

**НАБОР  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТАМИНА  
МЕТОДОМ ИФА**

**RE59221, Histamine ELISA**

Каталог. № : **RE59221**  
Количество : **96**  
Производитель: **IBL (Германия)**

Методика от **04-2014**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

#### 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный набор для диагностического *in vitro* количественного определения гистамина в человеческой плазме, моче и ЭДТК цельной крови. Также тест может использоваться для исследований в супернатанте культуры клеток.

#### 2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ (См. в оригинале инструкции).

#### 3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Процедура анализа основана на принципах конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (конкурентной ELISA). Неизвестное количество присутствующего в образце антигена и фиксированное количество энзимомеченного антигена конкурирует за антителосвязанные стороны. Несвязанный антиген удаляется промыванием. Интенсивность развитого окраса после инкубации субстрата обратно пропорционально количеству антигена в образце. Результаты образцов могут быть определены прямо при использовании стандартной кривой.

#### 4. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Только для *диагностики in-vitro*. Только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа, прочитайте внимательно инструкцию. Используйте актуальную версию инструкции, что поставляется. Убедитесь, что все понятно.
3. При повреждении набора или его компонентов, сообщите IBL не позже, чем через неделю после получения набора. Не используйте поврежденные компоненты.
4. Следуйте серии и дате пригодности. Не смешивайте реагенты разных лотов. Не используйте просроченные наборы.
5. Следуйте опыту работы лаборатории и указаниям по безопасности. Используйте лабораторную одежду, одноразовые перчатки и защитные очки.
6. Реагенты этого набора содержат материалы, опасные для глаз и кожи.
7. Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо уничтожить как опасные отходы согласно правилам безопасности.
8. Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать ожог кожи.
9. Некоторые реагенты могут содержать азид натрия в качестве консервантов. При контакте с кожей или глазами, промойте водой. При выливании реагентов в раковину смойте большим количеством воды.
10. Работайте с реагентами как с потенциально инфицированными.
11. Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были протестированы и были признаны отрицательными на анти-ВИЧ-I/II, HBsAg и анти-HCV. Тем не менее, присутствие этих или других инфекционных агентов не может быть исключено абсолютно. По этой причине реагенты следует рассматривать как потенциально инфицированные в использовании и при утилизации.

#### 5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Этот набор поставляется при окружающей температуре и должен храниться при 2-8 °С. Храните вдали от источников тепла и солнечных лучей. Хранение и стабильность реагентов указан в соответствующем пункте инструкции. Микропланшет стабилен до окончания срока годности набора в тщательно закрытой упаковке, при хранении при 2-8 °С.

#### 6. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

##### Плазма (EDTA, гепарин)

Необходимо соблюдать обычные меры предосторожности. Очень важно сохранить химическую целостность образцов крови от момента забора до момента тестирования. Не используйте сильно гемолизированные, иктерические или липемические образцы. Образцы, где проявляется мутность, необходимо центрифугировать перед тестированием для удаления осадка.

Хранение:	2-8 °С	≤ -20 °С аликвоты	≤ -70 °С аликвоты	Держите вдали от света и от жары. Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания
Стабильность:	5 часов	3 месяца	2 года	

##### Моча

Возможно использование как спонтанной так и 24 часовой мочи. Суточную мочу собирают и смешивают в одной бутылке, содержащей 10-15 мл 6N HCl в качестве консерванта. Определите общий объем для вычисления результатов. **Смешайте и центрифугируйте образцы перед использованием.**

Хранение:	Спонтанная 2-8 °С	Окисленная 2-8 °С	≤ -20 °С аликвоты	Держите вдали от света и от жары. Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания
Стабильность:	8 часов	3 дня	6 месяцев	

##### Супернатант культуры клеток

Супернатант культуры клеток может использоваться без специальных предосторожностей.  
Среда культуры клеток может содержать гистамин в больших количествах.

