

RIDASCREEN[®] Histamin

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Histamin

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
histamine

Art. No.: R1601 (96 wells)

Art. No.: R1604 (48 wells)

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Histamin (Art. Nr.: R1601, 96 Kavitäten / R1604, 48 Kavitäten) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Lebensmitteln.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 96 bzw. 48 Bestimmungen (einschl. Standardbest.). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: unterschiedlich je nach Probe (siehe 8.)






Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)..... ca. 15 min
Testdurchführung (Inkubationszeit) 90 min
Testdurchführung (Inkubationszeit mit Schüttler) 70 min

Nachweisgrenze: Sekt, Weißwein, Rotwein.....250 ppb
Milch 100 ppb
Käse, frischer Fisch, Dosenfisch2,5 ppm
Fischmehl 100 ppm

Wiederfindungsrate: Sekt, Weißwein, Rotwein..... 95 %
Milch 109 %
Käse, frischer Fisch, Dosenfisch 100 %
Fischmehl 96 %

Spezifität: Histamin 100 %
3-Methyl-Histamin.....ca. 0,01 %
Tyraminn.n.
L-Phenylalanin.....n.n.
L-Histidinn.n.
L-Tyrosinn.n.
Tryptaminn.n.
5-Hydroxy-Indol-Essigsäuren.n.
Serotoninn.n.

Verwendete Symbole:

	Kit enthält Material für <n> Bestimmungen		Hersteller
	Lagertemperatur	LOT	Chargennummer
	Haltbar bis	CONT	Inhalt
	Bitte lesen Sie die Packungsbeilage vor Gebrauch des Kits	REF	Art. Nr.
IVU	Nur zum in-vitro Gebrauch	REC	Rekonstitution mit
LYO	Lyophilisat		

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Histamin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Weißwein, Rotwein, Sekt, Milch, Käse, frischem Fisch, Dosenfisch und Fischmehl.

2. Allgemeines

Histamin ist ein Produkt der Zersetzung von Histidin, verursacht durch das Wachstum bestimmter Bakterien in proteinreichen Nahrungsmitteln wie Fisch, Käse, Fleisch, Sekt, Wein und Bier. Die Menge an gebildetem Histamin hängt von der Bakterienart, der Temperatur und Expositionszeit ab und kann 1000 ppm (mg/kg) überschreiten. Fisch mit hohen Konzentrationen an Histamin wird oft in Verbindung gebracht mit „Scombroid-Fischvergiftung“. Qualitätskontrollen müssen das Auftreten von Histamin kontaminiertem Fisch minimieren. Fisch guter Qualität enthält weniger als 10 ppm. Der Grenzwert für Histamin in Fisch- und Fischereierzeugnissen ist 100 mg/kg, in einigen Ländern sogar 50 mg/kg. Der Schweizer Grenzwert für Histamin in Wein beträgt 10 mg/l.

3. Testprinzip

Nach der Probenaufarbeitung wird Histamin durch ein Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylhistamin derivatisiert. In einem kompetitiven ELISA konkurrieren freies acyliertes Histamin und gebundenes Histamin um die Antikörper-Bindungsstellen.

Nach einem Waschschrift werden Peroxidase-markierte Sekundär-Antikörper (Enzymkonjugat) zugegeben. Diese Antikörper binden an die Antikörper-Histamin-Komplexe. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt.

Enzymsubstrat und Chromogen werden in die Kavitäten pipettiert und inkubiert. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Histaminkonzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 (R1601) bzw. 48 (R1604) Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Reagenzien für Probenacylierung:

Acylation plate	Acylierungsplatte (unbeschichtet) mit 96 Kavitäten für Acylierung
Acylation tubes	96 x (R1601) bzw. 48 x (R1604) Reagenzröhrchen (Plastik) für Acylierung
Standard 1-6	6 x Histamin Standards , (je 4 ml) 0 ppb, 0,5 ppb, 1,5 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 50 ppb
Control 1	Kontrolle 1 (4 ml), Konzentration siehe Flaschenetikett
Control 2	Kontrolle 2 (4 ml), Konzentration siehe Flaschenetikett
Acylation reagent	2 x (R1601) bzw. 1 x (R1604) Acylierungsreagenz (1,5 ml), gebrauchsfertig
Acylation buffer	Acylierungspuffer (22 ml), gebrauchsfertig

Reagenzien für den Enzymimmunoassay:

Microtiter plate	Mikrotiterplatte mit 96 bzw. 48 Kavitäten, (12 Streifen, R1601 bzw. 6, R1604 à 8 Einzelkavitäten) beschichtet mit Histamin
Conjugate	Konjugat (12 ml, R1601 bzw. 6 ml, R1604) Peroxidase-konjugierter Antikörper, gebrauchsfertig
Anti-histamine antibody	Anti-Histamin Antikörper (12 ml, R1601 bzw. 6 ml, R1604), gebrauchsfertig
Substrate-/Chromogen	Substrat/Chromogen (12 ml, R1601 bzw. 6 ml, R1604) enthält Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
Stop solution	Stopp Reagenz (12 ml) enthält 0,5 N Schwefelsäure, gebrauchsfertig
Washing buffer	Waschpuffer (20 ml), als 50fach Konzentrat

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Schlagmühle, Mörser oder Homogenisator
- Zentrifuge und zentrifugierbare Reagenzgläser aus Plastik
- Schüttler, e.g. Vortex Mixer
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- zum Verkürzen der Inkubationszeit: Mikrotiterplatten (MTP)-Schüttler (Schüttelamplitude 3 mm, ca. 600 rpm)

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- für Milchproben: 10 mM PBS, 0,05 % Tween 20 (z.B. Sigma P3563)

6. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Die Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter ) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

7. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,9 ($E_{450\text{ nm}} < 0,9$) für Standard 1

8. Probenvorbereitung

Reagenzröhrchen oder Kavitäten der Acylierungsplatte nur einmal verwenden, um Kontaminationen zu vermeiden.

Für die Probenvorbereitung nur Plastik-Röhrchen verwenden !!!

8.1. Sekt, Weißwein, Rotwein

- 20 µl Wein mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnen
- 100 µl pro Reagenzröhrchen oder pro Kavität der Acylierungsplatte einsetzen

8.2. Milch

- 4 ml Milch zentrifugieren 10 min / 3000 g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) und Fettschicht entfernen
- 20 µl entfettete Milch und 4 ml PBS Puffer (siehe. 5.2.) mischen
- 100 µl pro Reagenzröhrchen oder pro Kavität der Acylierungsplatte einsetzen

8.3. Käse, Fisch (frischer Fisch und Dosenfisch)

- 10 g Probe homogenisieren
- 1 g Homogenisat mit 9 ml dest. Wasser versetzen und gut durchmischen
- zentrifugieren 5 min / 2500 g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Fettschicht entfernen oder durchstoßen
- 1 ml Überstand mit 9 ml Wasser versetzen und durchmischen
- 200 µl dieser Lösung mit 9,8 ml dest. Wasser verdünnen
- 100 µl pro Reagenzröhrchen oder pro Kavität der Acylierungsplatte einsetzen

8.4. Fischmehl

- 1 g Fischmehl mit 200 ml destilliertem Wasser versetzen und 15 min mischen
- Aliquot zentrifugieren: 5 min / 2500 g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 200 µl des Überstandes mit 200 ml dest. Wasser verdünnen
- 100 µl pro Reagenzröhrchen oder pro Kavität der Acylierungsplatte einsetzen

9. Testdurchführung

9.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Der **Waschpuffer** liegt als 50fach Konzentrat vor. Das Waschpufferkonzentrat (20 - 25 °C) mit destilliertem Wasser 1:50 (1+49) vor Gebrauch verdünnen (z. B. 10 ml Pufferkonzentrat + 490 ml dest. Wasser). Der verdünnte Waschpuffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 2 - 8 °C.

Das **Acylierungsreagenz** liegt gebrauchsfertig vor, es hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Bei Gebrauch muss das Acylierungsreagenz als flüssige, homogene und kristallfreie Lösung vorliegen. Es kann bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) gelagert werden oder vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht werden.

9.2. Testdurchführung der Acylierung

Vorsichtig pipettieren und Spritzer vermeiden.

1. Alle Standards, Kontrollen und Proben sollten in Doppelbestimmung durchgeführt werden. (**Art. Nr.: R1604, 48 Kavitäten:** Bei der Acylierungsplatte nur 48 - nicht alle 96 - Kavitäten verwenden, da die ELISA-Platte nur 48 Kavitäten enthält). Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
Alternativ: benötigte Anzahl Reagenzröhrchen in die Acylierungsplatte stecken und als Reaktionsgefäße benutzen.
2. Je 100 µl der Standardlösung, der Kontrollen bzw. der vorbereiteten Proben in Reagenzröhrchen, bzw. die entsprechenden Kavitäten der Acylierungsplatte pipettieren.
3. 25 µl des Acylierungsreagenz in jedes Reagenzröhrchen/Kavität pipettieren.
4. 200 µl des Acylierungspuffer in jedes Reagenzröhrchen/Kavität pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Je 25 µl für den ELISA verwenden.

9.3. Testdurchführung des ELISA

Vorsichtig pipettieren und Spritzer vermeiden. Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 25 µl der acylierten Standardlösungen bzw. der Kontrollen und vorbereiteten Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 100 µl der anti-Histamin-Antikörperlösung in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 40 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren. Alternativ: 30 min mit MTP-Schüttler (ca. 600 rpm).

4. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 9.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. Je 100 µl Enzymkonjugatlösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 20 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren. Alternativ: 10 min mit MTP-Schüttler (ca. 600 rpm).
6. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 9.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
7. Je 100 µl Substrat-/Chromogenlösung in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **im Dunkeln** inkubieren. Alternativ: 15 min mit MTP-Schüttler (ca. 600 rpm).
8. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

10. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Die der Extinktion entsprechende Histaminkonzentration in µg/kg (ppb) wird aus der Standardkurve ermittelt. Diese Konzentration muss dann noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Der Verdünnungsfaktor ist abhängig von der Probenaufarbeitung und ist in der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

Probenvorbereitung	Probe	Verdünnungsfaktor
8.1.	Rotwein, Weißwein, Sekt	500
8.2.	Milch	200
8.3.	Käse, frischer Fisch, Dosenfisch	5 000
8.4.	Fischmehl	200 000

Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- Proben mit einer Extinktion $< 0,4$ weiter verdünnen und nochmals analysieren
- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- die Kontrollen sollten mit einer maximalen Abweichung von $\pm 30\%$ gemessen werden (andernfalls Test wiederholen)
- den Enzymimmunoassay bei einer Temperatur von $20 - 25\text{ °C}$ durchführen

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®] Histamin

Brief information

RIDASCREEN[®] Histamin (Art. No.: R1601, 96 wells / Art. No.: R1604, 48 wells) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of histamine in food.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 or 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: different depending on the sample (see 8.)






Time requirement: sample preparation (for 10 samples)..... approx. 15 min
test implementation (incubation time)..... 90 min
test implementation (incubation time with shaker) . 70 min

Detection limit: sparkling wine, white and red wine..... 250 ppb
milk..... 100 ppb
cheese, fresh and canned fish 2.5 ppm
fish meal..... 100 ppm

Recovery rate: sparkling wine, white and red wine..... 95 %
milk..... 109 %
cheese, fresh and canned fish 100 %
fish meal..... 96 %

Specificity: Histamine 100 %
3-Methyl-histamine..... approx. 0,01 %
Tyramine n.d.
L-Phenylalanine..... n.d.
L-Histidine n.d.
L-Tyrosine n.d.
Tryptamine n.d.
5-Hydroxy-Indole-Acetic Acid n.d.
Serotonin n.d.

Used symbols:

	Contains sufficient for <n> tests		Manufacturer
	Storage temperature	LOT	Batch code
	Use by	CONT	Content
	Read entire protocol before use	REF	Art. No.
IVU	Only for in vitro use	REC	Reconstitute with
LYO	Lyophilisate		

1. Intended use

RIDASCREEN® Histamin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of histamine in white and red wine, sparkling wine, milk, cheese, fresh fish, canned fish and fish meal.

2. General

Histamine is a product of the decomposition of histidine caused by the growth of certain bacteria in protein rich food like fish, cheese, meat as well as sparkling wine, wine and beer. The amount of histamine formed depends on the bacterial species, the temperature and time of exposure, and may exceed 1000 ppm (mg/kg). Fish containing high levels of histamine have been associated with poisoning commonly referred to as “scombroid poisoning”. Quality control measures have to be taken to minimize the occurrence of histamine contaminated fish. Good quality fish contains less than 10 ppm histamine. The limit value for fish and products thereof is 100 mg/kg, in some countries even 50 mg/kg. The Swiss limit value for histamine in wine is 10 mg/l.

3. Test principle

After sample preparation histamine is derivatized quantitatively by an acylation reagent into N-acylhistamine. In a competitive ELISA, free acylated histamine and bound histamine compete for the antibody binding sites.

After washing, secondary antibodies labeled with peroxidase (enzyme conjugate) are added. These antibodies bind to the antibody-histamine complexes. Any unbound enzyme conjugated antibody is then removed in a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product.

The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the histamine concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 (R1601) or 48 (R1604) measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Reagents for sample acylation:

Acylation plate	Acylation plate (uncoated) with 96 wells for acylation
Acylation tubes	96 x (R1601) or 48 x (R1604) Acylation tubes (plastic) for acylation
Standard 1-6	6 x Histamine standards , (4 ml each) 0 ppb, 0.5 ppb, 1.5 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 50 ppb
Control 1	Control 1 (4 ml), concentration see vial
Control 2	Control 2 (4 ml), concentration see vial
Acylation reagent	2 x (R1601) or 1 x (R1604) Acylation reagent (1.5 ml), ready to use
Acylation buffer	Acylation buffer (22 ml), ready to use

Reagents for the enzyme immunoassay:

Microtiter plate	Microtiter plate with 96 or 48 wells (12 strips, R1601 or 6 strips, R1604 with 8 wells each) coated with histamine
Conjugate	Conjugate (12 ml, R1601 or 6 ml, R1604) peroxidase conjugated antibody, ready to use
Anti-histamine antibody	Anti-histamine antibody (12 ml, R1601 or 6 ml, R1604) ready to use
Substrate-/Chromogen	Substrate-/Chromogen (12 ml, R1601 or 6 ml, R1604) contains tetramethyl-benzidine, ready to use
Stop solution	Stop solution (12 ml), contains 0.5 N sulfuric acid, ready to use
Washing buffer	Washing buffer (20 ml), as a 50x concentrate

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- laboratory mincer / grinder, mortar, or homogenisator
- centrifuge and centrifugal plastic vials
- shaker, e.g. vortex mixer
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- to shorten incubation time: microtiter plate (MTP) shaker (shaking amplitude 3 mm, approx. 600 rpm)

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- for milk samples: 10 mM PBS, 0.05 % Tween 20 (e.g. Sigma P3563)

6. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit reagents.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46°F).

The substrate/chromogen solution is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date (see  on the kit label).

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

7. Indication of instability or deterioration of reagents

- a blue coloration of the substrate-/chromogen solution before pipetting
- an absorption smaller than 0.9 ($A_{450\text{ nm}} < 0.9$) for standard 1

8. Preparation of Samples

Acylation tubes or reaction wells of acylation plate are for single use only to avoid contaminations.

For sample preparation use only plastic vials!!!

8.1. Sparkling wine, white wine, red wine

- dilute 20 µl wine with 10 ml of distilled water
- apply 100 µl per acylation tube or per well in the acylation plate

8.2. Milk

- centrifuge 4 ml milk for 10 min / 3000 g at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) and remove the lipid layer
- mix 20 µl defatted milk with 4 ml PBS buffer (see 5.2.)
- apply 100 µl per acylation tube or per well in the acylation plate

8.3. Cheese, fish (fresh and canned fish)

- homogenize 10 g of sample
- add 9 ml of distilled water to 1g of homogenate and mix well
- centrifuge: 5 min / 2500 g at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- remove lipid layer or cut through lipid layer
- mix 1 ml of supernatant with 9 ml of water and mix well
- dilute 200 µl of this solution with 9.8 ml of distilled water
- apply 100 µl per acylation tube or per well in the acylation plate

8.4. Fish meal

- mix 1 g of fish meal with 200 ml of distilled water and stir for 15 min
- centrifuge aliquot: 5 min / 2500 g at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute 200 µl of the supernatant with 200 ml of distilled water
- apply 100 µl per acylation tube or per well in the acylation plate

9. Test implementation

9.1. Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The **washing buffer** is provided as a 50fold concentrate. The buffer concentrate (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) is diluted 1:50 (1+49) with distilled water before use (i.e. 10 ml buffer concentrate + 490 ml distilled water). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. four weeks.

The **acylation reagent** is provided ready to use, it has a freezing point of 18.5 °C (65 °F). When being used it must be ensured that the acylation reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution. The acylation reagent can be stored at room temperature (20 - 25 °C/ 68 - 77 °F) or brought to room temperature before use.

9.2. Test procedure for the acylation

Pipette carefully and avoid splashes.

1. All standards, controls and samples should be run in duplicate (**Art. No.: R1604, 48 wells**: Use only 48 - not all 96 - wells of the acylation plate, because the ELISA-plate contains only 48 wells). