Konjugat mit dem auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen des Verdünnungsmittels und schütten Sie anschließend den Inhalt beider Fläschchen mit dem rekonstituierten Konjugat in das Fläschchen für Konjugat. Nach der Rekonstitution bleibt das Konjugat eine Woche bei 2–8 °C oder bei < -18 °C bis zum im Kit angegebenen Verfallsdatum stabil.

**Verdünner: eine Flasche 25 mL** (gebrauchsfertig)

Der Verdünner wird für die Rekonstitution des Konjugats benutzt; Stabilität nach Öffnung bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum.

**Kalibrators: sechs Flaschen je 1mL** (gebrauchsfertig)

Die Kalibrators enthalten Histamin-Konzentrationen von 0 bis ungefähr 100nM nicht-azyliertem Histamin, gelöst in Puffer mit Bovinem Serum Albumin und Natriumazid (<0,1 %). Nach der Öffnung können die Flaschen eine Woche bei 2-8 °C gelagert werden oder bei < -18 °C bis zum Verfallsdatum. Die Kalibratoren wurden alle verifiziert an einem internen Referenzstandard.

**Kontrollprobe: ein 1 mL Fläschchen** (gebrauchsfertig)

Die Flasche enthält nicht-azyliertes Histamin in Puffer mit Bovinem Serum Albumin und Natriumazid (<0,1 %). Die erwarteten Werte liegen im Konzentrationsbereich, der auf der Flasche angegeben ist. Stabilität nach Öffnung der Flasche: eine Woche bei 2-8 °C, bei < -18 °C bis zum Verfallsdatum.

**Acylierungsreagenz: ein Fläschchen** (Pulver)

Der Inhalt des Fläschchens muss unmittelbar vor dem Gebrauch in dem auf dem Etikett angegebenen DMSO-Volumen aufgelöst werden. Das aufgelöste Reagenz ist bei Temperaturen < -18 °C bis zum Verfallsdatum des Kits stabil. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

**Azylierungspuffer: eine Flasche, 5 mL** (gebrauchsfertig)

Nach der Öffnung sollte die Flasche bei 2-8 °C gelagert werden, bis zum Verfallsdatum.

**Puffer für Histaminfreisetzung** (lyophilisiert)

Der Puffer enthält Bovines Serum Albumin. Rekonstituieren Sie mit 25mL destilliertem Wasser. Nach der Öffnung sollte die Flasche bei < -18 °C gelagert werden, bis zum Verfallsdatum.

**DMSO: eine Flasche, 3 mL** (gebrauchsfertig)

Bei 18-25 °C vollständig schmelzen lassen.

**Waschlösung (20x): eine Flasche 50 mL**

Die konzentrierte Lösung muss vor Gebrauch verdünnt werden. Stabilität nach Verdünnung: eine Woche bei 2-8 °C, bei < -18 °C bis zum Verfallsdatum.

**Substrat-Puffer: eine Flasche 30 mL** (gebrauchsfertig)

Der Substrat-Puffer ist eine Diethanolamin-HCl-Lösung.

**Substrat: zwei Tabletten**

Die para-Nitrophenylphosphat-Substratlösung muss mindestens 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden. Verdünnen Sie eine Tablette in 15 mL Substratpuffer. Die Lösung ist bei 2-8 °C 24 Stunden stabil oder kann bei < -18 °C bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

**Stoplösung: eine Flasche, 6 mL** (gebrauchsfertig)

Die Stop-Lösung ist eine 1N NaOH-Lösung. Stabilität: bei 2-8 °C haltbar bis zum Verfallsdatum.

**Fläschchen für Konjugat: ein Fläschchen**

Entleeren Sie das Fläschchen für eine Fusion der rekonstituierten Konjugate.

**ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN**

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

**Für den Enzymimmunoassay:**

- Plastikröhrchen (3 oder 5 mL)

- Präzisionspipetten (20-200 µL, 200-1 000 µL)
- halbautomatische Pipetten (25 µL, 200 µL)
- Vortex-Mixer
- Schüttler für Mikrotiterplatten
- Waschsystem für Mikrotiterplatten (optional)
- Lesegerät für Mikrotiterplatten (405-414 nm)

**Für Histaminfreisetzung:**

- Mikrotiterplatten mit runden oder konischen Kavitäten (oder Plastikröhrchen)
- 37 °C Inkubator oder Wasserbad
- Kühlzentrifuge für Mikrotiterplatten (oder Röhrchen)

**Für Gewebeprobe:**

- Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>).
- Kaliumborat (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

**VERFAHREN**

**Präparation der Reagenzien**

- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur annehmen.
- Rekonstitution des Histaminfreisetzungspuffers mit 25 mL destilliertem Wasser.
- Acylierungsreagenz unmittelbar vor dem Gebrauch in DMSO auflösen. Bezüglich des erforderlichen Volumens die Angaben auf dem Etikett beachten. Wenn mehrere Fläschchen benötigt werden, diese nach dem Auflösen sammeln.
- Rekonstituieren Sie die Konjugate mit dem auf den Etiketten der Fläschchen angegebenen Volumen des Verdünnungsmittels. Warten Sie 20 Minuten, bevor Sie mischen. Schütten Sie anschließend den Inhalt beider Fläschchen mit dem rekonstituierten Konjugat in das Fläschchen für Konjugat.
- Den Inhalt der konzentrierten Waschlösung-Flasche in 950 mL destilliertem Wasser verdünnen und mischen.
- Um das Substrat vorzubereiten, verdünnen Sie eine Substrattablette in 15 mL Substratpuffer mindestens 30 Minuten vor Gebrauch.

**Vorbereitung der Proben: Azylierung**

Die Testdurchführung enthält einen Schritt für Azylierung der Proben, Kalibrators oder Kontrollen. Azyliertes Histamin ist stabil. Die azylierten Proben können 3 Tage bei 2-8 °C gelagert werden.

**Testablauf**

Azylierungs-Schritt	Immunologischer Schritt	Enzymatischer Schritt	Messung
In saubere Plastikröhrchen, geben Sie: 25 µL Azylierungspuffer 100 µL Kalibrator, Proben oder Kontrollen 25 µL Azylierungsreagens sofort vortexen.	In mit Antikörperbeschichtete Kavitäten geben Sie: 50 µL Kalibrator, Proben oder Kontrollen und 200 µL Konjugat Für 2 Stunden bei 2-8 °C schütteln (350 rpm).*	Dreimal mit 350µL verdünnter Waschlösung waschen.** 200µL Substrat zugeben. Für 30 Minuten bei 18-25 °C im Dunkeln schütteln (350 rpm).*	50 µL Stoplösung zugeben.   Absorption bei 405-414 nm lesen.

\* Alternativ können Sie bei 2–8 °C 18 Stunden ohne Schütteln inkubieren. Anschließend muss die enzymatische Stufe auf 20 Minuten reduziert werden.

\*\* Waschen der Platte: Dieser Schritt ist wichtig um die beste Leistung des Kits zu erhalten. Nach dem Waschen dürfen die Kavitäten vor der Zugabe des nächsten Reagens nicht austrocknen.

Mit einem Mikrotiterplatten Waschsystem

Waschen Sie die Mikrotiterplatte 3 x mit einem Mikrotiterplatten Waschgerät, das folgende Kriterien erfüllt:

- Die Flüssigkeit in den Kavitäten muss vollständig abgesaugt werden.
- Die Kavitäten müssen mit Waschlösung vollständig gefüllt werden.

- Waschlösung muss schnell injiziert werden (eine Sekunde pro Kavität, z.B.).
- Nach dem dritten Waschen muss die Waschlösung vollständig abgesaugt werden.

Manueller Ablauf:

Den folgenden Zyklus mindestens dreimal wiederholen:

- Die Platte energisch über der Spüle umdrehen
- Die Kavitäten vollständig mit Waschlösung füllen (Kavitäten können überlaufen)
- Die Platte energisch über der Spüle umdrehen. Nach dem letzten Waschen, klopfen Sie energisch die umgedrehte Platte über der Spüle ab.

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse können durch Interpolation aus der Standardkurve, die im gleichen Ansatz bestimmt wurde, abgelesen werden.

### Standardkurve

Die Ergebnisse wurden in der Abteilung für Qualitätskontrolle anhand einer *Spline*-Kurvenanpassung mit *B/T* oder *B/B<sub>0</sub>* auf der vertikalen Logit-Achse und der Analytkonzentration der Kalibratoren auf der logarithmischen horizontalen Achse (nM) berechnet.

Andere Datenreduktions-Methoden können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen.

Kalibratoren	Histamin (nM)	Absorption	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung benutzen)

### Proben

- Plasma Konzentrationen sind auf der Kurve direkt abgelesen.
- Konzentrationswerte für das freigesetzte Histamin müssen mit 10,5 multipliziert werden.
- Konzentrationswerte für das totale Histamin müssen mit 20 multipliziert werden.
- Andere Proben müssen, wenn notwendig, mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

## ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte jedoch seinen eigenen Normalbereich in Gruppen von gesunden Testpersonen festlegen. Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie.

- Plasma: < 10 nM (1 ng/mL)
- Vollblut: 200-2 000 nM (20-200 ng/mL)
- Histaminfreisetzung, positiv: > 10 % des totalen Histaminwerts
- Spontane Histaminfreisetzung: < 5 % des totalen Histaminwerts
- Urin: 10-35 µg/g von Kreatinin.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Einhaltung der guten Laborpraxis (GLP) sollten regelmäßig Kontrollproben benutzt werden, um die Qualität der Ergebnisse zu sichern.

Diese Proben müssen in genau derselben Weise wie die Patientenproben getestet werden, und die Analyse der Ergebnisse sollte mit angebrachten statistischen Methoden stattfinden.

Im Falle von Verpackungsschäden oder einer Leistungsbeeinträchtigung des Produkts, kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Vertreter oder benutzen Sie die folgende e-mail: imunochem@beckman.com

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

(Für mehr Details, siehe die Beilage "APPENDIX").

Repräsentative Daten dienen nur der Veranschaulichung. Die in einzelnen Labors erzielten Leistungen können anders ausfallen.

### Empfindlichkeit

**Analytische Sensitivität:** 0,52 nM

### Spezifität

Dieser Immunoassay ist spezifisch für Histamin.

### Präzision

#### Intra-Assay

EDTA-Plasma Proben aus derselben Serie wurden 25 mal getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 11,0 %.

#### Inter-assay

EDTA-Plasma Proben wurden in Doppelbestimmung in 10 verschiedenen Serien getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 13,6 %.

### Genauigkeit

#### Verdünnungstest

Hoch konzentrierte EDTA-Plasma Proben wurden mit Nullkalibrator verdünnt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 95,1 % und 119 %.

#### Wiederfindungstest

Schwach konzentrierte EDTA-Plasma Proben wurden mit definierten Mengen Histamin vermischt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 92,2 % und 119 %.

**Meßbereich** (von der analytischen Sensitivität bis zum höchsten Kalibrator):

0,52 – ungefähr 100 nM.

## EINSCHRÄNKUNGEN

Die Nichtbeachtung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann die Ergebnisse signifikant beeinflussen. Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der gesamten klinischen Situation des Patienten unter Berücksichtigung seiner klinischen Vorgeschichte, den Ergebnissen anderer Testergebnisse sowie weiteren vorliegenden Informationen zu interpretieren.

### Interferenzen

Es dürfen keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwendet werden.

Das Serum schwangerer Frauen enthält hohe Konzentrationen Diaminoxidase und kann deshalb nicht benutzt werden.

Materialien, die mehr als 10mM von einem anderen Amin als Histamin enthalten, können die Histaminazylierung beeinflussen.

Phenol hemmt die Freisetzung von Histamin.

Histamin kann eine Komponente einiger Allergene sein, wie dem Gift der Hymenopteren.

# EIA Histamine

**REF** IM2562

## KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO DELL'ISTAMINA IN CAMPIONI BIOLOGICI Per uso diagnostico *in vitro*.

### PRINCIPIO

Il dosaggio dell'istamina è un metodo immunoenzimatico competitivo. L'istamina contenuta in calibratori, campioni e controlli è viene acilata con un primo passaggio chimico. L'istamina acilata viene poi incubata in pozzetti sensibilizzati con anticorpo monoclonale insieme ad istamina acilata coniugata con fosfatasi alcalina. Al termine dell'incubazione, i pozzetti vengono lavati per eliminare i componenti non legati. L'attività enzimatica legata è misurata con l'aggiunta di un substrato cromogeno cromogeno. La concentrazione di istamina nei campioni viene ricavata per interpolazione dalla curva standard.

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

#### Considerazioni generali:

- Non utilizzare reattivi di lotti diversi.
- Aprire i flaconi dei calibratori e controlli nel più breve tempo possibile per evitarne l'eccessiva evaporazione.
- Inserire la curva standard in ogni esperimento.
- Eseguire il dosaggio in duplicato.
- Prima dell'uso lasciare equilibrare i reattivi a temperatura ambiente.
- Manipolare il substrato con pinzette; il contatto con l'epidermide può alterare il reattivo.
- Si raccomanda di indossare guanti per evitare qualsiasi contaminazione con l'istamina esogena prodotta dalla sudorazione.
- L'istamina si adsorbe sul vetro, usare esclusivamente materiale in plastica: pipette, provette, etc.

#### Sodio azide

Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. Il sodio azide può reagire con piombo, rame o ottone per formare azidi metallici esplosivi. Il sodio azide deve essere smaltito in conformità alle norme di legge locali applicabili.

#### Materiale di origine umana

Manipolare tutti i campioni di sangue come potenziali fonti di infezioni. (Ad es. epatite o AIDS). I rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese.

### CLASSIFICAZIONE DEI PERICOLI GHS

Wash Solution (20x) PERICOLO



H360 Può nuocere alla fertilità o al feto.  
P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.  
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.  
P308+P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.  
Acido bórico 0,1 - 0,3%  
Decaidrato borato di sodio 0,1 - 0,3%

Stop Solution (NaOH) PERICOLO



H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

Substrate buffer

PERICOLO



H316

Provoca leggera irritazione cutanea.

H318

H373

Provoca gravi lesioni oculari. Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.

P280

Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.

P305+P351+P338

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P310

Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P314

In caso di malessere, consultare un medico.

P332+P313

In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Dietanalamina 7 - 10%

Conjugate diluent

PERICOLO



H360

Può nuocere alla fertilità o al feto.

P201

Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P280

Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.

P308+P313

IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Acido bórico 0,1 - 0,5%


Conjugate


PERICOLO




H360

Può nuocere alla fertilità o al feto.

	P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
	P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
	P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Acido bórico 0,5 - 1%
DMSO	ATTENZIONE	
		
	H227	Liquido combustibile.
	H315	Provoca irritazione cutanea.
	H319	Provoca grave irritazione oculare.
	H335	Può irritare le vie respiratorie.
	P261	Evitare di respirare i vapori.
	P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
	P304+P340	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
	P312	Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere.
	P337+P313	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
	P403+P233	Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. Dimetilsolfossido > 95%

Acylation Buffer	PERICOLO	
		
	H360	Può nuocere alla fertilità o al feto.
	P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
	P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
	P308+P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Acido bórico 1 - 5%

 La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile all'indirizzo [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## RACCOLTA, ANALISI, CONSERVAZIONE E DILUIZIONE DEL CAMPIONE

### Plasma

- raccogliere il sangue in provette fredde con EDTA come anticoagulante e porre immediatamente in bagno di acqua e ghiaccio. Non usare provette con altri anticoagulanti
- separare il plasma dalla parte corpuscolata per centrifugazione 10 minuti a 900 g a 4 °C, entro 20 minuti dalla raccolta del campione
- trasferire i 2/3 superiori di plasma
- il plasma può essere diluito con PBS

### Urine

- Raccogliere le urine in contenitori di plastica. Congelare i campioni o aggiungere un agente batteriostatico.
- diluire i campioni 1:25 con PBS

### Liberazione di istamina da sangue intero

Non agitare su vortex il campione.

**Raccolta del campione:** raccogliere 1-2 mL di sangue intero in provette contenenti eparina come anticoagulante. Non usare provette con EDTA. Dosare immediatamente il campione o conservare a 18-25 °C fino ad un massimo di 24 ore.

**Istamina totale dopo lisi cellulare:** Aggiungere 50 µL di sangue intero a 950 µL di acqua distillata (diluizione 1:20). Congelare e scongelare 2 volte.

Stimolo delle cellule:

- **per stimolare le cellule con l'agente per la liberazione dell'istamina,** diluire il sangue intero 1:7 con tampone per la liberazione dell'istamina (ad es. 500 µL di sangue intero + 3 mL di tampone). Nei pozzetti di una micropietra pipettare 50 µL di diluizioni diverse di agente per la liberazione dell'istamina e aggiungere 100 µL of di sangue diluito 1:7. Coprire la micropietra e incubare 30 minuti a 37 °C (tutti i volumi possono essere raddoppiati se le cellule vengono stimulate in provetta).
- **liberazione spontanea di istamina:** nella provetta o nel pozzetto di una micropietra pipettare 50 µL di tampone per la liberazione dell'istamina e aggiungere 100 µL di sangue diluito 1:7. Coprire la provetta o la micropietra e incubare 30 minuti a 37 °C. Tutti i volumi possono essere raddoppiati se le cellule vengono stimulate in provette.
- **recupero dell'istamina liberata:** centrifugare, a 4 °C o a temperature inferiori, 5 minuti a 900 g, porre la micropietra in ghiaccio dopo la centrifugazione e raccogliere 100 µL di surnatante senza risospingere il precipitato.

### Campioni liquidi

Raccogliere i campioni in provette di plastica.

### Campioni solidi.

Estrarre l'istamina con 10 µL HClO<sub>4</sub> 0.2N per mg di tessuto, omogeneizzare con sonicator o potter e centrifugare a 10.000 g per 5 minuti a 4 °C o a temperature inferiori. Raccogliere il surnatante e chiarificare, se necessario, per filtrazione. Neutralizzare (pH 6-8) il surnatante aggiungendo pari volume di borato di potassio 1 M. Centrifugare a 10.000 g, 1 minuto a 4 °C o a temperature inferiori. Raccogliere il surnatante in provette di plastica.

### Conservazione dei campioni.

Tranne i campioni di sangue intero per valutare la risposta allo stimolo, se non è possibile eseguire il dosaggio immediatamente, conservare tutti gli altri campioni a -18 °C o a temperature inferiori in provette di plastica.

## MATERIALI FORNITI

I reattivi, prima dell'apertura, sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza riportata sul kit.

Le date di scadenza riportate sulle etichette di ciascun flacone si riferiscono alla conservazione dei reattivi stabilita in produzione, prima del loro inserimento nel kit.

**Micropietra: 12 x 8 pozzetti sensibilizzati con anticorpo anti-istamina** (pronta per l'uso)

Le strisce non utilizzate devono essere conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C nel sacchetto con chiusura automatica in dotazione.

**Coniugato istamina-fosfatasi alcalina: Due flaconi** (liofilizzato)

La fiala contiene il coniugato di fosfatasi alcalina dell'istamina liofilizzato in presenza di albumina sierica bovina. Ricostituire il coniugato con il volume di diluente del coniugato riportato sull'etichetta della fiala e versare il contenuto di entrambe le fiale con il coniugato ricostituito nella fiala per coniugato. In seguito alla ricostituzione, il coniugato resta stabile per una settimana a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C o a una temperatura di < -18 °C fino alla data di scadenza del kit.

**Diluente: Un flacone 25 mL** (pronto per l'uso)

Il diluente viene usato per ricostituire il coniugato. Dopo l'apertura, il contenuto del flacone è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza del kit.

**Calibratori: Sei flaconi 1 mL** (pronti per l'uso)

I flaconi contengono istamina non acilata a concentrazioni comprese tra 0 e circa 100 nM in tampone con BSA e sodio azide (<0,1%). Dopo l'apertura, gli calibratori sono stabili fino a una settimana a 2-8 °C, o, suddivisi in aliquote, a -18 °C o a temperature inferiori fino alla data di scadenza del kit. Gli calibratori sono calibrati contro uno standard interno di riferimento.

**Siero di controllo: Un flacone 1 mL** (pronto per l'uso)

Il flacone contiene istamina non acilata in tampone con BSA e sodio azide (<0,1%). L'intervallo dei valori attesi è riportato sull'etichetta del flacone. Dopo l'apertura, il contenuto del flacone è stabile fino a una settimana a 2-8 °C, o, suddiviso in aliquote, a -18 °C o a temperature inferiori fino alla data di scadenza del kit.

**Reagente di acilazione: una fiala** (polvere)

Il contenuto della fiala deve essere disciolto subito prima di essere utilizzato nel volume di DMSO riportato sull'etichetta. Il reagente disciolto è stabile a una temperatura di < -18 °C fino alla data di scadenza del kit. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

**Tampone di acilazione: Un flacone 5 mL** (pronto per l'uso)

Dopo l'apertura, il tampone è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza del kit.

**Tampone per la liberazione dell'istamina: Un flacone** (liofilizzato)

Ricostituire il contenuto del flacone con 25 mL di acqua distillata. Dopo l'apertura, il tampone è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza del kit.

**DMSO: Un flacone (3 mL)** (pronto per l'uso)

Lasciare equilibrare a 18-25 °C fino a scioglimento completo del solvente.

**Soluzione di lavaggio (20x): Un flacone 50 mL**

Diluire 50 mL di soluzione di lavaggio concentrata (20x) con 950 mL di acqua distillata. La soluzione diluita è stabile fino a un mese a 2-8 °C, o a -18 °C o a temperature inferiori fino alla data di scadenza del kit.

**Tampone per il substrato: Un flacone 30 mL** (pronto per l'uso)

Il tampone contiene dietanolamina.

**Substrato: Due pastiglie**

La soluzione del substrato (paranitrofenilfosfato) deve essere preparata almeno 30 minuti prima dell'uso. Dissolvere ciascuna pastiglia con 15 mL di tampone. La soluzione è stabile fino a 24 ore a 2-8 °C, o, suddivisa in aliquote, a -18 °C o a temperature inferiori fino alla data di scadenza del kit.

**Soluzione di stop: Un flacone 6 mL** (pronto per l'uso)

La soluzione contiene NaOH 1N. Dopo l'apertura, la soluzione è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza del kit.

**Fiala per coniugato: una fiala**

Fiala vuota per la fusione dei coniugati ricostituiti.

**MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Oltre alla normale attrezzatura da laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

**Per il dosaggio immunoenzimatico:**

- provette in plastica (3 o 5 mL)
- micropipette di precisione (20-200, 200-1.000 µL)
- micropipette a ripetizione (25, 200 µL)
- agitatore tipo "vortex"
- agitatore per micropiastre
- lavatore di micropiastre (opzionale)
- lettore di micropiastre (405-414 nm)

Per la liberazione dell'istamina:

- micropiastre a fondo sferico o conico (o provette in plastica)
- termostato o bagno termostato a 37 °C
- centrifuga refrigerata per micropiastre (o provette)

Per il trattamento di campioni solidi:

- Acido perclorico (HClO<sub>4</sub>).
- Borato di potassio (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

**PROCEDURA****Preparazione dei reattivi**

- Portare i reattivi a temperatura ambiente.
- Ricostituire il tampone per la liberazione dell'istamina con 25 mL di acqua distillata.

- Dissolvere subito prima di utilizzare il reagente di acilazione nel volume di DMSO riportato sull'etichetta. Se sono necessarie più fiale, raggrupparle dopo la dissoluzione.
- Ricostituire i coniugati con il volume di diluente riportato sulle etichette delle fiale. Attendere 20 minuti prima di miscelare. In seguito, versare il contenuto di entrambe le fiale con il coniugato ricostituito nella fiala per coniugato.
- Diluire il contenuto del flacone di soluzione di lavaggio concentrata con 950 mL di acqua distillata e omogeneizzare.
- Dissolvere ciascuna pastiglia di substrato con 15 mL di tampone del substrato 30 minuti minimo prima dell'uso.

**Preparazione dei campioni: acilazione**

Il metodo del dosaggio prevede l'acilazione di campioni, calibratori e controllo. I campioni acilati sono abbastanza stabili e possono essere conservati fino a 3 giorni a 2-8 °C.

**Procedura**

Fase di acilazione	Fase immunologica	Fase enzimatica	Letture
In provette di polipropilene pipettare 25 µL di tampone di acilazione, 100µL di calibratore, controllo o campioni 25µL di soluzione di acilazione. Agitare immediatamente su vortex.	Aggiungere in successione ai pozzetti: 50 µL di calibratore, controllo o campioni acilati 200 µL di coniugato incubare 2 ore a 2-8 °C in agitazione* (350 rpm).	Lavare tre volte con 350 µL la soluzione di lavaggio diluita.** Aggiungere 200µL di substrato. Incubare 30 minuti a 18-25 °C in agitazione (350 rpm)* al buio.	Aggiungere 50µL di soluzione di stop.  leggere l'assorbanza a 405-414 nm.

\* In alternativa, incubare 18 ore senza agitare a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. In seguito, ridurre la fase enzimatica a 20 minuti.

\*\* Lavaggio delle micropiastre: questa fase è essenziale per ottenere prestazioni ottimali. Dopo il lavaggio, i pozzetti non devono asciugarsi prima dell'aggiunta del reattivo successivo.

Con un lavatore di micropiastre automatico

Selezionare un ciclo di tre lavaggi che rispondono ai criteri seguenti:

- Il liquido deve essere aspirato completamente dai pozzetti
- I pozzetti devono essere riempiti fino al bordo con la soluzione di lavaggio
- La soluzione di lavaggio deve essere iniettata rapidamente (ad esempio 1 secondo per ogni pozzetto)
- Alla fine dei tre cicli, la soluzione di lavaggio deve essere aspirata completamente.

Lavaggio manuale

Ripetere minimo tre volte il ciclo seguente

- Rovesciare il contenuto dei pozzetti capovolgendo energicamente la micropiastre sul lavandino.
- Riempire i pozzetti fino al bordo con la soluzione di lavaggio (i pozzetti possono traboccare)
- Rovesciare il contenuto dei pozzetti capovolgendo energicamente la micropiastre sul lavandino e, l'ultima volta, picchiettare più volte il fondo della micropiastre capovolta su carta assorbente.

**RISULTATI**

Le concentrazioni di istamina in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione sulla curva standard. Campioni e controlli devono essere dosati insieme agli calibratori.

**Curva standard**

I risultati registrati dal reparto responsabile del controllo di qualità sono stati calcolati utilizzando l'adattamento della curva con metodo *spline* con *B/T*



o  $B/B_0$  sull'asse verticale logit e la concentrazione di analiti dei calibratori sull'asse orizzontale logaritmico (nM).

Altri metodi di interpolazione dati possono dare risultati leggermente differenti.

Calibratori	Istamina (nM)	Assorbanza	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Esempio di curva standard. Non usare per calcolare il valore dei propri campioni).

#### Campioni

- Le concentrazioni dei campioni di plasma ai valori letti sulla curva standard.
- I valori ottenuti per l'istamina liberata devono essere moltiplicati per il fattore di diluizione 10,5.
- I valori ottenuti per l'istamina totale devono essere moltiplicati per il fattore di diluizione 20.
- I valori degli altri campioni devono essere moltiplicati per il rispettivo fattore di diluizione.

## VALORI ATTESI

Ogni laboratorio deve stabilire i propri limiti di riferimento. Si prega di considerare solo come guida i valori sotto riportati, ottenuti da soggetti caratterizzati clinicamente.

- Plasma: < 10 nM (1 ng/mL)
- Sangue intero: 200-2.000 nM (20-200 ng/mL)
- Stimolo della liberazione di istamina: > 10% dell'istamina totale
- Liberazione spontanea di istamina: < 5% dell'istamina totale
- Urine: 10-35 µg/g di creatinina

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Si consiglia ad ogni laboratorio di dosare regolarmente sieri di controllo per verificare la qualità dei risultati ottenuti. Questi campioni devono essere manipolati esattamente come i campioni in esame; i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

In caso il kit fosse danneggiato o i dati ottenuti mostrino un'alterazione della performance, si prega di contattare il distributore locale o di scrivere al indirizzo e-mail seguente: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

*(Ulteriori dati sono riportati in "APPENDIX")*

Vengono forniti dati rappresentativi a mero scopo illustrativo. I risultati possono variare da laboratorio a laboratorio.

### Sensibilità

**Sensibilità analitica:** 0,52 nM

### Specificità

Il dosaggio è specifico per l'istamina.

### Precisione

#### Intra-saggio

EDTA plasma campioni sono stati analizzati 25 volte in uno stesso esperimento. E' stato trovato un coefficiente di variazione del 11,0% o inferiore.

#### Inter-saggio

EDTA plasma campioni sono stati analizzati in duplicato in 10 esperimenti differenti. E' stato trovato un coefficiente di variazione del 13,6% o inferiore.

### Accuratezza

#### Test di diluizione

EDTA plasma campioni ad alta concentrazione di istamina sono stati diluiti con lo calibratore zero del kit. Il recupero è risultato essere compreso tra 95,1% e 119%.

#### Test di recupero

Ad EDTA plasma campioni a bassa concentrazione di istamina sono state aggiunte quantità note di istamina. Il recupero è risultato essere compreso tra 92,2% e 119%.

**Campo di misura** (è compreso tra la concentrazione della sensibilità analitica alla concentrazione del calibratore più elevato):

0,52 a circa 100 nM.

## LIMITAZIONI

Rispettare accuratamente le istruzioni d'uso per evitare risultati aberranti. I risultati ottenuti con questo dosaggio devono essere interpretati alla luce del quadro clinico, insieme ai dati clinici e ad altri dati di laboratorio o strumentali.

### Sostanze interferenti

Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici.

Non è possibile utilizzare campioni di donne in gravidanza perchè contengono elevati livelli di diamino ossidasi.

In campioni con livelli superiori a 10 mM di altre amine si hanno interferenze con l'acilazione dell'istamina.

Il fenolo inibisce il rilascio di istamina.

L'istamina può essere un componente di allergeni come il veleno di insetti imenotteri.

# EIA Histamine

**REF** IM2562

## ENZYMOUNMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION IN VITRO DE LA HISTAMINA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Para uso diagnóstico *in vitro*.

### PRINCIPIO

El enzimoimmunoensayo de la histamina es un análisis competitivo. La histamina de las muestras, controles o calibradores es modificada químicamente en histamina acilada, en el primer paso. La histamina acilada es incubada en pocillos recubiertos de anticuerpos monoclonales, en presencia de un trazador histamina acilado conjugado con fosfatasa alcalina. Después de la incubación, los pocillos son lavados para eliminar los compuestos no enlazados. La actividad enzimática enlazada se mide después de la adición de un sustrato cromógeno. Los valores desconocidos se determinan por interpolación con la ayuda de la curva estándar.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

#### Precauciones generales

- No mezclar los reactivos de lotes diferentes.
- Los viales de los calibradores y controles deben ser abiertos durante el menor tiempo posible, para así evitar evaporaciones excesivas.
- Incluir una curva estándar en cada ensayo.
- Se recomienda realizar el ensayo por duplicado.
- Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
- Coger el sustrato con pinzas. El contacto con la piel puede alterar este reactivo.
- Se recomienda llevar guantes con el fin de evitar toda contaminación de la histamina exógena.
- La histamina de absorbe sobre el vidrio, utilizar exclusivamente material de plástico: pipetas, tubos etc.

#### Azida sódica

Algunos reactivos contienen azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo, cobre o latón para formar azidas metálicas explosivas. La eliminación de la azida sódica debe efectuarse de acuerdo con las normativas locales adecuadas.

#### Material de origen humano

Todas las muestras de sangre deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedades hepatitis o SIDA. Los desperdicios deben eliminarse según los reglamentos nacionales actuales.

### CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

Wash Solution (20x)

PELIGRO



H360

Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.

P201

Procurarse las instrucciones antes del uso.

P280

Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

P308+P313

EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico.

Ácido bórico 0,1 - 0,3 %  
Sodio tetraborato decahidrato 0,1 - 0,3 %

Stop Solution (NaOH)

PELIGRO



H314

Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares.

Substrate buffer

PELIGRO



H316

Provoca irritación cutánea leve.

H318

Provoca lesiones oculares graves.

H373

Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.

P280

Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

P305+P351+P338

EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P310

Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

P314

Consultar a un médico si la persona se encuentra mal.

P332+P313

En caso de irritación cutánea: consultar a un médico.

Dietanolamina 7 - 10 %

Conjugate diluent

PELIGRO



H360

Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.

P201

Procurarse las instrucciones antes del uso.

P280

Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

P308+P313

EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico.

Ácido bórico 0,1 - 0,5 %

Conjugate

PELIGRO



H360 Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.  
 P201 Procurarse las instrucciones antes del uso.  
 P280 Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.  
 P308+P313 EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico.  
 Ácido bórico 0,5 - 1 %

DMSO

ATENCIÓN



H227 Líquido combustible  
 H315 Provoca irritación cutánea.  
 H319 Provoca irritación ocular grave.  
 H335 Puede irritar las vías respiratorias.  
 P261 Evite respirar vapores.  
 P280 Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.  
 P304+P340 EN CASO DE INHALACIÓN: transporte a la persona al aire libre y manténgala en reposo en una posición que le facilite la respiración.  
 P312 Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal.  
 Si la irritación ocular persiste: consultar a un médico.  
 P337+P313 Si la irritación ocular persiste: consultar a un médico.  
 P403+P233 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente herméticamente cerrado.  
 Dimetilsulfóxido > 95 %

Acylation Buffer

PELIGRO



H360 Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.  
 P201 Procurarse las instrucciones antes del uso.  
 P280 Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.  
 P308+P313 EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico.  
 Ácido bórico 1 - 5 %

**SDS** La ficha de datos de seguridad está disponible en [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO, CONSERVACIÓN Y DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

### Plasma

- recoger la sangre en los tubos que contienen exclusivamente EDTA y enfriar inmediatamente en el hielo
- separar el plasma de las células por centrifugación 10 minutos a 900g, a 4 °C en los 20 minutos que siguen a la extracción
- extraer los 2/3 de la parte superior del plasma

- las muestras plasmáticas pueden ser diluidas en PBS

### Orina

- Recoger la orina en un frasco de plástico sobre un agente bacterio-estático, o congelar la muestra.
- diluir la orina al 1/25 en PBS

### Liberación de Histamina en sangre total

No centrifugar jamás las suspensiones celulares.

Toma de sangre: recoger de 1 a 2 mL de sangre total exclusivamente sobre heparina. No utilizar EDTA. Si la liberación de histamina no puede ser hecha inmediatamente, conservar el tubo a 18-25 °C durante 24 horas como máximo.

Histamina total después de lisis celular: añadir a 50 ml de sangre y diluir con 950 µL de agua destilada (dilución 1:20) Congelar y descongelar 2 veces el tubo.

Estimulación celular:

- agente estimulador para la liberación de histamina:** Preparar en los pocillos de una placa, 50 mL de agente estimulador a diferentes diluciones y añadir 100 mL de sangre total diluida al 1/7 en el tampón de liberación de histamina (por ejemplo: 500 µL de sangre total + 3mL de tampón). Incubar la placa, recubierta de plástico durante 30 minutos a 37 °C.
- liberación espontánea de histamina:** distribuir 100 µL de sangre diluida al 1/7 en tampón de liberación de histamina en tubos o pocillos de una placa que contiene 50 µL de tampón de liberación de histamina. Incubar los tubos o la placa cubiertos durante 30 minutos a 37 °C. Todos los volúmenes se duplicaran si se efectúa la estimulación en tubos.
- recuperación de la histamina liberada:** centrifugar a <4 °C durante 5 minutos a 900 g, luego desplazar la placa encima del hielo triturado. Con cuidado tomar 100 ml del sobrenadante sin tocar las células precipitadas.

### Otras muestras líquidas

Recoger las muestras en los tubos de plástico.

### Muestras sólidas

Extraer la histamina en razón de 10 µL de HClO<sub>4</sub> 0,2N por mg de tejido, homogeneizar ó triturar y centrifugar a 10 000 g durante 5 minutos a <4 °C. Recoger el sobrenadante y filtrar si es necesario, después neutralizar a pH 6-8 adjuntando el mismo volumen de borato de potasio 1 M. Centrifugar a 10000 g, 1 minuto a <4 °C, recoger el sobrenadante en un tubo de plástico.

### Conservación de las muestras

Conservar todo tipo de muestra excepto las estimulaciones celulares, en los tubos de plástico a < -18 °C si el análisis no es realizado inmediatamente.

## MATERIALES SUMINISTRADOS

Todos los reactivos del equipo conservados sin abrir a 2-8 °C son estables, hasta la fecha de caducidad mencionada sobre la etiqueta del equipo.

Las fechas de caducidad impresas sobre las etiquetas de los frascos, aplicables únicamente para períodos largos de almacenaje de reactivos por el fabricante, antes del ensamblaje. No tener en cuenta.

**Placas de microtitulación: 12 x 8 pocillos recubiertos de anticuerpos anti-histamina** (listo para su uso)

Conservar a entre 2 y 8 °C las tiras no utilizadas en el envoltorio proporcionado.

**Conjugado histamina-fosfatasa alcalina: 2 frascos** (liofilizado)

El vial contiene conjugado liofilizado de fosfatasa alcalina-histamina en presencia de albúmina sérica bovina. Reconstituir el conjugado con el volumen de diluyente de conjugado indicado en la etiqueta del vial y verter el contenido de ambos viales con conjugado reconstituido en el vial para conjugado. Tras la reconstitución, el conjugado es estable una semana a entre 2 y 8 °C o a < -18 °C hasta la fecha de caducidad del kit.

**Diluyente: un frasco de 25 mL** (listo para su uso)

El diluyente es utilizado para reconstituir el conjugado. Después de su abertura, conservar los frascos a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**Calibradores: 6 frascos de 1 mL** (listo para su uso)

Los frascos de calibrador contienen entre 0 y aproximadamente 100 nM de histamina no-acilada, en solución en presencia de albúmina sérica bovina y

azida sódica (<0,1 %). Después de su abertura, conservar el frasco a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo. Los calibradores están verificados a través de un estándar de referencia interno.

**Muestra control testigo: un frasco de 1 mL** (listo para su uso)

El frasco de control contiene histamina no-acilada, en solución en presencia de albúmina sérica bovina y azida sódica (<0,1 %). Los valores esperados se indican sobre la etiqueta del frasco. Después de su abertura, conservar los frascos a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**Reactivo de acilación: un vial** (polvo)

El contenido del vial debe disolverse en el volumen de DMSO indicado en la etiqueta justo antes de usarlo. El reactivo disuelto es estable a <-18 °C hasta la fecha de caducidad del kit. Evite congelarlo y descongelarlo varias veces.

**Tampón de acilación: 1 frasco de 5 mL** (listo para su uso)

Después de su abertura, conservar el frasco a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**Tampón de liberación de histamina: 1 frasco** (liofilizado)

Reconstituir el contenido del frasco con 25 mL de agua destilada. Después de su abertura, conservar el frasco a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**DMSO: 1 frasco de 3 mL** (listo para su uso)

Dejar el DMSO equilibrarse a 18-25 °C hasta disolución completa.

**Solución de lavado (20x): un frasco de 50 mL**

Diluir 50 mL de la solución de lavado concentrada (20 X) con 950 mL de agua destilada. La dilución es estable un mes a 2-8 °C o a <-18 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**Tampón de sustrato: 1 frasco de 30 mL** (listo para su uso)

Este tampón contiene dietanolamina.

**Sustrato: 2 pastillas**

La solución de sustrato (para-nitro fenil fosfato) se prepara por lo menos 30 minutos antes de utilizarla. Por eso se disuelve una pastilla con 15 mL de tampón. La solución está estable 24 horas a 2-8 °C o a <-18 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**Solución de parada: 1 frasco de 6 mL** (listo para su uso)

Este tampón contiene hidróxido de sodio 1N. Después de su abertura, conservar el frasco a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

**Vial para conjugado: un vial**

Vial vacío para la fusión de los conjugados reconstituidos.

## MATERIALES NECESARIOS, NO SUMINISTRADOS CON EL KIT

Además del equipo normal de laboratorio se requiere lo siguiente:

**Para el inmunoensayo:**

- tubos de plástico (3 o 5 mL)
- micropipetas de precisión (20-200, 200-1000 µL)
- micropipetas a repetición (25, 200 µL)
- agitador de tipo "vortex"
- agitador de microplaca
- lavador de microplaca (opción)
- lector de microplaca (405-414 nm)

para la liberación de la histamina:

- placas de microtitulación de fondo cónico ó redondo (o tubos de plástico)
- estufa a 37 °C ó baño maría
- centrifuga refrigerada para placas (o tubos)

Para los análisis de muestras sólidas:

- Ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>).
- Borato de potasio (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## PROCEDIMIENTO

**Preparación de los reactivos**

- Equilibrar los reactivos a la temperatura ambiente.
- Reconstituir el tampón de liberación de la histamina con 25 mL de agua destilada.
- Disuelva el reactivo de acilación en el volumen de DMSO indicado en la etiqueta justo antes de usarlo. Si se requieren varios viales, agrúpelos después de la disolución.
- Reconstituir los conjugados con el volumen de diluyente indicado en las etiquetas de los viales. Esperar 20 minutos antes de mezclar. A continuación, verter el contenido de ambos viales con el conjugado reconstituido en un vial para conjugado.
- Diluir el contenido del frasco de solución de lavado concentrada con 950 mL de agua destilada y homogenizar.
- Disolver una pastilla de sustrato en 15 mL de tampón de sustrato por lo menos 30 minutos antes de utilizarlo.

**Preparación de las muestras: acilación**

El protocolo del análisis comprende una etapa de acilación de las muestras, calibradores y controles. La histamina acilada es muy estable, y las muestras aciladas pueden ser conservadas 3 días a 2-8 °C.

**Procedimiento**

Acilación	Reacción inmunológica	Reacción enzimática	Lectura
En un tubo propio, adjuntar 25 µL de tampón de acilación 100 µL de calibrador, control o muestra 25 µL de solución de acilación y mezclar inmediatamente.	Distribuir en los pocillos 50 µL de calibrador, control o muestra acilada 200 µL de conjugado incubar 2 horas a 2-8 °C con agitación* (350 rpm).	Lavar tres veces con 350 µL la solución de lavado diluida.** Añadir 200 µL de sustrato. Incubar 30 minutos a 18-25 °C en agitación (350 rpm)* en la oscuridad.	Añadir 50 µL de solución de parada.  Leer la absorbancia a 405-414 nm.

\* Asimismo, incubar 18 horas sin agitar a entre 2 y 8 °C. A continuación, se debe reducir el paso enzimático a 20 minutos.

\*\* lavado de las placas: esta etapa es esencial para obtener las marcas esperadas. Después del lavado, los pocillos no deben secarse antes de añadir el reactivo siguiente.

Con lavador automático

Elegir un ciclo de tres lavados que responde a los criterios siguientes:

- El líquido debe ser completamente absorbido de los pocillos
- Los pocillos deben ser llenados enteramente con la solución de lavado
- La solución de lavado debe ser inyectada con rapidez (por ejemplo 1 segundo por pocillo)
- Al final de los 3 ciclos, la solución de lavado debe ser completamente aspirada.

Lavado manual

Repetir al menos tres veces el ciclo siguiente:

- Volcar con vigor la placa encima de la pila
- llenar enteramente los pocillos (los pocillos pueden rebosar)
- Volcar con vigor la placa encima de la pila y la última vez, dar golpecitos en la placa volcada en papel absorbente

## RESULTADOS

Los resultados se deducen de la curva estándar por interpolación. La curva sirve para determinar las tasas de histamina de las muestras analizadas al mismo tiempo que los calibradores.

**Curva estándar**

Los resultados del departamento de control de calidad se calcularon usando el ajuste de curva *spline* con  $B/T$  o  $B/B_0$  en el eje logit vertical y la

concentración de analito de los calibradores en el eje logarítmico horizontal (nM).

Otros métodos de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente diferentes.

Calibradores	Histamina (nM)	Absorbancia	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Ejemplo de curva estándar, no utilizar para realizar los cálculos)

#### Muestras

- Concentraciones plasmáticas: lectura directa sobre la curva.
- Liberación de histamina, multiplicar por el factor de dilución 10,5.
- Histamina total, multiplicar por el factor de dilución 20.
- Otras muestras, multiplicar por el factor de dilución utilizado.

## VALORES ESPERADOS

Se aconseja a cada laboratorio establecer sus propios valores de referencia. Los valores siguientes, determinados sobre sujetos presuntamente sanos, son dados a título indicativo:

- Plasma: < 10 nM (1 ng/mL)
- Sangre total: 200-2000 nM (20-200 ng/mL)
- Liberación de histamina positiva: >10 % la histamina total correspondiente
- Liberación de histamina espontánea: <5 % de histamina total correspondiente
- Orina: 10-35 µg/g de creatinina.

## CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas correctas de laboratorio implican que los controles sean utilizados en cada serie de análisis para asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Estos controles deben ser tratados de la misma forma que las muestras a analizar y se recomienda analizar los resultados con la ayuda de métodos estadísticos adecuados.

En caso de detectar un deterioro en el emvasado del producto ó que los resultados expresen una alteración en las características del mismo, contactar con el Distribuidor local ó notificar a la dirección de e-mail: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

(Ver la hoja "APPENDIX" para más detalles)

Se facilitan datos representativos solo a modo de ejemplo. El rendimiento obtenido en los distintos laboratorios puede variar.

### Sensibilidad

**Sensibilidad analítica:** 0,52 nM

### Especificidad

El equipo es específico de la histamina.

### Precisión

#### Intra- ensayo

Las muestras plasmáticas con EDTA han sido analizadas 25 veces en una misma serie. Los coeficientes de variación obtenidos son inferiores o iguales a 11,0 %.

#### Inter-análisis

Las muestras plasmáticas con EDTA han sido analizadas en 10 series diferentes por duplicado. Los coeficientes de variación obtenidos son inferiores o iguales a 13,6 %.

### Precisión

#### Prueba de dilución

Las muestras plasmáticas con EDTA de concentración elevada han sido diluidas con el calibrador Cero. Los porcentajes de recuperación varían entre 95,1 % y 119 %.

#### Prueba de recuperación

Cantidades conocidas de histamina han sido añadidas a plasmas EDTA humanos. Los porcentajes de recuperación varían entre 92,2 % y 119 %.

**Rango de medida** (a partir de la sensibilidad analítica del calibrador más alto):

0,52 a aproximadamente 100 nM.

## LIMITACIONES

El no respetar las instrucciones de uso puede afectar significativamente a los resultados. Los resultados deben ser interpretados con la luz de la presentación clínica total del paciente, incluyendo su historia clínica, los datos de pruebas adicionales y las otras informaciones apropiadas.

### Interferencias

No utilice muestras hemolizadas, ictericas o lipémicas.

La sangre de las mujeres embarazadas contienen importantes cantidades de diamina oxidasa y no debe ser analizada.

Las muestras que contienen aminas diferentes a la histamina con una concentración superior a 10 mM interfieren con la acilación de la histamina.

El fenol inhibe la liberación de histamina.

La histamina puede ser un componente de ciertos alérgenos como el veneno de himenóptero

# EIA-histamin

**REF** IM2562

## ENZYM-IMMUNANALYSE TIL IN VITRO-BESTEMMELSE AF HISTAMIN I BIOLOGISKE PRØVER Til *in vitro* diagnostisk brug.

### PRINCIP

Enzymimmunanalysen af histamin er en konkurrentanalyse. Histamin fra prøverne, kontrollerne eller kalibratorerne modificeres kemisk til acyleret histamin i løbet af første trin. Acyleret histamin inkuberes i monoklonale antistofovertrukne brønde i nærvær af alkalisk phosphatase-acyleret histaminconjugat. Efter inkubation skylles brøndene for at fjerne ikke-bundne komponenter. Den bundne enzymatiske aktivitet måles derefter efter tilsætning af et kromogent substrat.

### ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

#### Generelle bemærkninger:

- Reagenser fra kit fra forskellige lot må ikke blandes.
- Flaskerne med kalibratører og controller bør være åbne så kort tid som muligt for at undgå overdreven fordampning.
- Der skal fastsættes en standardkurve for hver analyse.
- Det anbefales at udføre assayen som dobbeltbestemmelse.
- Alle reagenser skal have rumtemperatur før pipettering.
- Hvis substrattabletten har kontakt med hud kan det have en negativ indvirkning på produktet. Håndter tabletter med tang.
- Handsker skal bæres for at undgå kontaminering med fremmed histamin, f.eks. fra sved.
- Histamin adsorberer på glas, brug kun plastpipetter, prøverør osv.

#### Natriumazid

Visse reagenser indeholder natriumazid som konserveringsmiddel. Natriumazid kan reagere med bly, kobber eller messing og danne eksplosive metalazider. Bortskaffelse af natriumazid skal ske i overensstemmelse med gældende lokal lovgivning.

#### Materialer af human oprindelse

Samtlige blodprøver skal håndteres, som om de var i stand til at overføre hepatitis eller AIDS, og affald skal bortskaffes i overensstemmelse med de i brugslanet gældende regler.

### GHS FAREKLASSIFIKATION

Wash Solution (20x)

FARE



H360

Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn.

P201

Indhent særlige anvisninger før brug.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P308+P313

VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.  
Borsyre 0,1 - 0,3%  
Natriumboratdecahydrat 0,1 - 0,3%

Stop Solution (NaOH)

FARE



H314

Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P301+P330+P331 I TILFÆLDE AF  
INDTAGELSE: Skyl munden.  
Fremkald IKKE opkastning.  
P303+P361+P353 VED KONTAKT MED  
HUDEN (eller håret): Skyl  
under koldt vand.  
P305+P351+P338 VED KONTAKT MED  
ØJNENE: Skyl forsigtigt med  
vand i flere minutter. Fjern  
eventuelle kontaktlinser, hvis  
dette kan gøres let. Fortsæt  
skylning.  
P310 Ring straks til en  
GIFTINFORMATION eller en  
læge.  
Natriumhydroxid 3 - 6%

Substrate buffer

FARE



H316

Forårsager mild hudirritation.

H318

Forårsager alvorlig øjenskade.

H373

Kan forårsage organskader ved længerevarende eller gentagen eksponering.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P305+P351+P338

VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

P310

Ring straks til en GIFTINFORMATION eller en læge.

P314

Søg lægehjælp ved ubehag.

P332+P313

Ved hudirritation: Søg lægehjælp.  
Diethanolamin 7 - 10%

Conjugate diluent

FARE



H360

Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn.

P201

Indhent særlige anvisninger før brug.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P308+P313

VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.  
Borsyre 0,1 - 0,5%

Conjugate

FARE



H360


Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn.


P201

Indhent særlige anvisninger før brug.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

	P308+P313	VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp. Borsyre 0,5 - 1%
DMSO	ADVARSEL	
		
	H227	Brændbar væske.
	H315	Forårsager hudirritation.
	H319	Forårsager alvorlig øjenirritation.
	H335	Kan forårsage irritation af luftvejene.
	P261	Undgå indånding af damp.
	P280	Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.
	P304+P340	VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.
	P312	I tilfælde af ubehag ring til en GIFTINFORMATION eller en læge.
	P337+P313	Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.
	P403+P233	Opbevares på et godt ventileret sted. Hold beholderen tæt lukket. Dimethylsulfoxid > 95%

Acylation Buffer	FARE	
		
	H360	Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn.
	P201	Indhent særlige anvisninger før brug.
	P280	Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.
	P308+P313	VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp. Borsyre 1 - 5%

**SDS** Sikkerhedsdatablad er tilgængelig på [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## INDSAMLING, BEHANDLING, OPBEVARING OG FORTYNDING AF PRØVER

### Plasma

- opsaml blod i et kølet prøverør, der kun indeholder EDTA, og afkøl straks på is
- centrifuger 10 minutter ved 900 g ved 4 °C inden for 20 minutter efter prøvetagning
- aspirer de øverste 2/3-dele af plasma
- plasma kan blive fortyndet i PBS

### Urin

- Saml urinprøve i plastbeholder. Nedfrys prøven, eller tilsæt et bakteriestatisk middel.
- fortynd prøver 1:25 i PBS

### Histaminfrigivelse i fuldblod

Vortex ikke cellesuspension.

**Blodprøveudtagning:** opsaml 1-2 mL blod, kun i heparin-prøverør, brug ikke EDTA. Opbevar prøver ved 18-25 °C i højst 24 timer, hvis analysen ikke kan udføres med det samme.

**Total histamin efter cellelysering:** Tilsæt 50 µL ufortyndet blod til 950 µL destilleret vand (fortynding 1:20). Frys og tøm op to gange.

### Celleeksponering:

- eksponering med histaminslipmiddel:** fortynd fuldblod 1:7 histaminfrigivelsesbuffer (f.eks. 500 µL fuldblod + 3 mL buffer), tilsæt 50 µL af de forskellige fortyndinger af slipmidler til brøndene på en plade, og tilsæt derefter 100 µL af 1:7 fortyndet fuldblod. Inkuber pladen, der er dækket med låg, i 30 minutter ved 37 °C (alle mængder kan fordobles, hvis celler udsættes for eksponering i prøverør).
- spontan histaminfrigivelse:** tilsæt 50 µL histaminfrigivelsesbuffer til pladens brønde, og tilsæt derefter 100 µL af 1:7-fortyndet fuldblod. Inkuberingspladen dækkes med låg i 30 minutter ved 37 °C.
- genvinding af frigivet histamin:** centrifuger 5 minutter ved 900 g ved 4 °C og hold pladen på knus is efter centrifugering, opsaml forsigtigt 100 µL supernatantvæske uden at forstyrre cellepelleten.

### Væskeprøver

Indsaml prøver i plastprøverør.

### Faste prøver

Ekstraher histamin med 10 µL pr. mg væv af 0,2N HClO<sub>4</sub>, homogeniseres ved sonikering eller knus og centrifuger ved 10 000 g i 5 minutter ved < 4 °C. Opsaml supernatanten og klargør ved filtrering, hvis det er nødvendigt. Neutraliser (pH 6-8) supernatantvæske ved tilsætning af en tilsvarende mængde 1 M kaliumborat. Centrifuger ved 10 000 g, 1 minut ved < 4 °C. Opsaml supernatantvæske i plastprøverør.

### Prøveopbevaring

Bortset fra fuldblodscelleeksponering, skal alle typer prøver opbevares ved < -18 °C i plastprøverør, hvis analysen ikke kan udføres med det samme.

## LEVEREDE MATERIALER

Før åbningen er alle reagenser i kittet stabile, indtil den angivne udløbsdato på kittets labels, hvis det opbevares ved 2-8 °C.

De udløbsdatoer, som er trykt på mærkaterne på hætteglassene, gælder kun for langtidsopbevaring af komponenter hos producenten forud for sammensætning af kittet. Må ikke tages i betragtning.

**Anti-histamin antistofbelagt plade: 12 x 8 brønde** (klar til brug)

Ubrugte strimler skal opbevares ved 2-8 °C i den medfølgende, selvslænde pose.

**Histamin-alkalisk fosfatase-konjugat: to hætteglas** (lyofiliseret)

Hætteglasset indeholder histamin-alkalisk phosphatase-konjugat lyofiliseret i nærværelse af bovint serumalbumin. Genfortynd konjugatet med det volumen konjugatfortyndingsmiddel, der er angivet på hætteglassets label, og hæld indholdet af begge hætteglas med genfortyndet konjugat i konjugathætteglasset. Efter genfortynding er konjugatet stabilt i en uge ved 2-8 °C eller ved opbevaring ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato.

**Fortyndingsmiddel: et 25 mL hætteglas** (klar til brug)

Fortyndingsmidlet bruges til at genfortynde konjugatet. Fortyndingsmidlet er stabilt ved 2-8 °C indtil kittets udløbsdato.

**Kalibratorer: seks 1 mL hætteglas** (klar til brug)

Hætteglasset indeholder fra 0 til ca. 100 nM ikke-acyleret histamin i buffer med bovint serumalbumin og natriumazid (< 0,1%). Efter åbning, opbevar hætteglasset i en uge ved 2-8 °C eller ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato. Kalibratorer verificeres til en intern referencestandard.

**Kontrolprøve: ét 1 mL hætteglas** (klar til brug)

Hætteglasset indeholder ikke-acyleret histamin i buffer med bovint serumalbumin og natriumazid (< 0,1%). De forventede værdier er indenfor det koncentrationsområde, der er angivet på hætteglassets label. Efter åbning, opbevar hætteglasset i en uge ved 2-8 °C eller ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato.

**Acyleringsreagens: et hætteglas** (pulver)

Hætteglassets indhold skal opløses lige inden brug i den mængden af DMSO, der er angivet på labelet. Den opløste reagens er stabil ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato. Undgå gentagne nedfrysninger og optøninger.

**Acyleringsbuffer: et 5 mL hætteglas** (klar til brug)

Efter åbning, opbevar hætteglasset ved 2-8 °C indtil kittets udløbsdato.

### Histaminfrigivelsesbuffer: et hætteglas (lyofiliseret)

Bufferen indeholder bovint serumalbumin. Genfortynd med 25 mL destilleret vand. Efter åbning, opbevar hætteglasset ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato.

### DMSO: Et 3 mL hætteglas (klar til brug)

Lad opløsningsmidlet ækvilibrere ved 18-25 °C, indtil det er smeltet helt.

### Vaskeopløsning (20x): ét 50 mL hætteglas

Koncentrerede opløsninger skal fortyndes før brug. Stabilitet efter fortynding: en måned ved 2-8 °C eller ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato.

### Substratbuffer: et 30 mL hætteglas (klar til brug)

Substratbufferen er en diethanolamin-HCl-opløsning.

### Substrat: to tabletter

Substratbearbejdningsopløsningen af paranitrofenylfosfat fremstilles mindst 30 minutter før brug ved at opløse en tablet i 15 mL substratbuffer. Opløsningen er stabil i 24 timer ved 2-8 °C eller ved opbevaring ved < -18 °C indtil kittets udløbsdato.

### Stopopløsning: et 6 mL hætteglas (klar til brug)

Denne opløsning er en 1N NaOH-opløsning. Opløsningen er stabil ved 2-8 °C indtil kittets udløbsdato.

### Konjugathætteglas: Et hætteglas

Tomt hætteglas til fusion af genfortyndede konjugater.

## PÅKRÆVEDE MATERIALER, SOM IKKE MEDFØLGER

Ud over almindeligt laboratorieudstyr skal følgende bruges:

#### Til immunanalysen:

- plastprøverør (3 eller 5 mL)
- præcisionsmikropipetter (20-200, 200-1000 µL)
- repeterende mikropipetter (25, 200 µL)
- Mixer af vortex-typen.
- mikrotiter-pladeryster
- vaskemaskine til mikrotiterplader (tilvalgt)
- mikrotiterpladelæser (405-414 nm)

Til histaminfrigivelse:

- sfæriske eller koniske brønde mikrotiterplader (eller plastprøverør)
- 37 °C vandbad
- kølecentrifuge til plader (eller prøverør)

Til prøvebehandling af faste stoffer:

- Perchlorsyre (HClO<sub>4</sub>).
- Kaliumborat (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## PROCEDURE

### Klargøring af reagenser

- Lad reagenserne nå stuetemperatur.
- Genfortynd histaminfrigørelsesbufferen med 25 mL destilleret vand.
- Opløs lige før brug acyleringsreagensen med den mængde DMSO, som er angivet på labelen. Hvis der er behov for flere hætteglas, skal du samle efter opløsningsprocessen.
- Genfortynd konjugaterne med mængden af fortyndingsmiddel angivet på hætteglassets labels. Vent 20 minutter før blanding. Hæld derefter indholdet af begge hætteglas med genfortyndet konjugat over i konjugathætteglasset.
- Indholdet af det vaskevæske-koncentrerede hætteglas hældes over i 950 mL destilleret vand og homogeniseres.
- Forbered substratet ved at opløse en tablet i 15 mL substratbuffer mindst 30 minutter før brug.

### Fremstilling af prøver: acylering

Analyseproceduren inkluderer et acyleringstrin til prøver, kalibratorer eller kontroller. De acylerede prøver er ret stabile og kan opbevares 3 dage ved 2-8 °C.

## Procedure

Acyleringstrin	Immunologisk trin	Enzymatiske trin	Læsning
Til rengøring af plastprøverør tilsættes 25 µL acyleringsbuffer, 100 µL kalibrator, kontrol eller prøve, 25 µL acyleringsopløsning og vortex umiddelbart derefter.	Til antistofovertrukne brønde tilsættes 50 µL acyleret prøve, kontrol eller kalibrator og 200 µL konjugat. Inkuberes i 2 timer ved 2-8 °C med omrystning (350 omdr/min).*	Vask 3 gange med 350 µL i fortyndet vaskeopløsning.** Tilføj 200 µL substrat. Inkuberes i 30 minutter ved 18-25 °C med omrystning (350 omdr/min)* i mørke.	Tilføj 50 µL stopopløsning.  Aflæs absorptions ved 405-414 nm.

\* Alternativt inkuberes 18 timer uden omrystning ved 2-8 °C. Derefter skal det enzymatiske trin reduceres til 20 minutter.

\*\* Rengøring af plader: Dette trin er essentielt for at opnå kittets forventede ydelsesniveau. Efter vask må brøndene ikke tørre før tilsætningen af den næste reagens.

Brug af mikrotiterpladevasker

Vælg et pladevaskeprogram med tre cykler, der opfylder følgende cyklus-kriterier:

- Væske i brønde skal være fuldstændigt aspireret
- Brønde skal fyldes til kanten med vaskeopløsningen
- Vaskeopløsningen skal injiceres hurtigt (typisk et sekund til at fylde en brønd)
- Efter de tre cykler skal vaskeopløsningen være fuldstændig aspireret

Manuel procedure

Gentag mindst tre cyklusser som følger:

- Vend pladen på hovedet og ryst kraftigt over vasken
- Fyld brønde med vaskevæske, opløsningen kan løbe over kanten af brøndene
- Vend pladen på hovedet og ryst kraftigt over vasken, og bank med lette slag den omvendte mikrotiterplade ned på rent, absorberende papir

## RESULTATER

Resultaterne opnås ved interpolation ud fra en standardkurve. Kurven anvendes til bestemmelse af histaminkoncentrationer i prøver, der måles samtidig med kalibratorerne.

### Standardkurve

Resultaterne i kvalitetskontrolafdelingen blev beregnet ved hjælp af *spline* kurvetilpasning med *B/T* eller *B/B<sub>0</sub>* på den logit vertikale akse og analytikoncentration for kalibratorerne på den logaritmiske horisontale akse (nM).

Andre datareduktionsmetoder kan give lidt anderledes resultater.

Kalibratorer	Histamin (nM)	Absorbans	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Eksempel på standardkurve, må ikke anvendes til beregning).

### Prøver

- Plasmakoncentrationer svarer til værdier aflæst af standardkurven.
- Værdier opnået for frigivet histamin skal ganges med 10,5.
- Værdier opnået for den totale mængde frigivet histamin skal ganges med 20.
- Andre prøveresultater skal korrigeres for den rette fortyndingsfaktor.



## FORVENTEDE VÆRDIER

Vi anbefaler hvert laboratorium at etablere sine egne referenceværdier. Følgende værdier opnået fra raske individer er kun vejledende.

- Plasma: < 10 nM (1 ng/mL)
- Fuldblod: 200-2000 nM (20-200 ng/mL)
- Positiv celleeksponering: > 10% af den totale histamin
- Spontan histaminfrigivelse: < 5% af den totale histamin
- Urin: 10-35 µg/g kreatinin

## KVALITETSKONTROL

God laboratoriepraksis indebærer regelmæssig anvendelse af kontrolprøver for at sikre kvaliteten af de opnåede resultater. Disse prøver skal behandles på nøjagtig samme måde som analyseprøverne, og det anbefales, at analysere resultaterne ved hjælp af passende statistiske metoder.

Hvis emballagen ikke er intakt, eller hvis de opnåede data viser tegn på en ændring i ydeevnen, kontaktes den lokale distributør, eller brug følgende e-mailadresse: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## PRÆSTATIONSCHARAKTERISTIKA

*(Der henvises til dataarket i "TILLÆGET" for yderligere oplysninger)*

Repræsentative data er udelukkende til illustrationsmæssige formål. Præstationsresultater kan variere afhængig af de individuelle laboratorier.

### Følsomhed

**Analytisk sensitivitet:** 0,52 nM

### Specifitet

Immunanalysen er specifik for histamin.

### Præcision

#### Inden for samme analyse

EDTA-plasmaprøverne blev analyseret 25 gange i den samme serie. Variationskoefficienterne fandtes at være under eller lig med 11,0%.

### Mellem analyser

EDTA-plasmaprøverne blev analyseret i duplikat i 10 forskellige serier. Variationskoefficienterne fandtes at være under eller lig med 13,6%.

### Nøjagtighed

#### Fortyndingstest

EDTA plasmaprøver med høje koncentrationer blev seriefortyndet med nulkalibrator. De opnåede genfindingsprocenter lå mellem 95,1% og 119%.

#### Genfindingstest

Lav koncentrations-EDTA-plasmaprøver blev tilsat kendte mængder histamin. De opnåede genfindingsprocenter lå mellem 92,2% og 119%.

**Måleinterval** (fra analytisk sensitivitet til den højeste kalibrator):

0,52 to cirka 100 nM.

## BEGRÆNSNINGER

Manglende overholdelse af vejledningerne i denne indlægsseddel kan påvirke resultaterne væsentligt. Resultaterne skal fortolkes under hensyntagen til det samlede kliniske billede af patienten, herunder klinisk historie, data fra yderligere test og andre relevante oplysninger.

### Interferens

Brug ikke hæmolyserede, ikteriske eller lipæmiske prøver.

Gravide kvinders blod indeholder høje niveauer af diamineoxidase og kan ikke bruges.

Materiale, der indeholder anden amin end histamin i en koncentration på over 10 mM, forstyrrer acyleringen af histamin.

Phenol hæmmer histaminfrigivelse.

Histamin kan være en allergenkomponent, f.eks. hymenopteragift.

---

## EIA Histamine

**REF** IM2562

### ΕΝΖΥΜΟ-ΑΝΟΣΟΕΞΕΤΑΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ IN VITRO ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ενζυμο-ανοσοεξέταση της ισταμίνης είναι εξέταση ανταγωνισμού. Η ισταμίνη των δειγμάτων, των δειγμάτων ελέγχου ή των βαθμονομητές μετατρέπεται χημικά σε ακυλιωμένη ισταμίνη σ' ένα πρώτο στάδιο της διαδικασίας. Η ακυλιωμένη ισταμίνη επωάζεται σε "πηγαδάκια" επιστρωμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα υπό την παρουσία συζεύγματος ακυλιωμένης ισταμίνης και αλκαλικής φωσφατάσης. Μετά την επώαση, ξεπλένονται τα πηγαδάκια προκειμένου να αφαιρεθούν τα μη δεσμευμένα συστατικά. Στη συνέχεια μετράται η δεσμευμένη ενζυματική δραστηριότητα, μετά από την προσθήκη ενός χρωμογόνου υποστρώματος.

### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

#### Γενικές παρατηρήσεις:

- Μην ανακατεύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.
- Τα φιαλίδια των ορών βαθμονόμησης και των ορών ελέγχου πρέπει να ανοίγονται όσο το δυνατόν λιγότερο, προς αποφυγήν εξατμίσεως του περιεχομένου.
- Κάνετε ταυτόχρονα την πρότυπη καμπύλη και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.
- Σας συστήνεται να πραγματοποιείτε δύο φορές τον κάθε προσδιορισμό.
- Αφήστε τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
- Η επαφή της ταμπλέτας υποστρώματος με το δέρμα μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς το προϊόν. Χειριστείτε τις ταμπλέτες με λαβίδες.
- Πρέπει να φοράτε γάντια για να αποφύγετε τη μόλυνση από εξωτερική ισταμίνη, π. χ. από τον ιδρώτα.
- Η ισταμίνη προσροφάται στο γυαλί, χρησιμοποιήστε μόνο πλαστικές πιπέτες, σωληνάρια κτλ.

#### Αζίδιο του Νατρίου

Ορισμένα αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με μόλυβδο, χαλκό ή ορείχαλκο για να σχηματίσει εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Η απόρριψη του αζιδίου του νατρίου πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους αντίστοιχους τοπικούς κανονισμούς.

#### Υλικό ανθρώπινης προέλευσης

Όλα τα δείγματα αίματος πρέπει να τα χειρίζεστε ως ικανά να μεταδώσουν ηπατίτιδα ή AIDS. Δημιουργημένο απόρριμμα να εκκαθαρισθεί σύμφωνα με ισχύω κανονισμό.

### ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ GHS

Wash Solution (20x)

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H360

Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο.

P201

Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

P280

Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P308+P313

Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.

Βορικό οξύ 0,1 - 0,3%  
Δεκαένυδρο βορικό νάτριο 0,1 - 0,3%

Stop Solution (NaOH)

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H314

Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες.

P280

Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P301+P330+P331

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: ξεπλύνετε το στόμα. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό.

P303+P361+P353

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): ξεπλύνετε την επιδερμίδα με νερό.

P305+P351+P338

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

P310

Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.  
Υδροξείδιο νατρίου 3 - 6%

Substrate buffer

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H316

Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.

H318

Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

H373

Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα όργανα ύστερα από παρατεταμένη ή επανειλημμένη έκθεση.

P280

Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P305+P351+P338

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

P310

Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.

P314

Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

P332+P313

Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.

Διαιθανολαμίνη 7 - 10%

Conjugate diluent

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



	H360	Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο.
	P201	Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
	P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
	P308+P313	Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό. Βορικό οξύ 0,1 - 0,5%

Conjugate

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



	H360	Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο.
	P201	Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
	P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
	P308+P313	Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό. Βορικό οξύ 0,5 - 1%

DMSO

ΠΡΟΣΟΧΗ



	H227	Καύσιμο υγρό.
	H315	Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
	H319	Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
	H335	Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
	P261	Αποφεύγετε να αναπνέετε ατμούς.
	P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
	P304+P340	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε το άτομο στον καθαρό αέρα και αφήστε το να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.
	P312	Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.
	P337+P313	Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.
	P403+P233	Αποθηκεύεται σε καλά αεριζόμενο χώρο. Ο περιέκτης διατηρείται ερμητικά κλειστός. Διμεθυλοσουλφοξείδιο > 95%

Acylation Buffer

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



	H360	Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο.
	P201	Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
	P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
	P308+P313	Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό. Βορικό οξύ 1 - 5%



Το δελτίο δεδομένων ασφάλειας διατίθεται στη διεύθυνση [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### Πλάσμα

- συλλέξτε το αίμα σε παγωμένο σωληνάριο που περιέχει μόνο EDTA και τοποθετήστε αμέσως στον πάγο
- φυγοκεντρήστε για 10 λεπτά σε 900 g στους 4 °C μέσα σε 20 λεπτά από τη συλλογή του δείγματος
- αποχύστε τα ανώτερα 2/3 του πλάσματος
- το πλάσμα μπορεί να αραιωθεί σε PBS

### Ούρα

- συλλέξτε δείγμα ούρων σε πλαστικό δοχείο. Καταψύξτε το δείγμα ή προσθέστε βακτηριοστατικό παράγοντα.
- αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:25 σε PBS

### Απελευθέρωση ισταμίνης σε ολικό αίμα

Μην ανακινήσετε το κυτταρικό εναιώρημα στο vortex.

Δειγματοληψία αίματος: συλλέξτε 1-2 mL αίματος σε σωληνάρια που έχουν μόνο ηπαρίνη, μη χρησιμοποιήσετε EDTA. Διατηρήστε τα δείγματα στους 18-25 °C για 24 ώρες το πολύ, αν η εξέταση δε μπορεί να γίνει αμέσως.

Ολική ισταμίνη μετά από κυτταρική λύση: Προσθέστε 50 µL μη αραιωμένου αίματος σε 950 µL απεσταγμένου νερού (αραίωση σε αναλογία 1:20). Καταψύξτε και αποψύξτε δύο φορές.

### Κυτταρική διέγερση:

- **διεγείρετε με παράγοντα απελευθέρωσης της ισταμίνης:** αραιώστε το ολικό αίμα σε αναλογία 1:7 σε παράγοντα απελευθέρωσης της ισταμίνης (π.χ. αραιώστε 500 µL ολικό αίμα + 3 mL ρυθμιστικού), προσθέστε 50 µL από τα διαφορετικά αραιωμένα διαλυμάτα παράγοντα απελευθέρωσης στα "πηγαδάκια" της πλάκας, έπειτα προσθέστε 100 µL του αραιωμένου σε αναλογία 1:7 ολικού αίματος. Επωάστε την πλάκα, καλυμμένη με το καπάκι, για 30 λεπτά στους 37 °C (όλοι οι όγκοι μπορούν να διπλασιαστούν αν τα κύτταρα διεγερθούν μέσα σε σωληνάρια).
- **αυθόρμητη απελευθέρωση ισταμίνης:** προσθέστε 50 µL ρυθμιστικού απελευθέρωσης ισταμίνης στα "πηγαδάκια" μίας πλάκας, έπειτα προσθέστε 100 µL του αραιωμένου σε αναλογία 1:7 ολικού αίματος. Επωάστε την πλάκα, καλυμμένη με το καπάκι, για 30 λεπτά στους 37 °C.
- **ανάκτηση της απελευθερωμένης ισταμίνης:** φυγοκεντρήστε για 5 λεπτά σε 900 g στους 4 °C και διατηρήστε την πλάκα σε θρυμματισμένο πάγο μετά από τη φυγοκέντρωση, συλλέξτε προσεκτικά 100 µL του υπερκείμενου υγρού χωρίς να διαταράξετε την κυτταρική σφαίρα.

### Υγρά δείγματα

Συλλέξτε τα δείγματα σε πλαστικά σωληνάρια.

### Στερεά δείγματα

Εκχυλίστε την ισταμίνη με 10 µL ανά mg ιστού από 0.2 N HClO<sub>4</sub>, ομογενοποιήστε με κατεργασία με υπέρηχους ή σύνθλιψη και φυγοκεντρήστε σε 10 000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 4 °C. Συλλέξτε την υπερκείμενη φάση και διηθήστε με φιλτράρισμα αν είναι απαραίτητο. Εξουδετερώστε (pH 6-8) το υπερκείμενο υγρό με προσθήκη ίσου όγκου

Βορικού Καλίου 1M. Φυγοκεντρήστε σε 10 000 g για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 4 °C. Συλλέξτε το υπερκείμενο υγρό σε πλαστικά σωληνάρια.

#### Αποθήκευση δειγμάτων

Εκτός από το ολικό αίμα που προορίζεται για κυτταρική διέγερση, αποθηκεύστε όλα τα είδη δειγμάτων σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18 °C σε πλαστικά σωληνάρια, αν η εξέταση δε μπορεί να γίνει αμέσως.

## ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Πριν το άνοιγμα, όλα τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες του kit, όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C.

Οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων αφορούν αποκλειστικά στη μακροπρόθεσμη αποθήκευση των αντιδραστηρίων από τον κατασκευαστή, πριν από τη συναρμολόγηση του kit. Να μη λαμβάνονται υπόψη.

**Μικροπλάκα επιστρωμένη με αντίσωμα κατά της ισταμίνης: 12 x 8 πηγαδάκια** (έτοιμη προς χρήση)

Οι αχρησιμοποίητες ταινίες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8 °C στην παρεχόμενη αυτοασφαλιζόμενη σακούλα.

**Σύζευγμα ισταμίνης-αλκαλικής φωσφατάσης: 2 φιαλίδια** (λυοφιλημένο)

Το φιαλίδιο περιέχει σύζευγμα ισταμίνης-αλκαλικής φωσφατάσης λυοφιλοποιημένο υπό την παρουσία λευκωματινής ορού βόειας προέλευσης. Ανασυστήστε το σύζευγμα με τον όγκο αραιωτικού συζεύγματος που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου και εγχύστε το περιεχόμενο και των δύο φιαλιδίων με το ανασυσταθέν σύζευγμα μέσα στο φιαλίδιο για σύζευγμα. Μετά την ανασύσταση, το σύζευγμα παραμένει σταθερό για μία εβδομάδα στους 2-8 °C ή στους < -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Αραιωτικό μέσο: ένα φιαλίδιο των 25 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Το αραιωτικό μέσο χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του συζεύγματος. Το αραιωτικό μέσο είναι σταθερό στους 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Βαθμονομητές: 6 φιαλίδια του 1 mL** (έτοιμα προς χρήση)

Τα βαθμονομητές φιαλίδια περιέχουν από 0 μέχρι κατά προσέγγιση 100 nM μη ακυλιωμένης ισταμίνης, σε ρυθμιστικό που περιέχει αλμπουμίνη βοδινού ορού και αζίδιο του Νατρίου (<0,1%). Μετά το άνοιγμα, τα φιαλίδια διατηρούνται στους 2-8 °C για μια εβδομάδα ή σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Οι βαθμονομητές έχουν επιβεβαιωθεί με δικό μας πρότυπο αναφοράς.

**Δείγμα ελέγχου: 1 φιαλίδιο του 1 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Το φιαλίδιο περιέχει μη ακυλιωμένη ισταμίνη, σε ρυθμιστικό που περιέχει αλμπουμίνη βοδινού ορού και αζίδιο του Νατρίου (<0,1%). Οι αναμενόμενες τιμές κυμαίνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων που αναγράφονται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Μετά το άνοιγμα, το φιαλίδιο διατηρείται στους 2-8 °C για μια εβδομάδα ή σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Αντιδραστήριο ακυλίωσης: ένα φιαλίδιο (σκόνη)**

Το περιεχόμενο του φιαλιδίου πρέπει να διαλυθεί ακριβώς πριν από τη χρήση στον όγκο DMSO που αναγράφεται στην ετικέτα. Το διαλυμένο αντιδραστήριο παραμένει σταθερό στους < -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

**Ρυθμιστικό ακυλίωσης: 1 φιαλίδιο των 5 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Μετά το άνοιγμα, αποθηκεύστε το φιαλίδιο στους 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Ρυθμιστικό απελευθέρωσης της ισταμίνης: 1 φιαλίδιο** (λυοφιλημένο)

Το ρυθμιστικό περιέχει αλμπουμίνη βοδινού ορού. Η ανασύσταση γίνεται με 25 mL απεσταγμένου νερού. Μετά το άνοιγμα, αποθηκεύστε το φιαλίδιο σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**DMSO: 1 φιαλίδιο των 3 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Αφήστε αυτό το διαλυτικό να φτάσει σε ισορροπία στους 18-25 °C μέχρι να λιώσει εντελώς.

**Διάλυμα πλύσης (20x): ένα φιαλίδιο των 50 mL**

Το συμπυκνωμένο διάλυμα πρέπει να αραιωθεί πριν από τη χρήση. Σταθερότητα μετά την αραιώση: ένας μήνας στους 2-8 °C ή σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Ρυθμιστικό υποστρώματος: ένα φιαλίδιο των 30 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Το ρυθμιστικό υποστρώματος είναι ένα διάλυμα διαιθανολαμίνης-HCl.

**Υπόστρωμα: δύο ταμπλέτες**

Το διάλυμα εργασίας υποστρώματος φωσφορικού παρα-νιτρο-φαινυλίου προετοιμάζεται τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη χρήση, με τη διάλυση μιας ταμπλέτας σε 15 mL ρυθμιστικού υποστρώματος. Το διάλυμα είναι σταθερό για 24 ώρες στους 2-8 °C ή αποθηκεύεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Διάλυμα παύσης: ένα φιαλίδιο των 6 mL** (έτοιμο προς χρήση)

Αυτό το διάλυμα είναι ένα διάλυμα NaOH 1N. Το διάλυμα είναι σταθερό στους 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

**Φιαλίδιο για σύζευγμα: ένα φιαλίδιο**

Αδειάστε το φιαλίδιο για σύντηξη των ανασυσταθέντων συζευγμάτων.

## ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Ο απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός, επιπλέον του συνήθους, είναι ο εξής:

**Για την ανοσοεξέταση:**

- πλαστικά σωληνάρια (3 ή 5 mL)
- μικροπιπέτες ακριβείας (20-200, 200-1.000 μL)
- επαναληπτικές μικροπιπέτες (25, 200 μL)
- μίξερ τύπου vortex
- shaker μικροπλάκας
- πλυντήριο μικροπλάκας (προαιρετικό)
- αναγνώστης μικροπλάκας (405-414 nm)

Για την απελευθέρωση της ισταμίνης:

- μικροπλάκες με "πηγαδάκια" σφαιρικού ή κωνικού σχήματος (ή πλαστικά σωληνάρια)
- υδατόλουτρο 37 °C
- ψυγμένη συσκευή φυγοκέντρησης για πλάκες (ή σωληνάρια)

Για την επεξεργασία στερεών δειγμάτων:

- Υπερχλωρικό οξύ (HClO<sub>4</sub>).
- βορικό Κάλιο (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

**Προετοιμασία αντιδραστηρίων**

- Αφήστε τα αντιδραστήρια να φθάσουν σε ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου
- Η ανασύσταση του ρυθμιστικού απελευθέρωσης της ισταμίνης γίνεται με 25 mL απεσταγμένου νερού.
- Διαλύστε ακριβώς πριν από τη χρήση του αντιδραστηρίου ακυλίωσης με τον όγκο DMSO που αναγράφεται στην ετικέτα. Εάν απαιτούνται περισσότερα από ένα φιαλίδια, προβείτε σε δεξαμενοποίηση μετά τη διάλυση.
- Ανασυστήστε τα συζεύγματα με τον όγκο αραιωτικού που αναγράφεται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Περιμένετε 20 λεπτά πριν την ανάμιξη. Στη συνέχεια, εγχύστε το περιεχόμενο και των δύο φιαλιδίων με το ανασυσταθέν σύζευγμα μέσα στο φιαλίδιο για σύζευγμα.
- Προσθέστε το περιεχόμενο του φιαλιδίου με το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης σε 950 mL απεσταγμένου νερού και ομογενοποιήστε.
- Προετοιμάστε το υπόστρωμα διαλύοντας μία ταμπλέτα σε 15 mL ρυθμιστικού υποστρώματος τουλάχιστον 30 λεπτά πριν τη χρήση.

**Προετοιμασία δειγμάτων: ακυλίωση**

Η διαδικασία εξέτασης περιλαμβάνει ένα στάδιο ακυλίωσης για τα δείγματα, τα βαθμονομητές ή τα δείγματα ελέγχου. Τα ακυλιωμένα δείγματα είναι αρκετά σταθερά και μπορούν να διατηρηθούν για 3 μέρες στους 2-8 °C.

## Διαδικασία

Βήμα ακυλίωσης	Ανοσολογικό βήμα	Ενζυματικό βήμα	Ανάγνωση
Σε καθαρά πλαστικά σωληνάρια, προσθέστε 25μL ρυθμιστικού ακυλίωσης, 100 μL βαθμονομητές, δείγματος ελέγχου ή δείγματος, 25μL διαλύματος ακυλίωσης και ανακινήστε αμέσως στο vortex.	Στα επιστρωμένα με αντίσωμα πηγαδάκια προσθέστε 50μL ακυλιωμένου δείγματος, δείγματος ελέγχου ή βαθμονομητές και 200 μL συζεύγματος επώαστε για 2 ώρες στους 2-8 °C με ανάδευση (350 rpm).*	Πλύνετε 3 φορές με το 350 μL αραιωμένο διάλυμα πλύσης.** Προσθέστε 200 μL υποστρώματος. επώαστε για 30 λεπτά στους 18-25 °C με ανάδευση (350 rpm)* στο σκοτάδι.	Προσθέστε 50μL διαλύματος σταματημάτος.  Διαβάστε την απορρόφηση στους 405-414 nm.

\* Εναλλακτικά, επώαστε για 18 ώρες, χωρίς να ανακινήσετε, στους 2-8 °C.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό βήμα πρέπει να μειωθεί στα 20 λεπτά.

\*\* Πλύση μικροπλάκας: Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί η αναμενόμενη απόδοση του kit. Μετά τη πλύση, τα πηγαδάκια δεν πρέπει να στεγνώσουν πριν την προσθήκη του επόμενου αντιδραστήριου.

Χρησιμοποιώντας ένα πλυντήριο μικροπλάκας

Επιλέξτε ένα πρόγραμμα πλύσης μικροπλάκας τριών κύκλων που να καλύπτει τα ακόλουθα κριτήρια:

- Το υγρό στα πηγαδάκια πρέπει να αποχυθεί εντελώς
- Τα πηγαδάκια πρέπει να γεμίσουν μέχρι το χείλος με το διάλυμα πλύσης
- Το διάλυμα πλύσης πρέπει να εγχυθεί γρήγορα (χαρακτηριστικός χρόνος είναι 1 δευτερόλεπτο για να γεμίσει ένα πηγαδάκι)
- Μετά από τους τρεις κύκλους, το διάλυμα πλύσης πρέπει να αποχυθεί εντελώς

Χειρωνακτική διαδικασία

Επαναλάβετε τουλάχιστον τρεις κύκλους ως εξής:

- Γυρίστε ανάποδα τη μικροπλάκα και ανακινήστε με δύναμη πάνω από το νεροχύτη
- Γεμίστε τα πηγαδάκια μέχρι επάνω με το διάλυμα πλύσης, το διάλυμα μπορεί να ξεχυθεί από τα πηγαδάκια
- Γυρίστε ανάποδα τη μικροπλάκα και ανακινήστε με δύναμη πάνω από το νεροχύτη, και σταθερά κτυπήστε ελαφρά την ανάποδα γυρισμένη μικροπλάκα επάνω σε ένα καθαρό απορροφητικό χαρτί

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων υπολογίζονται με παρεμβολή στην πρότυπη καμπύλη. Η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων ισταμίνης δειγμάτων που μετρώνται ταυτόχρονα με το βαθμονομητής.

Πρότυπη καμπύλη

Τα αποτελέσματα στο τμήμα ποιοτικού ελέγχου υπολογίστηκαν με τη χρήση της καμπύλης προσαρμογής μοντέλου «spline», με τον λόγο  $B/T$  ή  $B/B_0$  στον κάθετο άξονα logit και τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας των βαθμονομητών στον οριζόντιο λογαριθμικό άξονα (nM).

Άλλες μέθοδοι αναγωγής των δεδομένων μπορεί να δώσουν ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα.

Βαθμονομητές	Ισταμίνη (nM)	Απορρόφηση	$B/B_0$ (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης, να μη χρησιμοποιηθεί σε υπολογισμούς)

## Δείγματα

- Οι συγκεντρώσεις πλάσματος αντιστοιχούν σε τιμές που διαβάζονται στην πρότυπη καμπύλη.
- Οι τιμές που προκύπτουν για την απελευθερωμένη ισταμίνη πρέπει να πολλαπλασιαστούν με το 10.5.
- Οι τιμές που προκύπτουν για την ολική ισταμίνη πρέπει να πολλαπλασιαστούν με το 20.
- τα αποτελέσματα άλλων δειγμάτων πρέπει να διορθωθούν με τον κατάλληλο παράγοντα αραιώσης.

## ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Προτείνουμε το κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τις δικές του τιμές αναφοράς. Οι τιμές που ακολουθούν προέκυψαν από υγιή άτομα και είναι απλώς ενδεικτικές.

- Πλάσμα: < 10 nM (1 ng/mL)
- Ολικό αίμα: 200-2.000 nM (20-200 ng/mL)
- Θετική κυτταρική διέγερση: >10% της ολικής ισταμίνης
- Αυθόρμητη απελευθέρωση ισταμίνης: <5% της ολικής ισταμίνης
- Ούρα: 10-35 μg/g κρεατινίνης

## ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η σωστή εργαστηριακή πρακτική προϋποθέτει την τακτική χρήση δειγμάτων ελέγχου, προκειμένου να διασφαλίζεται η ποιότητα των αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία των δειγμάτων αυτών πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο γίνεται η επεξεργασία των άγνωστων δειγμάτων. Επιπλέον, συστήνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων τους να γίνεται με τη βοήθεια των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

Σε περίπτωση επιδείνωσης συσκευασίας ή εάν τα αποτελέσματα που προέκυψαν έχουν τροποποίηση απόδοσης, παρακαλώ ελάτε σε επαφή με τον τοπικό διανομέα σας ή χρησιμοποιήστε την ακόλουθη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

(βλέπε τη σελίδα “APPENDIX” για περισσότερες λεπτομέρειες)

Τα αντιπροσωπευτικά δεδομένα παρέχονται μόνο ως παράδειγμα. Η απόδοση που επιτυγχάνεται σε κάθε εργαστήριο μπορεί να διαφέρει.

**Ευαισθησία**

Ευαισθησία: 0,52 nM

**Εξειδίκευση**

η ανοσοεξέταση είναι εξειδικευμένη για την ισταμίνη

**Ακρίβεια**

**Εντός της δοκιμής**

Δείγματα πλάσμα EDTA εξετάστηκαν 25 φορές στην ίδια σειρά. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 11,0%.

**Εκτός της δοκιμής**

Δείγματα πλάσμα EDTA εξετάστηκαν δύο φορές το καθένα σε 10 διαφορετικές σειρές. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 13,6%.

**Ακρίβεια**

**Δοκιμή αραιώσης**

Δείγματα πλάσμα EDTA με υψηλή συγκέντρωση αραιώθηκαν διαδοχικά σε μηδενικό βαθμονομητής. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 95,1% και 119%.

**Δοκιμή ανάκτησης**

Γνωστές ποσότητες ισταμίνης προστέθηκαν σε πλάσμα EDTA δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 92,2% και 119%.

**Εύρος μέτρησης** (από αναλυτική ευαισθησία έως τον υψηλότερο βαθμονομητή):

0.52 μέχρι κατά προσέγγιση 100 nM.

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μη τήρηση των οδηγιών που περιέχονται στο έντυπο μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνευθούν λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική κλινική παρουσίαση της

ασθενούς συμπεριλαμβανομένων της κλινικής ιστορίας, των δεδομένων από συμπληρωματικές εξετάσεις και άλλων κατάλληλων πληροφοριών.

#### **Παρεμβολή**

Αποφύγετε τη χρήση βαριά αιμόλυση, ικτερικά ή λιπαιμικά δείγματα.

Το αίμα εγκύων γυναικών περιέχει υψηλά επίπεδα οξειδάσης διαμίνης και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Υλικό που περιέχει άλλες αμίνες εκτός από την ισταμίνη σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα 10 mM παρεμβάλλεται στην ακυλίωση της ισταμίνης.

Η φαινόλη αναστέλλει την αποδέσμευση ισταμίνης.

Η ισταμίνη μπορεί να είναι συστατικό αλλεργιογόνου όπως το δηλητήριο υμενοπτέρων.

---

# EIA Histamine

**REF** IM2562

## IN VITRO ENZYMOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENÍ HISTAMINU V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH Pro diagnostické účely *in vitro*.

### PRINCIP

Enzyμοimunoanalytické stanovení histaminu je založeno na kompetitivní metodě. Histamin v kalibrátorech, kontrolních a neznámých vzorcích je nejprve chemicky modifikován na acylovaný histamin. Acylovaný histamin se inkubuje v jamkách potažených monoklonální protilátkou za přítomnosti konjugátu alkalické fosfatázy s acylovaným histaminem. Po inkubaci se jamky promyjí, aby se odstranily nenavázané složky. Množství vázaného enzymatického konjugátu je úměrné enzymatické aktivitě a měří se po přidavku chromogenního substrátu.

### VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

#### Obecné poznámky:

- Nemíchejte substance ze souprav různých šarží.
- Lahvičky s kalibrátory a kontrolními vzorky by měly být otevřené co nejkratší dobu, aby nedošlo k nežádoucímu odpaření roztoku.
- Pro každou novou sérii analýz je nutné provést novou kalibraci.
- Doporučuje se provádět stanovení v duplikátech.
- Nechte reagencie před pipetací vytemperovat na laboratorní teplotu.
- Na stanovení může mít nepříznivý vliv, pokud dojde ke kontaktu pokožky s tabletami se substrátem. Při manipulaci s tabletami používejte kleště.
- Aby nedošlo ke kontaminaci vzorků histaminem zvnějšku (například potem), je nutno používat rukavice.
- Histamin se adsorbuje na sklo; proto používejte pouze plastové pipety a zkumavky.






#### Azid sodný

Některá činidla obsahují konzervační látku azid sodný. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazí za vzniku výbušných azidů kovů. Likvidace azidu sodného musí být prováděna podle příslušných místních předpisů.

#### Materiál lidského původu

Se všemi krevními vzorky musí být manipulováno jako s potenciálně infekčními (hepatitis, nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

### KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Wash Solution (20x)	NEBEZPEČÍ		
			
H360	Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.		
P201	Před použitím si obstarejte speciální instrukce.		
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.		
P308+P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Kyselina boritá 0,1 - 0,3 % Boritan sodný, dekahydrát 0,1 - 0,3 %		
Stop Solution (NaOH)	NEBEZPEČÍ		
			
H314	Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.		
		Substrate buffer	
			NEBEZPEČÍ
			
			
		H316	Způsobuje mírné podráždění kůže.
		H318	Způsobuje vážné poškození očí.
		H373	Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.
		P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
		P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
		P310	Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.
		P314	Necítíte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
		P332+P313	Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Diethanolamin 7 - 10 %
			Conjugate diluent
			NEBEZPEČÍ
			
		H360	Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.
		P201	Před použitím si obstarejte speciální instrukce.
		P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
		P308+P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

## ODBĚR, ZPRACOVÁNÍ, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ

### Plazma

- odebírejte vzorky krve do vychlazených zkumavek obsahujících EDTA a zchladte okamžitě na ledu
- centrifugujte 10 minut při 900 g a 4 °C, a to do 20 minut od odebrání vzorku
- odsajte horní 2/3 objemu plazmy
- vzorky plazmy mohou být ředěny PBS

### Moč

- Sbírejte moč do plastové nádoby. Vzorky buď zamrazte nebo přidejte bakteriostatické činidlo.
- ředte vzorky PBS v poměru 1:25

### Uvolnění histaminu z plné krve

Buněčnou suspenzi nemíchejte na Vortexu.

Odběr krve: Odeberte 1-2 ml krve do zkumavky, která obsahuje heparin (nepoužívejte EDTA). Pokud nelze stanovení uvolnění histaminu provést okamžitě, uchovávejte vzorky při 18-25 °C, a to maximálně 24 hodin.

Stanovení celkového histaminu po lýzi buněk: Přidejte 50 µl nezředěné krve k 950 µl destilované vody (ředění 1:20). Dvakrát rozmrazte a zamrazte.

### Stimulace buněk

- **stimulace pomocí činidla uvolňujícího histamin:** Plnou krev naředte v poměru 1:7 tlumivým roztokem pro uvolnění histaminu (např. 500 µl krve + 3 ml tlumivého roztoku). Do jamek v mikrotitrační destičce dejte po 50 µl uvolňujícího činidla v různém ředění a přidejte 100 µl plné krve zředěné 1:7. Mikrotitrační destičku přikrytou víčkem inkubujte 30 minut při 37 °C (pokud se stimulační test provádí ve zkumavkách, je možné objemy zdvojnásobit).
- **spontánní uvolnění histaminu:** Do jamek v mikrotitrační destičce dejte po 50 µl tlumivého roztoku pro uvolnění histaminu a přidejte 100 µl plné krve zředěné 1:7. Mikrotitrační destičku přikrytou víčkem inkubujte 30 minut při 37 °C.
- **Izolace uvolněného histaminu:** Po dobu 5 minut odstředěte destičku (nebo zkumavky) při 900 g a při 4 °C, po centrifugaci destičku (nebo zkumavky) uchovávejte na drceném ledu a opatrně odeberte 100 µl supernatantu tak, aby nedošlo k porušení pelety usazených buněk.

### Tekuté vzorky

Vzorky se odebírají do plastových zkumavek.

### Pevné vzorky

Histamin extrahujte 0,2N roztokem HClO<sub>4</sub> v množství 10 µl na 1 mg tkáně, homogenizujte ultrazvukem nebo buňky rozbijte a centrifugujte 5 minut při 10000 g a při teplotě <4 °C. Odeberte supernatant a v případě potřeby přečistěte filtrací. Neutralizujte supernatant (na pH 6-8) přidávkem stejného objemu 1M boritanu draselného. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 g a <4 °C. Supernatant se odebere do plastové zkumavky.

### Skladování vzorků

Pokud stanovení nemůže být provedeno ihned, všechny typy vzorků, s výjimkou vzorků plné krve pro stanovení buněčné stimulace, se skladují v plastových zkumavkách při < -18 °C.

## POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže nebyly otevřeny a jsou skladovány při 2-8 °C.

Data expirací uvedená na štítcích jednotlivých složek se vztahují pouze k dlouhodobému skladování u výrobce před kompletací souprav. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.

**Destička s jamkami potaženými monoklonální protilátkou proti histaminu: 12 x 8 jamek** (připraveny k použití)

Nepoužité proužky mohou být skladovány v uzavíratelném sáčku (je součástí soupravy) při 2-8 °C.

**Konjugát histaminu s alkalickou fosfatázou: 2 lahvičky** (lyofilizát)

Lahvička obsahuje konjugát histaminu s alkalickou fosfatázou, lyofilizovaný s hovězím sérovým albuminem. Obsah lahvičky se rozpustí v diluentu pro konjugát, potřebný objem je uveden na štítku lahvičky. Rozpuštěný konjugát

Conjugate

NEBEZPEČÍ



H360

Kyselina boritá 0,1 - 0,5 %

Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.

P201

Před použitím si obstarejte speciální instrukce.

P280

Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.

P308+P313

PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.  
Kyselina boritá 0,5 - 1 %

DMSO

VAROVÁNÍ



H227

Hořlavá kapalina.

H315

Dráždí kůži.

H319

Způsobuje vážné podráždění očí.

H335

Může způsobit podráždění dýchacích cest.

P261

Zamezte vdechování par.

P280

Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.

P304+P340

PŘI VDECHNUTÍ: Převraťte osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v klidu v poloze usnadňující dýchání.

P312

Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P337+P313

Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

P403+P233

Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte obal těsně uzavřený.  
Dimethylsulfoxid > 95 %

Acylation Buffer

NEBEZPEČÍ



H360

Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.

P201

Před použitím si obstarejte speciální instrukce.

P280

Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.

P308+P313

PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.  
Kyselina boritá 1 - 5 %

SDS

Bezpečnostní list je k dispozici na internetové adrese [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs).



je možno skladovat jeden týden při 2-8 °C, nebo zmrazený při < -18 °C do data expirace soupravy.

**Diluent: 1 lahvička 25 ml** (připravena k použití)

Diluent se používá pro rekonstituci konjugátu. Diluent je možno skladovat při 2-8 °C do data expirace soupravy.

**Kalibrátory: 6 lahviček po 1 ml** (připraveny k použití)

Lahvičky obsahují neacylovaný histamin, o koncentracích od 0 do přibližně 100 nM, v tlumivém roztoku, obsahujícím hovězí sérový albumin a azid sodný (<0,1 %). Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítcích lahviček. Po otevření skladujte lahvičky jeden týden při 2-8 °C nebo zmrazené při < -18 °C do data expirace soupravy. Hodnoty kalibrátorů byly nastaveny pomocí vnitřního referenčního materiálu.

**Kontrolní vzorek: 1 lahvička (1 ml);** připravená k použití.

Lahvička obsahuje neacylovaný histamin v tlumivém roztoku s hovězím sérovým albuminem a azidem sodným (<0,1 %). Přesná koncentrace je uvedena na štítku lahvičky. Po otevření skladujte lahvičku jeden týden při 2-8 °C nebo zmrazenou při < -18 °C do data expirace soupravy.

**Acylační reagentie: jedna lahvička** (prášek)

Obsah lahvičky musí být rozpuštěn přímo před použitím pomocí objemu DMSO uvedeného na štítku. Rozpuštěná reagentie je stabilní při teplotě < -18 °C až do data expirace soupravy. Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně.

**Acylační tlumivý roztok: 1 lahvička 5 ml** (připraven k použití)

Po otevření skladujte lahvičku při 2-8 °C do data expirace soupravy.

**Tlumivý roztok pro uvolnění histaminu: 1 lahvička** (lyofilizovaný)

Tlumivý roztok obsahuje hovězí sérový albumin. Rozpusťte v 25 ml destilované vody. Po otevření skladujte lahvičku při < -18 °C do data expirace soupravy.

**DMSO: 1 lahvička 3 ml** (připraven k použití)

Vyčkejte až se DMSO vytemperuje 18-25 °C a zcela se rozpustí.

**Promývací roztok 20x: 1 lahvička 50 ml**

Koncentrovaný roztok musí být před použitím zředěn. Stabilita po naředění: Jeden měsíc při 2-8 °C nebo zmrazený při < -18 °C do data expirace soupravy

**Tlumivý roztok pro přípravu substrátu: 1 lahvička 30 ml** (připraven k použití)

Tlumivý roztok pro přípravu substrátu je roztok diethanolaminu-HCl.

**Substrát: 2 tablety**

Pracovní roztok substrátu, tj para-nitrofenylfosfátu, se připraví nejméně 30 minut před použitím. Jedna tableta se rozpustí v 15 ml tlumivého roztoku pro přípravu substrátu. Roztok je možno skladovat při 2-8 °C po dobu 24 hodin, nebo zmrazený při < -18 °C do data expirace soupravy.

**Stop roztok: 1 lahvička 6 ml** (připravena k použití)

Jedná se o 1N roztok NaOH. Roztok je při 2-8 °C stabilní do data expirace soupravy.

**Lahvička na konjugát: jedna lahvička**

Prázdna lahvička pro spojení rekonstituovaných konjugátů.

## VYŽADOVANÉ, ALE NEPOSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

**Pro enzymoimunoanalytické stanovení:**

- plastové zkumavky (3 nebo 5 ml)
- přesné mikropipety (20-200 µl, 200-1 000 µl)
- poloautomatické pipety (25 µl, 200 µl)
- vibrační míchadlo
- třepačka mikrotitračních destiček
- promývačka mikrotitračních destiček (volitelné)
- fotometr pro mikrotitrační destičky (filtr 405-414 nm)

Pro uvolňování histaminu:

- mikrotitrační destičky s kulovitými nebo kónickými jamkami (nebo plastové zkumavky)

PI-IM2562-PRINT-05

- vodní lázeň 37 °C

- chlazená centrifuga pro použití s destičkami (nebo zkumavkami)

Pro zpracování pevných vzorků:

- Kyselina chloristá (HClO<sub>4</sub>).
- Boritan draselný (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## POSTUP

**Příprava reagentií**

- Vytemperujte všechny reagentie na laboratorní teplotu.
- Tlumivý roztok pro uvolnění histaminu rozpusťte v 25 ml destilované vody.
- Acylační reagentie rozpusťte přímo před použitím pomocí objemu DMSO uvedeného na štítku. Pokud potřebuje více lahviček, slijte je po rozpuštění do jednoho roztoku.
- Rozpusťte konjugáty v diluentu pro konjugát, potřebný objem je uveden na štítcích lahviček. Po přidání vody nechte volně rozpouštět 20 minut a potom lehce promíchejte. Poté slijte obsah obou lahviček do Lahvičky pro konjugát.
- Přilijte obsah lahvičky s koncentrátem promývacího roztoku do 950 ml destilované vody a promíchejte.
- Substrát připravte rozpuštěním jedné tablety v 15 ml tlumivého roztoku pro přípravu substrátu. Roztok připravujte nejméně 30 minut před použitím.

**Příprava vzorků: acylace**

Postup stanovení zahrnuje acylaci vzorků, kalibrátorů a kontrolních vzorků. Acylované vzorky jsou poměrně stabilní a mohou být skladovány 3 dny při 2-8 °C.

**Postup**

Acylační krok	Imunologický krok	Enzymatický krok	Odečet absorbance
Do čistých plastových zkumavek pipetujte: 25µl acylačního tlumivého roztoku, 100µl kalibrátoru, kontrolního nebo neznámého vzorku 25 µl acylačního činidla. Okamžitě zamíchejte na vibračním míchadle.	Do jamek potažených protilátkou pipetujte 50 µl acylovaného kalibrátoru, kontrolního nebo neznámého vzorku a 200 µl konjugátu, inkubujte 2 hodiny při 2-8 °C za stálého třepání (350 kmitů/min).*	3x promyjte 350µl zředěného promývacího roztoku.** Přidejte 200µl substrátu. Inkubujte 30 minut při 18-25 °C za stálého třepání (350 kmitů/min)* a ve tmě.	Přidejte 50 µl stop roztoku.  Odečtěte absorbanci při 405-414 nm.

\* Alternativně inkubujte 18 hodin bez třepání při 2-8 °C. Enzymatický krok musí být poté zredukován na 20 minut.

\*\* Promývání destičky: Způsob provedení tohoto kroku je rozhodující pro získání očekávaných výsledků. V době mezi promytím a přidáním další reagentie nesmí jamky vyschnout.

Použití automatické promývačky:

Vyberte program se třemi promývacími cykly a s těmito parametry:

- Tekutina musí být z jamek dokonale odsáta.
- Jamky musí být naplněny promývacím roztokem až po okraj.
- Promývací roztok musí být vstříkovan rychle (pro naplnění jamky přibližně sekunda)
- Promývací roztok musí být po třetím cyklu odsát úplně.

Ruční promývání

Opakujte 3x následující kroky:

- Otočte mikrotitrační destičku nad vylevkou dnem vzhůru a silně s ní zatřeste.

- Naplňte jamky promývacím roztokem po okraj, roztok může přetékat přes okraj jamek.
- Otočte mikrotitrační destičku nad výlevkou dnem vzhůru a silně s ní zatřeste, pak destičkou otočenou dnem vzhůru silně poklepejte o čistý savý papír.

## VÝSLEDKY

Výsledky jsou získány proložením z kalibrační křivky. Křivka slouží k určení koncentrace histaminu pouze ve vzorcích měřených současně s kalibrátory.

### Kalibrační křivka

Výsledky v oddělení kontroly kvality jsou vypočteny za použití křivky *spline* s parametrem *B/T* nebo *B/B<sub>0</sub>* na svislé ose logit a koncentrací analytu kalibrátorů na vodorovné logaritmické ose (nM).

Jiné metody zpracování mohou dávat mírně rozdílné výsledky.

Kalibrátory	Histamin (nM)	Absorbance	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Příklad kalibrační křivky, nepoužívejte pro vyhodnocení).

### Vzorky

- Koncentrace v plazmě odpovídají koncentracím odečteným z kalibrační křivky.
- Hodnoty získané pro uvolněný histamin musí být vynásobeny 10,5x.
- Hodnoty získané pro celkový histamin musí být vynásobeny 20x.
- Výsledky stanovení v jiných vzorcích musí být vynásobeny odpovídajícím ředicím faktorem.

## OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. Následující hodnoty zjištěné u zdravých jedinců mají pouze orientační charakter.

- Plazma: < 10 nM (1 ng/ml)
- Plná krev: 200-2 000 nM (20-200 ng/ml)
- Stimulace buněk, pokud je pozitivní: >10 % celkového histaminu
- Spontánní uvolnění histaminu: < 5 % celkového histaminu
- Moč: 10-35 µg/g kreatininu

## KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá, že se kontrolní vzorek používá v každé kalibraci, aby se zajistila kontrola kvality získaných výsledků. Kontrolní vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení, kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. E-mail: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

(Podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

Vzorová data slouží pouze k ilustrativním účelům. Výsledky získané v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

### Mez detekce

**Analytická citlivost:** 0,52 nM

### Specifita

Stanovení je specifické pro histamin.

### Přesnost

#### Intra-assay

Vzorky EDTA plasmy byly analyzovány 25x v jednom stanovení. Nalezené hodnoty variačních koeficientů nepřesáhly 11,0 %.

#### Inter-assay

Vzorky EDTA plasmy byly stanoveny v duplikátech v 10 různých stanoveních. Nalezené hodnoty variačních koeficientů nepřesáhly 13,6 %.

### Správnost

#### Test ředění

Vzorky EDTA plasma s vysokou koncentrací byly postupně ředěny nulovým kalibrátorem a analyzovány. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 95,1 % až 119 %.

#### Test „recovery“

Ke vzorkům EDTA plasmy s nízkou hladinou histaminu byla přidána známá množství histaminu. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 92,2 % až 119 %.

**Rozsah stanovení** (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru):

0,52 do přibližně 100 nM.

## OMEZENÍ

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům. Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

### Interferující látky

Nepoužívejte hemolyzované, ikterické ani lipemické vzorky.

Stanovení uvolnění histaminu nelze provést ve vzorcích krve od těhotných žen, protože takové vzorky obsahují vysoké hladiny diaminoxidázy.

Materiály obsahující aminy v koncentraci přesahující 10 mM interferují s acylací histaminu.

Fenol inhibuje uvolňování histaminu.

Histamin může být obsažen v alergenech jako takových, jako např. v jedu blanokřídlého hmyzu.

## EIA Histamine

**REF** IM2562

### НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО IN VITRO ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Для диагностики *in vitro*.

### ПРИНЦИП РАБОТЫ

Иммуноферментное определение гистамина относится к конкурентным видам анализа. На первой стадии гистамин, содержащийся в калибровочных, контрольных и анализируемых образцах, подвергаются химической модификации – ацилированию. Образцы с ацилированным гистамином инкубируют в лунках, покрытых моноклональными антителами, в присутствии конъюгата ацилированный гистамин - щелочная фосфатаза. После инкубации лунки промывают для удаления несвязанных компонентов и добавляют хромогенный субстрат для определения связанной ферментативной активности.

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

#### Общие замечания:

- Не смешивать реагенты из наборов разных серий.
- Флаконы с калибраторами и контролями следует открывать непосредственно перед использованием, во избежание чрезмерного испарения.
- Анализ калибровочных и исследуемых проб должен проводиться одновременно.
- Анализ рекомендуется проводить в дубликатах.
- Перед использованием довести реагенты до комнатной температуры.
- Для манипуляций с таблетками субстрата рекомендуется использовать пинцет, т.к. контакт с кожей рук может негативно сказаться на качестве реагента.
- При проведении анализа рекомендуется использовать резиновые перчатки, чтобы предотвратить попадание в реагенты экзогенного гистамина, например, с потом.
- Так как гистамин адсорбируется стеклом, рекомендуется использовать пластмассовые пробирки, пипетки и другое оборудование.

#### Азид натрия

Некоторые реагенты в качестве консерванта содержат азид натрия. Азид натрия способен реагировать со свинцом, медью или латунью с образованием взрывчатых азидов металла. Утилизацию азидов натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

#### Материал человеческого происхождения

Все образцы крови следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом, могущим содержать вирусы СПИД и гепатита. Утилизация отходов должна осуществляться в соответствии с законодательством.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Wash Solution (20x)

ОПАСНО!



H360

Может привести к нарушению репродуктивной функции или нанести вред ребенку в утробе матери.

P201

Перед использованием получить специальные инструкции.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

P308+P313

ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью. Борная кислота 0,1 - 0,3% Натрия борат, декагидрат 0,1 - 0,3%

Stop Solution (NaOH)

ОПАСНО!



H314

Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

P301+P330+P331

ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: прополоскать рот, НЕ вызывать рвоту.

P303+P361+P353

ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.

P305+P351+P338

ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.

P310

Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. Каустическая сода 3 - 6%

Substrate buffer

ОПАСНО!



H316

Вызывает незначительное раздражение кожи.

H318

Вызывает серьезные повреждения глаз.

H373

Может наносить вред органам в результате длительного или многократного воздействия.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

P305+P351+P338

ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.

P310





Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.

P314

В случае плохого самочувствия обратиться к врачу.

P332+P313

При раздражении кожи: обратиться к врачу.

Conjugate diluent	ОПАСНО!	Диэтаноламин 7 - 10%	P403+P233	Хранить в хорошо вентилируемом месте. Держать контейнер плотно закрытым. Диметил сульфоксид > 95%
				
	H360	Может привести к нарушению репродуктивной функции или нанести вред ребенку в утробе матери.	Acylation Buffer	ОПАСНО!
	P201	Перед использованием получить специальные инструкции.		
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.		H360
	P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью. Борная кислота 0,1 - 0,5%		Может привести к нарушению репродуктивной функции или нанести вред ребенку в утробе матери.
Conjugate	ОПАСНО!		P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
			P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	H360	Может привести к нарушению репродуктивной функции или нанести вред ребенку в утробе матери.	P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью. Борная кислота 1 - 5%
	P201	Перед использованием получить специальные инструкции.		
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.		
	P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью. Борная кислота 0,5 - 1%		
DMSO	ОСТОРОЖНО!			
				
	H227	Горючая жидкость		
	H315	Вызывает раздражение кожи.		
	H319	Вызывает серьезное раздражение глаз.		
	H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей.		
	P261	Избегать вдыхания паров.		
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.		
	P304+P340	ПРИ ВДЫХАНИИ: вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.		
	P312	Обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/к врачу в случае плохого самочувствия.		
	P337+P313	Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.		



Паспорт безопасности доступен на сайте [beckmancoulter.com/techdocs](http://beckmancoulter.com/techdocs)

## СБОР, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

### Плазма

- собрать кровь в охлажденные пробирки с ЭДТА и немедленно поместить их на лед. Нельзя использовать другие виды антикоагулянтов.
- Не позднее, чем через 20 минут после отбора, центрифугировать пробы в течение 10 минут при 900 g и 4°C
- собрать сверху 2/3 объема отделившейся плазмы
- Плазму можно разводить фосфатным буфером

### Моча

- Собрать мочу в пластмассовый контейнер. В образцы мочи добавить бактериостатический агент или заморозить их до проведения анализа.
- Перед анализом развести мочу фосфатным буфером в 25 раз

### Высвобождение гистамина из цельной крови

Не перемешивать кровь на вихревом смесителе.

Взятие проб крови: собрать 1-2 мл крови в пробирки, содержащие гепарин. Не использовать другие виды антикоагулянтов, в частности, ЭДТА. Если анализ не будет проводиться немедленно, образцы крови можно хранить при 18-25°C не более 24 часов.

Лизис клеток для определения общего гистамина: К 50 мкл цельной крови добавить 950 мкл дистиллированной воды (разведение в 20 раз). Образцы дважды заморозить и оттаять.

### Провокация клеток:

- **Провокация клеток агентом, стимулирующим высвобождение гистамина:** Развести образцы цельной крови в 7 раз буфером для высвобождения гистамина (например, смешать 500 мкл цельной крови + 3 мл буфера). В лунки микропланшета внести по 50 мкл растворов агентов, стимулирующих высвобождение гистамина, и добавить к ним по 100 мкл образцов цельной крови, разведенной в 7 раз. Накрыть планшет крышкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C. Если провокацию клеток проводят в пробирках, все объемы реагентов можно увеличить в 2 раза.
- **Для спонтанной секреции гистамина в лунки микропланшета** внести по 50 мкл буфера для высвобождения гистамина и добавить по 100 мкл образцов цельной крови, разведенной в 7

раза. Накрывать планшет крышкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.

- **Отбор проб после высвобождения гистамина:** центрифугировать пробы в течение 5 минут при 900 г и 4°C, затем поставить планшет на измельченный лед и из каждой лунки аккуратно отобрать по 100 мкл супернатантов, не затрагивая клеточного осадка

#### Жидкие образцы

Собрать образцы в пластмассовые пробирки.

#### Образцы плотных тканей

Для экстракции гистамина добавить по 10 мкл 0,2N HClO<sub>4</sub> на каждый миллиграмм ткани, гомогенизировать смесь ультразвуком или в гомогенизаторе и центрифугировать пробы в течение 5 минут при 10 000 г и температуре < 4°C. Собрать супернатант и при необходимости осветлить его фильтрованием. Нейтрализовать супернатант (pH 6-8) добавлением равного объема 1M раствора бората калия. Центрифугировать при 10 000 г в течение 1 минуты при температуре <4°C. Собрать супернатант в пластмассовые пробирки.

#### Хранение образцов

Если анализ не будет проводиться немедленно, все типы образцов, кроме проб цельной крови для провокации секреции гистамина, можно хранить в пластмассовых пробирках при температуре < -18°C.

## ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Все компоненты нескрытого набора стабильны при 2-8°C до окончания срока годности набора, указанного на его этикетке.

Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

**Планшет с моноклональными антителами к гистамину: 12 x 8 лунок** (готов к использованию)

Неиспользованные стрипы можно хранить при 2-8°C в прилагаемом закрывающемся пакете.

**Конъюгат гистамин-щелочная фосфатаза: 2 флакона** (лиофилизированный препарат)

Флакон содержит конъюгат гистамина с щелочной фосфатазой, лиофилизированный в присутствии альбумина бычьей сыворотки. Восстановите конъюгат, используя объем дилюента конъюгата, указанный на этикетке флакона, и перелейте содержимое обоих флаконов с восстановленным конъюгатом во флакон для конъюгата. После восстановления конъюгат стабилен в течение одной недели при 2-8°C или при < -18°C до окончания срока годности набора.

**Растворитель: 1 флакон, 25 мл** (готов к использованию)

Растворитель предназначен для растворения лиофилизованного препарата конъюгата. Растворитель можно хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора

**Калибровочные пробы: 6 флаконов по 1 мл** (готовы к использованию)

Калибровочные пробы содержат неацелированный гистамин в диапазоне концентраций от 0 до приблизительно 100 нМ в буфере с бычьим сывороточным альбумином и азидом натрия (<0,1%). Точные концентрации указаны на этикетках флаконов. Вскрытые флаконы с калибровочными пробами можно хранить при 2-8°C в течение недели, или при < -18°C до окончания срока годности набора. Значения калибровочных проб были получены с помощью внутреннего стандарта.

**Контрольная сыворотка: 1 флакон, 1 мл** (готова к использованию)

Контрольная проба содержит известное количество неацелированного гистамина в буфере с бычьим сывороточным альбумином и азидом натрия (<0,1%). Ожидаемый диапазон концентраций указан на этикетке флакона. Вскрытый флакон с контрольной пробой можно хранить при 2-8°C в течение недели, или при < -18°C до окончания срока годности набора.

**Ацилирующий реагент: один флакон** (порошок)

Содержимое флакона следует растворить непосредственно перед использованием в указанном на этикетке объеме DMSO. Растворенный реагент стабилен при < -18°C до окончания срока хранения набора. Избегайте многократного замораживания и размораживания.

**Буфер для ацилирования: 1 флакон, 5 мл** (готов к использованию)

Вскрытый флакон с буфером можно хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.

**Буфер для высвобождения гистамина: 1 флакон** (лиофилизированный препарат)

Буфер содержит бычий сывороточный альбумин. Растворить содержимое флакона в 25 мл дистиллированной воды. Подготовленный к работе буфер можно хранить при < -18°C до окончания срока годности набора.

**DMSO: 1 флакон, 3 мл** (готов к использованию)

Перед использованием довести содержимое флакона до 18-25°C, чтобы DMSO полностью превратился в жидкость.

**Промывочный раствор (20x): 1 флакон, 50 мл**

Концентрированный раствор должен быть разведен перед использованием дистиллированной водой. Подготовленный к работе промывочный раствор можно хранить при 2-8°C в течение месяца, или при < -18°C до окончания срока годности набора.

**Субстратный буфер: 1 флакон, 30 мл** (готов к использованию)

В состав субстратного буфера входят диэтаноламин и HCl.

**Субстрат: 2 таблетки**

Субстратный раствор паранитрофенилфосфата должен быть приготовлен не менее, чем за 30 минут до использования. Для этого одну таблетку субстрата нужно растворить в 15 мл субстратного буфера. Подготовленный к работе субстратный раствор можно хранить при 2-8°C в течение суток, или при < -18°C до окончания срока годности набора.

**Стоп-раствор: 1 флакон, 6 мл** (готов к использованию)

Стоп-раствор представляет собой 1N раствор NaOH. Препарат можно хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.

**Флакон для конъюгата: один флакон**

Пустой флакон для соединения восстановленных конъюгатов.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Помимо стандартного лабораторного оборудования необходимо иметь следующее:

**Для иммунологического анализа:**

- пластмассовые пробирки (3 или 5 мл)
- микропипетки (20-200, 200-1 000 мкл)
- полуавтоматические пипетки (25, 200 мкл)
- вихревой смеситель типа "Vortex"
- встряхиватель для микропланшетов
- промывающее устройство для микропланшетов (по желанию)
- ридер для микропланшетов (405-414 нм)

Для высвобождения гистамина:

- Микропланшет с коническими или сферическими лунками (или пластмассовые пробирки)
- водяная баня на 37°C
- центрифуга для микропланшетов или пробирок (с охлаждением)

Для обработки плотных образцов тканей:

- Хлорная кислота (HClO<sub>4</sub>).
- Борат калия (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## ПРОЦЕДУРА

**Подготовка реагентов**

- Довести все реагенты до комнатной температуры.
- Растворить лиофилизированный препарат буфера для высвобождения гистамина в 25 мл дистиллированной воды.
- Растворяют непосредственно перед использованием ацилирующий реагент указанным на этикетке объемом DMSO. Если требуется несколько флаконов, соединяют после растворения.

- Восстановите конъюгаты, используя объем дилуента, указанный на этикетках флаконов. Подождите 20 минут до перемешивания. Затем перелейте содержимое обоих флаконов с восстановленным конъюгатом во флакон для конъюгата.
- Тщательно перемешать содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и 950 мл дистиллированной воды.
- Не позднее, чем за 30 минут до использования, растворить одну таблетку субстрата в 15 мл субстратного буфера.

#### Подготовка образцов: ацилирование

Процедура анализа включает стадию ацилирования калибровочных, контрольных и исследуемых образцов. Ацилированные образцы достаточно стабильны и могут храниться при 2-8°C в течение 3 дней.

#### Процедура

Стадия ацилирования	Иммунологическая стадия	Энзиматическая стадия	Измерение результатов
В чистые пластмассовые пробирки внести 25 мкл ацилирующего буфера, 100 мкл калибровочных, контрольных и анализируемых проби 25 мкл ацилирующего реагента. Немедленно перемешать.	В покрытые антителами лунки внести по 50 мкл ацилированных калибровочных, контрольных и анализируемых образцов и 200 мкл конъюгата. Инкубировать 2 часа при 2-8°C и постоянном встряхивании (350 осц./мин.).*	Промыть лунки 3 раза 350 мкл разбавленным промывочным раствором.** Внести по 200 мкл субстрата. Инкубировать 30 минут при 18-25°C и постоянном встряхивании (350 осц./мин.)* без доступа света.	Внести в лунки по 50 мкл стоп-раствора.          Измерить оптическую плотность при 405-414 нм.

\* Или инкубируйте 18 часов без встряхивания при 2-8°C. После этого ферментный этап следует сократить до 20 минут.

\*\* Промывка планшетов: Правильное выполнение данной стадии важно для получения ожидаемых и воспроизводимых результатов. Не допускать высыхания промытых лунок перед внесением следующего реагента.

Использование промывающего устройства для микропланшетов

Выбрать программу с тремя циклами промывки и отвечающую следующим требованиям:

- Жидкость из лунок должна удаляться полностью.
- Лунки должны полностью заполняться промывочным раствором.
- Лунки должны быстро заполняться промывочным раствором (каждая примерно за 1 секунду).
- После трех циклов промывки промывочный раствор должен быть удален полностью.

Ручная промывка

Провести не менее трех циклов промывки с соблюдением следующих рекомендаций:

- Перевернуть планшет вверх дном и интенсивно встряхнуть его над раковиной.
- Заполнить лунки промывочным раствором. Раствор может переливаться через края лунок.
- Перевернуть планшет вверх дном и интенсивно встряхнуть его над раковиной, а затем плотно прижать к фильтровальной бумаге.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты рассчитывают методом интерполяции по калибровочной кривой, полученной одновременно с анализом неизвестных образцов.

#### Калибровочная кривая

Результаты в отделе контроля качества рассчитаны с использованием подбора кривой *spline* «сплайн» с  $V/T$  или  $V/B_0$

по логистической вертикальной оси и концентрацией аналита калибраторов на логарифмической горизонтальной оси (нМ).

Другие методы обсчета могут давать несколько отличающиеся результаты.

Калибраторы	Гистамин (нмоль/л)	Поглощение	$V/B_0$ (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Пример типичной калибровочной кривой. Не использовать для обсчета результатов.)

#### Образцы

- Концентрацию гистамина в образцах плазмы определяют непосредственно по калибровочной кривой.
- Значения, полученные в образцах после высвобождения гистамина, следует умножить на 10,5.
- Для определения общего количества гистамина измеренный результат следует умножить на 20.
- Результаты, полученные в других видах образцов, следует умножить на фактор разведения.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В каждой лаборатории рекомендуется установить собственные значения уровней гистамина, соответствующие нормальным. Приведенные ниже результаты являются всего лишь ориентировочными.

- Плазма: < 10 нМ (1 нг/мл)
- Цельная кровь: 200-2000 нмоль/л (20-200 нг/мл)
- Позитивная провокация клеток: >10% от общего количества гистамина
- Спонтанная секреция: < 5% от общего количества гистамина
- Моча: 10-35 мкг/г креатинина.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с требованиями Good laboratory practices для контроля качества проводимых исследований следует регулярно использовать контрольные образцы, которые должны проходить те же стадии анализа, что и анализируемые пробы. Результаты контроля качества рекомендуется обрабатывать с помощью специальных статистических методов.

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам обратитесь, пожалуйста, к нашему специалисту. E-mail: imunochem@beckman.com или beckman.ru@beckman.com

## ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(Более подробная информация приведена в разделе "APPENDIX")

Репрезентативные данные предоставлены исключительно для пояснений. Показатели, полученные в конкретной лаборатории, могут отличаться.

#### Чувствительность

Аналитическая чувствительность: 0,52 нМ

#### Специфичность

данный набор обеспечивает специфичное определение гистамина

#### Воспроизводимость

#### Внутри анализа

Анализ образцов плазмы ЭДТА проводили в 25 репликациях в пределах одной серии определений. Коэффициент вариации не превышал 11,0%.

#### Между анализами

Анализ образцов плазмы ЭДТА в дубликатах проводили в 10 различных сериях определений. Коэффициент вариации не превышал 13,6%.

## **Точность**

### **Тест на разведение**

Образцы плазмы ЭДТА с высокой концентрацией гистамина серийно разводили в "нулевой" калибровочной пробой. Измеренное значение "открытия" составляло от 95,1% до 119%.

### **Тест на открытие стандартной добавки**

Известные количества гистамина вносили в образцы плазмы ЭДТА с низким его содержанием. Измеренное значение "открытия" составляло от 92,2% до 119%.

**Диапазон определений** (от аналитической чувствительности до значения наивысшей калибровочной пробы):

0,52 – приблизительно 100 нМ.

## **ОГРАНИЧЕНИЯ**

Нарушение методики проведения анализа может привести к искажению результатов исследования. Результаты определения должны быть

интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данные других тестов и подходящую иную информацию.

### **Влияющие факторы**

Не используйте гемолизированные, желтушные или липемические образцы.

Для анализа нельзя использовать образцы крови беременных женщин, т. к. в них содержится большое количество диаминооксидазы.

Присутствие в биологическом материале других видов аминов в концентрации свыше 10 мМ может препятствовать ацилированию гистамина.

Фенол подавляет высвобождение гистамина.

Гистамин может являться компонентом аллергенов, таких как яд перепончатокрылых.

# EIA Histamine

**REF** IM2562

## ENZIMSKA IMUNOANALIZA ZA IN VITRO ODREĐIVANJE HISTAMINA U BIOLOŠKIM UZORCIMA Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

### PRINCIP

Enzimaska imunoanaliza histamina je kompetitivna analiza. Histamin uzoraka, kontrola ili kalibratora se hemijski modifikuje u acilovani histamin tokom prvog koraka. Acilovani histamin se inkubira u bunarčićima obloženim monoklonskim antitelom u prisustvu konjugata histamina acilovanog alkalnom fosfatazom. Nakon inkubacije, bunarčići se ispiraju da bi se uklonile nevezane komponente. Vezana enzimaska aktivnost se potom meri nakon dodavanja hromogenog supstrata.

### UPOZORENJE I MERE OPREZA

#### Opšte napomene:

- Ne mešati reagense iz kitova različitih lotova.
- Bočice sa kalibratorima i kontrolama treba da budu otvorene što je kraće moguće da bi se izbeglo prekomerno isparavanje.
- Standardna kriva mora biti obuhvaćena sa svakim testom.
- Preporučeno je da se test vrši u duplikatu.
- Neka svi reagensi dostignu sobnu temperaturu.
- Kontakt tablete supstrata i kože može nepoželjno da utiče na proizvod. Za rukovanje tabletama koristite pincetu.
- Obavezno nosite rukavice, kako ne bi došlo do kontaminacije spoljnim histaminom, npr. usled disanja.
- Histamin se adsorbira na staklo, koristiti samo plastične pipete, epruvete itd.

#### Natrijum azid

Neki reagensi sadrže natrijum azid kao konzervans. Natrijum azid može da reaguje sa olovom, bakrom i mesingom i tako formira eksplozivne metalne azide. Odlaganje u otpad natrijum azida mora biti u skladu sa odgovarajućim lokalnim propisima.

#### Materijali humanog porekla

Sa svim uzorcima seruma i plazme treba postupati kao da su sposobni za prenos hepatitisa ili AIDS-a tako da otpad treba odlagati u skladu sa propisima.

### GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Wash Solution (20x)

OPASNOST



H360

Može da ošteti plodnost ili nerođeno dete.

P201

Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

P308+P313

AKO ste izloženi ili zabrinuti: Potražite medicinski savet/mišljenje.

Borna kiselina 0,1 - 0,3%  
Natrijum-borat dekahidrat 0,1 - 0,3%

Stop Solution (NaOH)

OPASNOST



H314

Izaziva teške opekotine kože i oštećenje oka.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

Substrate buffer

P301+P330+P331

AKO SE PROGUTA: isperite usta. NE izazivati povraćanje.

P303+P361+P353

AKO DOSPE NA KOŽU (ili u kosu): Isprati kožu vodom.

P305+P351+P338

DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.

P310

Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara.

Natrijum hidroksid 3 - 6%

OPASNOST



H316

Izaziva blagu iritaciju kože.

H318

Izaziva ozbiljno oštećenje očiju.

H373

Može da dovede do oštećenja organa usled dugotrajnog ili višekratnog izlaganja.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

P305+P351+P338

DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.

P310

Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara.

P314

Potražiti medicinski savet/mišljenje, ako se ne osećate dobro.

P332+P313

Ako dođe do iritacije kože: Potražiti medicinski savet/mišljenje.

Dietanolamin 7 - 10%

Conjugate diluent

OPASNOST



H360

Može da ošteti plodnost ili nerođeno dete.

P201

Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

P308+P313

AKO ste izloženi ili zabrinuti: Potražite medicinski savet/mišljenje.

Borna kiselina 0,1 - 0,5%

Conjugate

OPASNOST



H360

Može da ošteti plodnost ili nerođeno dete.


P201

Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.




	P308+P313	AKO ste izloženi ili zabrinuti: Potražite medicinski savet/mišljenje. Borna kiselina 0,5 - 1%
DMSO	UPOZORENJE	
		
	H227	Zapaljiva tečnost
	H315	Izaziva iritaciju kože.
	H319	Izaziva ozbiljnu iritaciju očiju.
	H335	Može da uzrokuje iritaciju respiratornih organa.
	P261	Izbegavati udisanje isparenja.
	P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
	P304+P340	AKO SE UDAHNE: Izmestiti izloženo lice na svež vazduh i ostaviti ga da miruje u položaju koji mu olakšava disanje.
	P312	Pozvati CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili doktora/lekara ako se ne osećate dobro.
	P337+P313	Ako dođe do iritacije oka: Potražiti medicinski savet/mišljenje.
	P403+P233	Čuvati u prostoriji sa dobrom ventilacijom. Čuvati ambalažu čvrsto zatvorenu. Dimetil sulfoksid > 95%

Acylation Buffer OPASNOST



	H360	Može da ošteti plodnost ili nerođeno dete.
	P201	Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.
	P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
	P308+P313	AKO ste izloženi ili zabrinuti: Potražite medicinski savet/mišljenje. Borna kiselina 1 - 5%

 Dokument „Bezbednosni list“ dostupan je na internet stranici  
beckmancoulter.com/techdocs

## PRIKUPLJANJE UZORAKA, OBRADA, SKLADIŠTENJE I RAZBLAŽIVANJE

### Plazma

- uzmite uzorak krvi u rashlađenu epruvetu koja sadrži samo EDTA i odmah ohladite na ledu
- centrifugirajte 10 minuta brzinom od 900 g na temperaturi od 4°C u roku od 20 minuta od uzimanja uzorka
- aspirirajte gornje 2/3 plazme
- plazma može da se razblaži u PBS-u

### Urin

- Prikupite uzorak urina u plastičnu posudu. Zamrznite uzorak ili dodajte bakteriostatičko sredstvo.
- razblažite uzorke 1:25 u PBS-u

### Oslobađanje histamina u punoj krvi

Ne mešati ćelijsku suspenziju.

**Uzimanje uzorka krvi:** uzmite 1–2 ml krvi u epruvete koje sadrže samo heparin, nemojte da koristite EDTA. Čuvajte uzorke na temperaturi 18–25°C najduže 24 sata ako nije moguće analizu obaviti odmah.

**Ukupni histamin nakon lize ćelija:** Dodajte 50 µl nerazblažene krvi u 950 µl destilovane vode (razblaživanje 1:20). Dvapat zamrznite i odmrznite.

#### Izazivanje ćelije:

- **izazivanje sa sredstvom koje oslobađa histamin:** razblažite punu krv 1:7 u puferu koji oslobađa histamin (npr. 500 µl pune krvi + 3 ml pufera), dodajte 50 µl različitih razblaživanja oslobađajućeg agensa u bunarčice ploče, pa zatim dodajte 100 µl pune krvi razblažene 1:7. Inkubirajte ploču pokrivenu poklopcem 30 minuta na 37°C (sve zapremine mogu da se dupliraju ako su ćelije izazvane u epruvetama).
- **spontano oslobađanje histamina:** dodajte 50 µl pufera za oslobađanje histamina u bunarčice ploče, pa zatim dodajte 100 µl pune krvi razblažene 1:7. Inkubirajte ploču pokrivenu poklopcem 30 minuta na temperaturi 37°C.
- **vraćanje oslobođenog histamina:** centrifugirajte 5 minuta brzinom od 900 g na temperaturi od 4°C i držite ploču na drobljenom ledu nakon centrifugiranja, pažljivo uzmite 100 µl tečnosti supernatanta bez uznemiravanja ćelijskog peleta.

#### Tečni uzorci

Sakupiti uzorke u plasticne epruvete.

#### Čvrsti uzorci

Izdvojite histamin sa 10 µl po mg tkiva 0,2 N HClO<sub>4</sub>, homogenizujte sonifikacijom ili zdrobite i centrifugirajte brzinom od 10.000 g 5 minuta na temperaturi <4°C. Prikupite supernatant i razbristrite filtracijom, po potrebi. Neutrališite (pH 6–8) tečnost supernatanta dodavanjem jednake zapremine od 1 M kalijum-borata. Centrifugirajte brzinom od 10.000 g, 1 minut na temperaturi <4°C. Prikupite tečnost supernatanta u plastične epruvete.

#### Čuvanje uzorka

Osim kod izazivanja ćelija pune krvi, čuvajte sve uzorke na temperaturi od <-18°C u plastičnim epruvetama ako analizu nije moguće obaviti odmah.

## ISPORUČENI MATERIJALI

Pre otvaranja su svi reagensi kompleta stabilni do datuma isteka roka trajanja navedenog na nalepnici na kompletu, ukoliko se čuvaju na temperaturi 2–8°C.

Datum isteka roka trajanja na nalepticama bočica odnose se na dugoročno skladištenje komponenti samo od strane proizvođača, pre sklapanja kompleta. Ne uzimajte ovo u obzir.

**Ploča obložena antitelom antihistamina: 12 x 8 bunarčica** (spremno za upotrebu)

Neupotrebljene trake moraju da se čuvaju na temperaturi 2–8°C u isporučenoj vrećici sa samozatvaranjem.

**Konjugat histamin-alkalne fosfataze: dve bočice** (liofilizovano)

Bočica sadrži konjugat histamin-alkalne fosfataze liofilizovan u prisustvu albumina goveđeg seruma. Rekonstituišite konjugat sa zapreminom razređenog konjugata navedenom na nalepnici bočice i sipajte sadržinu u obe bočice sa rekonstituisanim konjugatom u bočicu za konjugat. Nakon rekonstitucije, konjugat je stabilan jednu nedelju na temperaturi 2–8°C ili na temperaturi <-18°C do isteka roka trajanja kompleta.

**Diluent: jedna bočica od 25 ml** (spremna za upotrebu)

Razređivač se koristi za rekonstituciju konjugata. Razređivač je stabilan na temperaturi 2–8°C do isteka roka trajanja kompleta.

**Kalibratori: šest bočica po 1 ml** (spremno za upotrebu)

Bočice sadrže od 0 do približno 100 nM neacilovanog histamina, u puferu sa albuminom goveđeg seruma i natrijum-azida (<0,1%). Nakon otvaranja, bočicu čuvajte jednu nedelju na temperaturi 2–8°C ili na temperaturi <-18°C do isteka roka trajanja kompleta. Kalibratori se verifikuju prema internom referentnom standardu.

**Kontrolni uzorak: jedna bočica od 1 mL** (spremne za upotrebu)

Bočica sadrži neacilovani histamin, u puferu sa albuminom goveđeg seruma i natrijum-azida (<0,1%). Očekivane vrednosti se nalaze u analitičkom mernom opsegu koji je naveden na nalepnici na bočici. Nakon otvaranja, bočicu čuvajte jednu nedelju na temperaturi 2–8°C ili na temperaturi <-18°C do isteka roka trajanja kompleta.

## Reagens za acilovanje: jedna bočica (prašak)

Sadržina bočice mora da se rastvori neposredno pre korišćenja u zapremini DMSO navedenoj na nalepnici. Rastvoreni reagens je stabilan na temperaturi <-18°C do isteka roka trajanja kompleta. Izbegavajte ponovljano zamrzavanje i odmrzavanje.

## Pufer za acilaciju: jedna bočica od 5 ml (spremno za upotrebu)

Nakon otvaranja, skaldistiti bocicu na 2-8°C do siteka roka oznacenog na pakovanju.

## Pufer za oslobađanje histamina: jedna bočica (liofilizovano)

Pufer sadrži albumin goveđeg seruma. Rekonstituišite sa 25 ml destilovane vode. Nakon otvaranja, čuvajte bočicu na temperaturi <-18°C do isteka roka trajanja kompleta.

## DMSO: jedna bočica od 3 ml (spremno za upotrebu)

Sačekajte da rastvarač dostigne ravnotežu na temperaturi 18-25°C pre nego što se potpuno rastopi.

## Rastvor za pranje (20x): jedna bočica od 50 ml

Koncentrovani rastvor se pre upotrebe mora razblažiti. Stabilnost nakon razblaživanja: jedan mesec na temperaturi 2-8°C ili na <-18°C do isteka roka trajanja kompleta.

## Pufer supstrata: jedna bočica od 30 ml (spremno za upotrebu)

Pufer supstrata je rastvor dietanolamin-HCl.

## Supstrat: dve tablete

Radni rastvor supstrata paranitrofenil-fosfat priprema se najmanje 30 minuta pre korišćenja, rastvaranjem jedne tablete u 15 ml pufera supstrata. Rastvor je stabilan 24 sata na temperaturi 2-8°C ili, ako se čuva na temperaturi <-18°C, do isteka roka trajanja kompleta.

## Rastvor za zaustavljanje: jedna bočica od 6 ml (spremno za upotrebu)

Ovaj rastvor je rastvor 1 N NaOH. Rastvor je stabilan na temperaturi 2-8°C do isteka roka trajanja kompleta.

## Bočica za konjugat: jedna bočica

Ispraznite bočicu za fuziju rekonstituisanih konjugata.

## POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU OBEZBEĐENI

Pored standardne laboratorijske opreme, potrebne su sledeće stavke:

### Za imunotest:

- Plasticne epruvete (3 ili 5 ml)
- precizne mikropipete (20-200, 200-1.000 µl)
- ponavljanje mikropipetiranja (25, 200 µl)
- Vorteks tip miksera
- tresać mikrotitarske ploče
- sredstvo za pranje ploče za mikrotitraciju (opciono)
- čitač mikrotitarske ploče (405-414 nm)

### Za oslobađanje histamina:

- mikrotitarska ploča sa sfernim ili konusnim bunarčićima (ili plastičnim epruvetama)
- vodena kupka temperature 37°C
- Centrifuga sa hladjenjem za ploce (ili epruvete)

### Za obradu čvrstih uzoraka:

- Perhlorna kiselina (HClO<sub>4</sub>).
- Kalijum borat (K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).

## POSTUPAK

### Priprema reagenasa

- Neka svi reagensi dostignu sobnu temperaturu.
- Rekonstituišite pufer za oslobađanje histamina sa 25 ml destilovane vode.
- Neposredno pre upotrebe rastvorite reagens za acilaciju sa količinom DMSO koja je navedena na nalepnici. Ukoliko je potrebno više bočica, pulirajte nakon rastvaranja.
- Rekonstituišite konjugate zapreminom razređivača navedenom na nalepnicama bočica. Sačekajte 20 minuta pre mešanja. Zatim sipajte

sadržinu obe bočice sa rekonstituisanim konjugatom u bočicu za konjugat.

- Sipajte sadržinu bočice sa koncentrovanim sredstvom za pranje u 950 ml destilovane vode i homogenizujte.
- Pripremite supstrat tako što ćete rastvoriti jednu tabletu u 15 ml pufera supstrata, najmanje 30 minuta pre korišćenja.

### Priprema uzoraka: acilacija

Postupak analize obuhvata korak acilacije uzoraka, kalibratora ili kontrola. Acilovani uzorci su prilično stabilni i mogu da se čuvaju 3 dana na temperaturi 2-8°C.

### Postupak testa

Korak acilacije	Imunološki korak	Enzimski korak	Očitavanje
Da biste očistili plastične epruvete, dodajte 25 µl pufera za acilaciju, 100 µl kalibratora, kontrolu ili uzorak, 25 µl rastvora za acilaciju i odmah izmešajte.	U bunarčiće obložene antitelom dodajte 50 µl acilovanog uzorka, kontrole ili kalibratora i 200 µl konjugata. Inkubirajte 2 sata na temperaturi 2-8°C uz protresanje (350 o/min).*	Operite 3 puta sa 350 µl razblaženog rastvora za pranje.** Dodajte 200 µl supstrata. Inkubirajte 30 minuta na temperaturi 18-25°C uz protresanje (350 o/min)* u mraku.	Dodajte 50 µl rastvora za zaustavljanje.  Očitajte apsorbancu na 405-414 nm.

\* Druga mogućnost je inkubiranje 18 sati bez protresanja na temperaturi 2-8°C. Zatim, enzimski korak mora da se skрати na 20 minuta.

\*\* Pranje ploče: Ovaj korak je neophodan da bi se postigao očekivani učinak kompleta. Nakon pranja, bunarčići ne smeju da se osuše pre dodavanja sledećeg reagensa.

Koristite sredstvo za pranje mikrotitarske ploče

Izaberite tri ciklusna programa za pranje ploče koji ispunjavaju sledeće kriterijume za ciklus:

- Tečnost u bunarčićima mora u potpunosti da se aspirira
- Bunarčići moraju do vrha da se napune rastvorom za pranje
- Rastvor za pranje mora brzo da se ubrizga (obično jedna sekunda za punjenje jednog bunarčića)
- Nakon tri ciklusa, tečnost za pranje mora u potpunosti da se aspirira

Ručna procedura

Ponovite najmanje tri ciklusa, na sledeći način:

- Okrenite ploču naopako i žustro je tresite iznad sudopere
- Napunite bunarčiće rastvorom za pranje, rastvor sme da pređe preko ivice bunarčića
- Okrenite ploču naopako i žustro tresite iznad sudopera, a zatim snažno lupkajte okrenutom mikrotitarskom pločom o čisti apsorbujući papir

## REZULTATI

Rezultati su dobijeni interpolacijom sa standardne krive. Kriva služi za određivanje koncentracije histamina u uzorcima izmerene u isto vreme kad i kalibratori.

### Standardna kriva

Rezultati u odeljenju za kontrolu kvaliteta izračunati su upotrebom *spline* (splain) (eng. spline) krive koja ima vrednosti  $B/T$  ili  $B/B_0$  na logit vertikalnoj osi i koncentraciju kalibratora na logaritamskoj horizontalnoj osi (nM).

Druge metode redukcije podataka mogu dati neznatno različite rezultate.

Kalibratori	Histamin (nM)	Apsorbanca	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	1,523	100
1	0,90	1,428	93,2
2	2,60	1,269	81,8
3	8,20	0,969	60,1
4	24,0	0,623	35,2
5	83,0	0,328	13,9

(Primer standardne krive, ne koristiti za proračun)

#### Uzorci

- Koncentracija u Plazmi odgovara vrednosti ocitanoj na standardnoj krivi.
- Vrednosti dobijene za oslobođeni histamin moraju da se pomnože sa 10,5.
- Vrednosti dobijene za ukupni histamine mora bit umnozen sa 20.
- Druge vrednsoti moraju biti korigovane sa odredjenim dilucionim faktorom.

## OČEKIVANE VREDNOSTI

Mi preporučujemo je da svaka laboratorija uspostavi svoje vlastite referentne vrednosti. Sledeće vrednosti, dobijene od zdravih lica, su samo indikativne.

- Plazma: <10 nM (1 ng/ml)
- Puna krv: 200-2.000 nM (20-200 ng/ml)
- Pozitivno izazivanje ćelija: >10% ukupnog histamina
- Spontano oslobadjanje histamina: <5% totalnog histamina
- Urin: 10–35 µg/g kreatinina

## KONTROLA KVALITETA

Dobra laboratorijska praksa nalaže da se kontrolni uzorci moraju redovno koristiti da bi se osigurao kvalitet dobijenih rezultata. Ti uzorci se moraju obraditi na potpuno isti način kao i testirani uzorci, i preporučeno je da se njihovi rezultati analiziraju upotrebom odgovarajućih statističkih metoda.

U slučaju oštećenja pakovanja ili ako dobijeni podaci pokazuju neku promenu performansi, molimo da kontaktirate vašeg lokalnog distributera ili upotrebite sledeću e-mail adresu: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

(za više detalja, videti "DODATAK")

Reprezentativni podaci su obezbeđeni u svrhu ilustracije. Performanse dobijene u pojedinačnim laboratorijama mogu da variraju.

#### Osetljivost

**Analitička osetljivost:** 0,52 nM

#### Specifičnost

Imunoanaliza je specifična za histamin.

#### Preciznost

##### Unutar serije

Uzorci plazme sa EDTA su analizirani 25 puta u istoj seriji. Utvrđene vrednosti koeficijenata varijacije bile su ispod 11,0% ili jednake toj vrednosti.

##### Između serija

Uzorci plazme sa EDTA analizirani su u duplikatu, u 10 različitih serija. Otkriveno je da su koeficijenti varijacije 13,6% ili niži od toga.

#### Tačnost

##### Test razblaživanja

Uzorci plazme sa visokom koncentracijom EDTA su serijski razblaženi nultim kalibratorom. Dobijene procentualne vrednosti za prinos kretale su se između 95,1% i 119%.

##### Recovery test

Uzorci plazme sa niskom koncentracijom EDTA su spajkovani poznatim količinama histamina. Dobijene procentualne vrednosti za prinos kretale su se između 92,2% i 119%.

##### Opseg merenja (od analitičke osetljivosti do najvišeg kalibratora):

Od 0,52 do približno 100 nM.

## OGRANIČENJA

Ne pridržavanje instrukcija u ovom uputstvu pakovanja može značajno da utiče na rezultate. Rezultate treba interpretirati u skladu sa celokupnom kliničkom slikom pacijenta, uključujući kliničku istoriju, podatke iz dodatnih testova i drugim odgovarajućim informacijama.

#### Interferencije

Ne koriste se hemolizovani, ikterični ili lipemični uzorci.

Krv trudnica sadrži visoke nivoe diamin oksidaze I ne može da se koristi.

Materijal koji sadrži amin u koncentraciji većoj od 10 mM interferira sa acilovanjem histamina.

Fenol inhibira oslobađanje histamina.

Histamin može biti komponenta alergena kao što je himenopteran.

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Specificity

Data on cross-reactivity with several related molecules are presented in the following table.

Cross-reactivity (%) = related molecule / acylated histamine at 50% of the binding of the zero calibrator.

Related molecule	Cross-reactivities (%)
acylated histamine	100
acylated 3 methylhistamine	0.027
acylated 1 methylhistamine	$2 \times 10^{-3}$
N-acetylimidazole	$<4 \times 10^{-5}$
acylated serotonin	$<4 \times 10^{-5}$
acylated histidine	$<4 \times 10^{-5}$

#### Accuracy

##### Dilution test

5 EDTA plasma samples were after acylation serially diluted by zero calibrator and assayed according to kit procedure.

EDTA plasma	Dilution factor	Expected conc. (nM)	Measured conc. (nM)	Ratio (%) Measured/Expected
1	-	33.89	-	-
	1:2	16.91	16.95	99.79
	1:4	8.48	8.47	100.1
	1:8	4.18	4.24	98.67
	1:16	2.35	2.12	110.9
2	-	55.57	-	-
	1:2	29.53	27.79	106.3
	1:4	15.55	13.89	111.9
	1:8	7.30	6.95	105.1
	1:16	3.85	3.47	110.9
3	-	16.82	-	-
	1:2	8.74	8.41	103.9
	1:4	4.21	4.21	100.1
	1:8	2.35	2.10	111.8
	1:16	1.00	1.05	95.12
4	-	42.06	-	-
	1:2	20.42	21.03	97.10
	1:4	11.00	10.52	104.6
	1:8	6.24	5.26	118.7
	1:16	2.79	2.63	106.1
5	-	26.54	-	-
	1:2	13.37	13.27	100.8
	1:4	7.06	6.64	106.4
	1:8	3.94	3.32	118.8
	1:16	1.90	1.66	114.5

#### Recovery test

5 EDTA plasma samples were spiked by calibrator with higher concentration, acylated and assayed according to kit procedure.

EDTA plasma	Endogen. conc. (nM)	Added conc. (nM)	Measured conc. (nM)	Expected conc. (nM)	Ratio (%) Measured/Expected
P1	4.54	4.20	8.74	9.01	103.1
	4.48	5.19	9.67	9.03	93.39
	4.35	7.55	11.89	12.66	106.5
P2	3.55	1.91	5.47	5.16	94.40
	3.66	4.20	7.87	8.42	107.0
	3.51	7.55	11.05	10.73	97.06
P3	1.81	0.92	2.73	2.79	102.2
	1.75	1.64	3.39	3.21	94.65
	1.78	4.20	5.99	6.29	105.1
P4	2.07	1.22	3.28	3.07	93.46
	2.11	2.68	4.79	5.69	118.9
	2.02	6.15	8.17	7.98	97.71
P5	2.43	1.50	3.93	3.94	100.3
	2.49	3.19	5.68	5.24	92.21
	2.38	6.62	9.00	9.11	101.2

#### Precision

##### Intra-assay

EDTA plasma	P1	P2	P3
Number of determinations	25	25	25
Mean concentration (nM)	1.56	10.51	35.38
C.V., (%)	10.74	11.00	5.28

##### Inter-assay


EDTA plasma	P1	P2	P3
Number of determinations	10	10	10
Mean concentration (nM)	1.81	1.10	17.79
C.V., (%)	12.13	13.62	7.12


## Symbols Key

**REF** Product Reference / Référence du produit / Produktreferenz / Riferimento prodotto / Número de referencia del producto / Referência do produto / Produktreferens / Κωδικός αναφοράς προϊόντος / 产品参考 / Gaminio nuoroda / Termékszám / Dane referencyjne produktu / Reference k produktu / Referenčné označenie výrobku / 제품 참조 자료 / Úrün Referansı / Ссылка на продукт / Референция за продукт / 產品參考

**IVD** In Vitro Diagnostic / Diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostica in vitro / Para diagnóstico in vitro / Diagnóstico in vitro / InVitro-diagnostik / Για διάγνωση in vitro / 体外诊断 / In vitro diagnostika / In vitro diagnosztikai felhasználásra / Diagnostyka in vitro / Diagnostika in vitro / 체외 진단 / In Vitro Diagnostik / Diagnostika in vitro / За ин витро диагностика / 體外診斷


**CONTENTS** Contents / Contenu / Inhalt / Contenuto / Contenido / Conteúdo / Περιεχόμενο / 組成 / Rinkinio sudėtis / Tartalom / Zawartość / Obsah / Obsah / 내용물 / İçindekiler / Содержание / Съдържание / 目錄

 Manufactured by / Fabriqué par / Hergestellt von / Prodotto da / Fabricado por / Tillverkas av / Κατασκευαστής / 制造商 / Gamintojas / Gyártó: / Producent / Výrobce / Výrobca / 제조 / Üretici / Изготовлено / Произведено от / 製造商


 Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para <n> ensayos / Conteúdo suficiente para "n" ensaios / Räckert till "n" antal tester / Περιεχόμενο επαρκές για "n" εξετάσεις / 含量足够 <n> 次测试 / Turinio pakanka <n> tyrim / <n> teszthez elegendő mennyiséget tartalmaz / Zawartość wystarcza na <n> testów / Lze použít pro <n> testů / Obsah vystačí na <n> testov / <n> 테스트에 대해 충분한 양 포함 / <n> sayida test için yeterlidir / Содержит достаточно для количества тестов: <n> / Съдържа достатъчно за <n> теста / 內容物足夠執行 <n> 次測試

**CE** CE Mark / Marquage CE / CE-Kennzeichnung / Marchio CE / Marcado CE / Marcação CE / CE-märkning / Σήμανση CE / CE 标志 / CE ženklas / CE jelzés / Znak CE / Značka CE / Označenie CE / CE 표시 / CE İşareti / Маркировка CE / CE маркировка / CE 標識

**SDS** Safety Data Sheet / Fiche technique santé-sécurité / Sicherheitsdatenblatt / Scheda dati di sicurezza / Hoja de datos de seguridad / Ficha de Dados de Segurança / Säkerhetsdatablad / Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας / 安全数据单 / Saugos duomenų lapas / Biztonsági adatlap / Karta Charakterystyki Bezpieczeństwa / Bezpečnostní list / Bezpečnostný list / 안전보건자료 / Güvenlik Bilgi Formu / Паспорт безопасности / Информационен Лист За Безопасност / 安全性資料表

 Consult Instructions for Use / Consultez le mode d'emploi / Siehe Gebrauchsanweisung / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Konsultera bruksanvisning / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / 请参阅使用说明 / Skaitykite naudojimo instrukciją / Olvassa el a használati utasítást / Zapoznać się z instrukcją użycia / Postupujte podle návodu k použití / Prečítajte si návod na použitie / 사용 안내 문의 / Kullanma Talimatına Başvurun / Обратитесь к инструкциям / Вижте Инструкциите за употреба / 請參閱使用說明

 Temperature range(s) / Plage(s) de température / Temperaturbereich(e) / Intervallo/i di temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Temperaturintervall / Εύρος(-η) θερμοκρασίας / 溫度範圍 / Temperatūros diapazonas (-ai) / Hőmérséklet-tartomány(ok) / Zakres(y) temperatury / Rozsahy teplot / Rozsah(y) teploty / 온도 범위 / Sıcaklık aralıkları / Диапазон(-ы) температуры / Температурен(ни) диапазон(и) / 溫度範圍

 Caution / Précaution / Achtung / Attenzione / Precaución / Atenção / Försiktighet / Προσοχή / 注意事项 / Įspėjimas / Figyelem / Uwaga / Upozornění / Upozornenie / 주의 / Dikkat / Внимание / 注意

 Expiration Date / Date D'expiration / Verfallsdatum, Verw. bis: / Data Di Scadenza / Fecha De Caducidad / Data de validade / Utgångsdatum / Ημερομηνία λήξης / 失效日期 / Galiojimo data / Lejárati idő / Data ważności / Datum expirace / Datum expirácie / 만료 날짜 / Son Kullanma Tarihi / Срок годности / Срок на годност / 到期日

**LOT** Lot Number / Numéro de lot / Chargennummer / Numero di lotto / Lote número / Número de lote / Satsnummer / Αριθ. παρτίδας / 批次号 / partijos numeris / Tételszám / Numer serii / Číslo sarže / 로트 번호 / Lot Numarasi / Номер партии / Номер на партида / 批號

 Date of Manufacture / Date de Fabrication / Herstellungsdatum / Data di Fabbricazione / Fecha de Fabricación / Data de Fabrico / Produktionsdatum / Ημερομηνία Παραγωγής / 生产日期 / Pagaminimo Data / Gyártás Dátuma / Data Produkcji / Datum Výroby / Datum Výroby / 제조 일자 / Üretim Tarihi / Дата Производства / Дата на Производство / 製造日期



Biohazard / Risque biologique / Biogefährdung / Rischio biologico / Riesgo biológico / Risco biológico / Biologisk fara / Βιολογικός κίνδυνος / 生物危害 / Biologisk fara / Veszélyes biológiai anyag / Zagrożenie biologiczne / Biologické riziko / Biologické riziko / 생물학적 위험 / Biyolojik tehlike / Биологическая опасность / Биологична опасност / 生物危害

**DANGER** Danger / Danger / Gefahr / Pericolo / Peligro / Perigo / Fara / Κίνδυνος / 危險 / Pavojus / Veszély! / Niebezpieczeństwo / Nebezpečí / Nebezpečnost / 위험 / Tehlike / Опасно! / Опасност / 危險

**CAL** Calibrator / Calibrateur / Kalibrator / Calibratore / Calibrador / Calibrador / Kalibrator / Βαθμονομητής / 校准品 / Kalibravimo medžiaga / Kalibrátor / Kalibrator / kalibrátor / Kalibrátor / 보정 물질 / Kalibrátor / Калибратор / Калибратор / 校正液

**CTRL** Control / Contrôle / Kontrolle / Controllo / Control / Control / Kontrolle / Μέτρηση / 质控品 / Kontrollinė / Kontroll / Kontroll / Kontrola / Kontrola / 컨트롤 / 质控品 / Kontroll / Контроль / Контролна / 质控品

**PLATE** Plate / Plaque / Platte / Piastra / Placa / Platta / Πλάκα / プレート / Plokselē / Lemez / Płytk / Deska / Doštička / 판 / Plaka / Планшет / Чашка / 滴盤

**IFU** Instruction for Use / Mode d'emploi / Gebrauchsanweisung / Istruzioni per l'uso / Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Bruksanvisning / Οδηγίες χρήσης / 使用说明 / Naudojimo instrukcija / Használati utasítás / Instrukcja użycia / Návod k použití / Návod na použitie / 사용 안내 / Kullanna Talimati / Инструкции / Инструкции за употреба / 使用说明

**REAG ACYL** Acylation Reagent, Réactif Acylation, Acylierungsreagenz, Reattivo di acilazione, Reactivo de acilación, Reagente de Acilação, Acylierungsreagens, Αντιδραστήριο ακυλίωσης, 酰化剂, Acilnimo reagentas, Acilezési reagens, Odczynnik do acylacji, Reagencie na acylaci, Acylačné činidlo, 아실화 시약, Açilleme Reaktifi, Реагент для реакции ацилирования, Реактив за ацилиране, 酰化劑

**BUF ACYL** Acylation Buffer, Tampon Acylation, Acylierungspuffer, Tampone di acilazione, Tampón de acilación, Tampão de Acilação, Acylierungspuffer, Ρυθμιστικό διάλυμα ακυλίωσης, 酰化缓冲液, Acilnimo buferinis tirpalas, Acilezési puffer, Bufor do acylacji, Pufr na acylaci, Acilačný tlmivý roztok, 아실화 완충액, Açilleme Tamponu, Буфер для реакции ацилирования, Буфер за ацилиране, 酰化緩衝劑

**RELEASE BUFFER** Release Buffer / Tampon de libération / Freisetzungspuffer / Tampone di rilascio / Tampón de liberación / Tampão de libertação / Frigöringsbuffert / Ρυθμιστικό διάλυμα αποδέσμευσης / 解除緩衝劑 / Buferinio tirpalo išleidimas / Felszabadítási puffer / Bufor uwalniania / Uvoľňovací pufr / Uvoľňovací tlmivý roztok / 해제 버퍼 / Salim Tamponu / Буфер высвобождения / Пуснат на пазара буфер / 釋放緩衝劑

**BUF SUBS** Substrate Buffer / Tampon substrat / Substrat / Tampone per substrato / Tampón Sustrato / Tampão de Substrato / Substrate Buffer / Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος / 基質/ツッファー / Substrato buferinis tirpalas / Szubsztrátpuffer / Bufor substratu / Substrátový pufr / Substrátový tlmivý roztok / 기질 완충액 / Substrat Tamponu / Буфер для субстрата / Субстратен буфер / 基質緩衝劑

**DMSO** Dimethyl Sulfoxide, Diméthyle sulfoxyde, Dimethylsulfoxid, Dimetilsolfossido, Dimetilsulfóxido, Dimetilsulfóxido, Dimetilsulfoxid, Διμεθυλοσουλφοξείδιο, 二甲亚砜, Dimetilsulfoksid, Dimetil-sulfoxid, Dimetylosulfoltenek, Dimethylsulfoxid, Dimetyl sulfoxid, 디메틸 술폭사이드, Dimetil Sulfoksit, Диметил сульфоксид, Диметилсулфоксид, 二甲基亞砜

**Diluent** Diluent / Diluant / Diluent / Diluente / Diluyente / Diluente / Späddemedel / Αραιωτικό / 希釈液 / Skiediklis / Diluens / Rozcieńczalnik / Redidlo / Riediaci roztok / 희석액 / Dilüent / Дилуент / Дилуент / 稀釋劑

**CONJ** Conjugate / Conjugué / Konjugat / Coniugato / Conjugado / Konjugat / Συζευγμα / コンジュゲート / konjugatas / Konjugátum / Koniugat / Konjugát / 포합체 / Konjugat / Конъюгат / Конюгат / 結合物

**SOLN WASH 20x** Wash Solution (20x) / Solution de lavage (20x) / Waschlösung (20x) / Soluzione di lavaggio (20x) / Solución de lavado (20 unidades) / Solução de lavagem (20x) / Tvättlösning (20x) / Διάλυμα πλύσης (20x) / 洗浄液 (20x) / Ploviklis (20x) / 20-szoros töménységű mosóoldat / Roztwór płuczący (20x) / Promyvací roztok (20x) / 세척액(20x 농도) / Yıkama Çözeltisi (20x) / Промывочный раствор (концентрированный в 20 раз) / Разтвор за промиване (20x) / 清洗溶液 (20x)

**SOLN STOP** Stopping Solution / Solution d'arrêt / Stopperlösung / Soluzione di arresto / Solución de Detención / Solução de paragem / Διάλυμα αναστολής / 终止液 / Stabdymo tirpalas / Leállító oldat / Roztwór zatrzymujący / Roztok pro zastavení / Zastavovací roztok / 정지 용액 / Durdurma Çözeltisi / Завершающий раствор / Разтвор за спиране / 终止溶液

**SUBS pNPP** Substrate / Substrat / Substrat / Substrato / Sustrato / Substrato / Substrate / Υπόστρωμα / 基質 / 基質 / Substratas / Szubsztrát / substrat / Substrát / 기질 / Substrat / Субстрат / 基材

**VIAL CONJ** Vial for conjugates / Flacon pour les conjugués / Fläschchen für Konjugate / Fiala per coniugati / Vial para conjugados / Frasco para conjugados / Flaska för konjugat / Φιαλίδιο για συζεύγματα / 複合体用バイアル / Buteliukas konjugatams / Konjugátumnak való üveg / Fiolka na koniugaty / Lahvička na konjugát / Flaštička na konjugáty / 집합체용 바이알 / Konjugat flakonu / Флакон для конъюгатов / Флакон за конюгати / 結合物小瓶