## Цельная кровь

Выделение гистамина проводится с использованием гепаринизированной цельной крови. Для дальнейшей информации смотрите инструкцию Выделение Гистамина (RE95000).

## 7. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ НАБОРЫ

Количество	Компонент
1 x 12 x 8	<b>Микропланшет</b> Разделяемые стрипы. Покрытые анти-кроличьим IgG (козлийный, поликлональный)
1 x 7 мл	<b>Гистамин антисыворотка</b> Готова к использованию, голубой окрас Антисыворотка (кроличья), трис буфер 0,01%, тимерозал
1 x 100 мкл	<b>Энзимный конъюгат</b> Концентрат (200x) Содержит гистамин, конъюгированный с пероксидазой
7 x 1.0 мл	<b>Стандарты плазмы А-Г</b> 0,0; 0,35; 1,1; 4,0; 14; 50; 150 нг/мл Готовы к использованию. Для калибровки образцов плазмы. Стандарт А = Разбавитель для образцов плазмы. Содержит: гистамин, плазму крови человека.
2 x 1.0 мл	<b>Контроли плазмы 1+2</b> Готовы к использованию. Содержит: гистамин, плазму крови человека. Концентрации/приемлемые диапазоны см. сертификат QC.
1 x 2.0 мл	<b>Стандарт А Моча/Культуры клеток</b> 0 нг/мл Готов к использованию. Для калибровки мочи и образцов культуры клеток. Стандарт содержит 0.1 M HCl
5 x 0.25 мл	<b>Стандарт В-Г Моча/Культуры клеток</b> 2,7; 8,1; 24,3; 73; 219 нг/мл Готовы к использованию. Для калибровки мочи и образцов культуры клеток. Стандарт содержит 0.1 M HCl
2 x 0.25 мл	<b>Контроли 1+2 Мочи/Культуры клеток</b> Готовы к использованию Содержат гистамин, человеческую мочу (окисленную). Концентрация/приемлемые границы см. В QC сертификате
1 x 2.25 мл	<b>Ацилирующий реагент</b> Готов к использованию. Содержит DMF.
1 x 60 мл	<b>Рабочий буфер</b> Концентрат (5x) Содержит Трис-буфер, Твин, BSA, 0,05% тимеросал
1 x 50 мл	<b>Моющий буфер</b> Концентрат (20x) Фосфатный буфер, твин, 0,1% тимеросал
1 x 11 мл	<b>Индикаторный буфер</b> Фиолетовый окрас. Готов к использованию. Содержит Трис-буфер, красный фенол (изменяет цвет при pH <7,5), 0,01% тимеросал
1 x 15 мл	<b>Раствор субстрата ТМВ</b> Готов к использованию. Содержит ТМВ, буфер, стабилизаторы
1 x 15 мл	<b>ТМВ стоп раствор</b> Готов к использованию. 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
3 x	<b>Адгезивная фольга</b>

## 8. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропипетки (многоканальные пипетки Эппендорф или подобные устройства, KV <3%). Объем: 10, 20, 50, 100, 1000 мкл
2. Тестовые пробирки стеклянные (12 x 75 мм)
3. Подставка для тестовых пробирок
4. Миксер типа вортекс.
5. Орбитальный шейкер (500 rpm)
6. 8-канальный микропипетор с резервуарами для реагентов
7. Бутылка для промывания, автоматическая или полуавтоматическая система для промывания планшета.
8. Микропланшетный ридер, способностью считывания абсорбции при 450 нм (установленная длина волны 600-650 нм)
9. Бидистиллированная или деионизированная вода
10. Бумажное полотенце, наконечники для пипеток и таймер.

## 9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. При несоответствии тестовой процедуры или обработки образцов инструкции, это может влиять на результаты. Строго соблюдайте объем пипетирования, время инкубации, температуру и все шаги предварительной обработки. Используйте только калиброванные пипетки и устройство.
2. После начала теста, все шаги необходимо провести без перерывов. Следите, что б необходимые реагенты, материалы и устройство были готовы в нужное время. Приведите все реагенты к комнатной температуре (18-24°C) и легко вращайте жидкие реагенты и образцы перед использованием. Смешайте реагенты без пенообразования.
3. Избегайте загрязнения реагентов, пипеток и пробирок. Используйте новые сменные пластиковые наконечники для каждого реагента, стандарта или образца. Не меняйте крышки. Всегда закрывайте флаконы, что не используются. Не используйте ячейки / пробирки или реагенты повторно.
4. Некоторые компоненты могут содержать ≤ 250 мкл раствора. Убедитесь перед вскрытием, что весь раствор находится на дне флакона.
5. Рекомендуется определять образцы в дубликате для идентификации потенциальных ошибок пипетирования.
6. Используйте схему пипетирования для оценки расположения планшета.
7. Время инкубации влияет на результаты. Все ячейки должны использоваться в одинаковом порядке и последовательности. Рекомендуется использовать 8-канальную микропипетку для пипетирования во все ячейки.
8. Промывание микропланшета очень важно. При неправильном промывании ячеек результаты будут недостоверные. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки или автоматическую систему для промывания. Не давайте возможности ячейкам высохнуть между шагами инкубации. Не царапайте ячейки промывания или аспирации. Наполняйте реагенты с осторожностью. При наполнении, проверьте, что б все ячейки были равномерно наполнены моющим буфером и что нет остатков жидкости.
9. Влажность влияет на покрытые ячейки/пробирки. Не вскрывайте пакет, пока он не достигнет комнатной температуры. Неиспользованные ячейки/пробирки необходимо вернуть в пакет с осушителем.

## 10. ИНСТРУКЦИЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ

Содержимое набора для 96 определений может быть разделено на три отдельных анализа.

**Объем указан внизу для одного анализа для 4 стрипов (32 определения).**

### 10.1 Приготовление лиофилизированных или концентрированных компонентов

Растворение / разбавление	Компонент	С	Разбавитель	Отношение	Пометки	Хранение	Стабильность
20 мл	Рабочий буфер	добавить 100 мл	Бидист. вода	1:5		2-8°C	2 недели
15 мл	Моющий буфер	добавить 300 мл	Бидист. вода	1:20	Растворите кристаллы при 18-25°C	2-8°C	4 недели
10 мкл*	Ферментный конъюгат	2.0 мл	Разбавленный рабочий буфер	1:200	Приготовьте свежий и используйте только раз	18-25°C	30 мин

### 10.2 Разбавление образца

Образцы, предположительно содержащие более высокие концентрации, чем самый высокий стандарт, должны быть разведены перед ацилированием соответствующей средой:

Моча: 0.1 М HCl.

Плазма: разбавитель образца (Кат. № КЕНР771) не предусмотрен в наборе.

### 10.3 Ацилирование Образцов

Невозможно определение ацилированной мочи или образцов культуры клеток при использовании стандартной кривой для плазмы или определения ацилированной плазмы при использовании стандартной кривой для мочи или образцов культуры клеток.

Примечание: ацилированные образцы могут храниться при температуре 2-8 °C в течение ночи или лучше при -20 °C в течение до 2 дней.

**10.3.1. Приготовление образцов должно проводиться в одноразовых пробирках.**

**10.3.2.** Следующая процедура проводится в двух вариантах:


#### Плазма

1	Внесите по <b>100 мкл стандартов плазмы, контроля плазмы и плазмы пациентов</b> в соответствующие стеклянные пробирки.
2	Добавьте во все пробирки по <b>100 мкл Буфера индикатора</b> и хорошо перемешайте на вортексе
3	Добавьте по <b>20 мкл Ацилирующего Реагента</b> в каждую пробирку <u>Быстро перемешайте на вортексе.</u>
4	Закройте пробирки и инкубируйте <b>30 мин при КТ (18-25°C).</b>
5	Добавьте <b>750 мкл разбавленного рабочего Буфера</b> , перемешайте на вортексе.


#### Моча, супернатант культуры клеток

1	Внесите по <b>50 мкл каждого стандарта мочи, супернатанта культуры клеток, контроля мочи и мочи / образцов культуры клеток пациента</b> в стеклянные пробирки.
2	Добавьте во все пробирки по <b>50 мкл Буфера индикатора</b> и хорошо перемешайте на вортексе. Если индикатор остается бесцветным, pH раствора слишком низкий и образец содержит слишком много кислоты. В этом случае добавьте еще 50 мкл буфера индикатора пока раствор не будет я красноватым
3	Добавьте по <b>10 мкл Ацилирующего Реагента</b> в каждую пробирку <u>Быстро перемешайте на вортексе.</u>
4	Закройте пробирки и инкубируйте <b>30 мин при КТ (18-25°C).</b>
5	Добавьте <b>2000 мкл разбавленного рабочего Буфера</b> , перемешайте на вортексе.

#### Цельная кровь (Общий Гистамин)

1	Внесите по <b>50 мкл каждого образца ЭДТК цельной крови</b> в соответствующие в стеклянные пробирки.
2	Пипетировать <b>950 мкл Гипотонической Среды</b> в каждую пробирку.
3	<b>Инкубировать 60 минут</b> при <b>37 °C</b> на водной бане.
	Супернатанты соответствующих образцов можно хранить при температуре 2-8 °C в течение одного дня. Для более длительного хранения до одной недели заморозить при температуре -20 °C. Избегайте повторного оттаивания и замораживания.
4	Перемешать. Взять <b>100 мкл</b> для шага ацилирования и пипетировать в соответствующие <b>стеклянные пробирки</b> .
5	Пипетировать <b>50 мкл</b> каждого <b>Стандарта плазмы с 50 мкл Высвобождающего буфера</b> в соответствующие стеклянные пробирки.
6	Пипетировать <b>50 мкл</b> каждого <b>Контроля плазмы с 50 мкл Высвобождающего буфера</b> в соответствующие стеклянные пробирки.
7	Пипетировать <b>100 мкл Индикаторного Буфера</b> в каждую пробирку. Перемешать.
8	Добавьте по <b>20 мкл Ацилирующего Реагента</b> в каждую пробирку <u>Быстро перемешайте на вортексе.</u>
9	Закройте пробирки и инкубируйте <b>30 мин при КТ (18-25°C).</b>
10	Добавьте <b>750 мкл разбавленного рабочего Буфера</b> , перемешайте на вортексе.

#### 10.3.2. Альтернативная версия Ацилирования в 96-луночном Планшете с глубокими ячейками ацилирования.

	96-луночный Планшет с глубокими ячейками ацилирования не может быть использован повторно. Использовать только 1 раз!
--	--

Следующая процедура проводится в двух вариантах:

#### Плазма

1	Внесите по <b>100 мкл стандартов плазмы, контроля плазмы и плазмы пациентов</b> в соответствующие лунки.
2	Добавьте во все лунки по <b>100 мкл Буфера индикатора</b> и осторожно перемешайте.
3	Добавьте по <b>20 мкл Ацилирующего Реагента</b> в каждую лунку. Осторожно перемешать.
4	Закройте планшет и инкубируйте <b>30 мин при КТ (18-25°C).</b>
5	Добавьте <b>750 мкл разбавленного рабочего Буфера</b> в каждую лунку.
6	<b>Смешать ацилированные стандарты, контроли и образцы при помощи 8-канальный микропипетки</b> и переместить эту смесь на планшет (см. Процедуру теста).

#### Моча, супернатант культуры клеток

1	Внесите по <b>50 мкл каждого стандарта мочи, супернатанта культуры клеток, контроля мочи и мочи/образцов культуры клеток пациента</b> в лунки.
2	Добавьте во все лунки по <b>50 мкл Буфера индикатора</b> и осторожно перемешайте. Если индикатор остается бесцветным, pH раствора слишком низкий и образец содержит слишком много кислоты. В этом случае добавьте еще 50 мкл буфера индикатора, пока раствор не будет красноватым.
3	Добавьте по <b>10 мкл Ацилирующего Реагента</b> в каждую лунку. Осторожно перемешать.
4	Закройте планшет и инкубируйте <b>30 минут при КТ (18-25°C).</b>
5	Добавьте <b>2000 мкл разбавленного рабочего Буфера</b> в каждую лунку.

6	Смешать ацилированные стандарты, контроли и образцы при помощи 8-канальный микропипетки и переместить эту смесь на планшет (см. Процедуру теста).
---	---

### 11. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

1	Внесите по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, ацилированных Контролей и ацилированных Образцов в соответствующие ячейки.
2	Пипетируйте 50 мкл свежее приготовленного энзимного конъюгата в каждую ячейку.
3	Пипетируйте 50 мкл антисыворотки гистамина в каждую ячейку.
4	Накройте планшет адгезивной фольгой. Инкубируйте 3 часа при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm в темноте).
5	Удалите адгезивную фольгу. Уничтожьте инкубационный раствор. Промойте планшет четыре раза 250 мкл разбавленным моющим буфером. Удалите остаток раствора постукиванием перевернутого планшета на бумажное полотенце.
6	Для добавления субстрат и стоп раствора используйте, по возможности, 8-канальный микропипетор. Пипетирование должно проводиться в те самые часовые интервалы и для субстрата и для стоп раствора. Избегайте формирования пузырей.
7	Пипетируйте 100 мкл ТМВ субстрат раствора в каждую ячейку.
8	<b>Плазма:</b> Инкубируйте 40 мин. при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm) <b>Моча/супернатант культуры клеток:</b> инкубируйте 20 мин. при КТ (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm)
9	Остановите субстратную реакцию добавлением 100 мкл ТМВ стоп раствора в каждую ячейку. Кратко смешайте содержимое легким вращением планшета.
10	Измерьте оптическую плотность фотометром при 450 нм (Установленная длина волны 600-650 нм) в течении 15 минут.

### 12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Тестовые результаты достоверны только при полном следовании инструкции. Также пользователь должен следовать требованиям по безопасности. Все стандарты и контроли должны быть в диапазоне, указанном в сертификате качества. Если критерии не выполняются, анализ не достоверен и его следует повторить. Каждая лаборатория должна использовать известные образцы как контроли. Необходимо внимательно следить за следующими показателями: дата пригодности (приготовленных реагентов), условия хранения, пипетки, устройство, условия инкубации и методы промывания.

### 13. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученная ОП стандартов (ось y) откладываются против их концентрации (ось x) или на полулогарифмической бумаге или используя автоматический метод. Наиболее оптимальными являются кубический spline, 4-параметровая логистика или Logit-Log.

Для вычисления стандартной кривой отложите каждый сигнал стандартов (один сигнал из дубликатов, что является очевидно не сторонним можно откинуть и использовать наиболее подходящий второй).

Концентрация образцов считывается прямо из стандартной кривой.

При разбавлении образцов, значения должны быть умножены на соответствующий фактор разбавления

Преобразование:

Гистамин (нг/мл) x 8,997 = нмоль/л

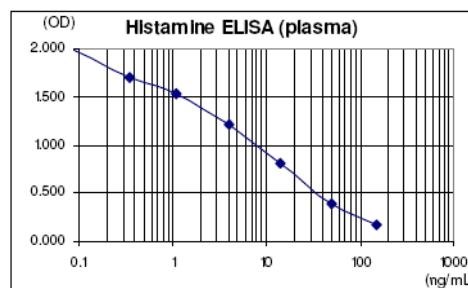
Образцы, что показали сигнал выше наивысшего стандарта необходимо разбавить и анализировать повторно.

Вычислите 24 ч экскрецию для каждого образца мочи: мкг/24 ч = мкг/л x л/24 ч

#### Типичная калибровочная кривая для Плазмы

(Не для вычисления)

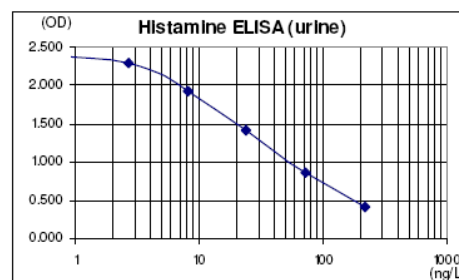
Стандарт	Гистамин (нг/мл)	Среднее ОП	ОП/ОП <sub>max</sub> (%)
A	0.0	2.122	100
B	0.35	1.705	80.3
C	1.1	1.534	72.3
D	4.0	1.209	57.0
E	14	0.802	37.8
F	50	0.390	18.4
G	150	0.162	7.6



#### Типичная калибровочная кривая для Мочи

(Не для вычисления)

Стандарт	Гистамин (нг/мл)	Среднее ОП	ОП/ОП <sub>max</sub> (%)
A	0.0	2.476	100
B	2.7	2.298	92.8
C	8.1	1.931	78.0
D	24.3	1.413	57.0
E	73.0	0.851	34.3
F	219	0.402	16.2



### 14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результаты сами по себе не должны быть причиной для терапевтического заключения. Они должны совпадать с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами. Очевидно здоровые субъекты показали следующие результаты (5-95% процент достоверности):

Plasma	0.2 - 1.0 ng/mL
Urine	5 - 56 µg/d (24 h) 8 - 53 µg/g Creatinine (spontaneous)
Whole Blood	< 60 ng/mL

Рекомендуется, чтоб каждая лаборатория устанавливала собственный нормальный диапазон.

## 15. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Сбор образца имеет значительное влияние на результаты теста. Внимательно следуйте инструкции.

Относительно перекрестной реактивности смотрите ХАРАКТЕРИСТИКИ.

Следующие компоненты крови не показывают значительного влияния на тестовые результаты до указанной концентрации:

Гемоглобин	5 мг/мл
Билирубин	1 мг/мл
Триглицериды	30 мг/мл

## 16. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 2

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)	Вещество	Перекрестная реактивность (%)		Перекрестная реактивность других тестируемых веществ <0,005%
	N-ацетил-гистамин	0.34		
	3-метил-гистамин	0.09		
Аналитическая чувствительность (лимит определения)	Плазма	0.02 нг/мл		Средний сигнал (Нулевой стандарт) – 2СО
	Моча	1.3 нг/мл		
Точность		Диапазон (нг/мл)	КВ (%)	
	Внутри тестовая	Плазма Моча	0.5 - 85 6.2 - 178	2.2 – 13.8 3.7 – 6.6
Между тестовая	Плазма Моча	7.6 – 86 5.2 - 155	6.0 – 9.2 7.1 -12.8	
Линейность		Диапазон (нг/мл)	Серийное разбавление до	Границы (%)
	Плазма Моча	16.5 – 129 2.0 - 135	1:8 1:64	100 - 112 83 - 117
Восстановление		Среднее (%)	Диапазон (%)	% восстановления после укрепления
	Плазма Моча	105 99	90 – 116 83 - 117	

<b>Method Comparison Competitor Assay A</b>	Plasma	$IBL-Assay = 0.95 \times A - 0.04$	$r = 0.99; n = 24$
<b>Method Comparison Competitor Assay A</b>	Urine	$IBL-Assay = 0.77 \times A + 2.86$	$r = 0.88; n = 26$
<b>Method Comparison Competitor Assay B</b>	Plasma	$IBL-Assay = 0.56 \times B + 0.01$	$r = 0.99; n = 20$
<b>Method Comparison Competitor Assay B</b>	Urine	$IBL-Assay = 0.68 \times B + 11.3$	$r = 0.99; n = 24$



### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)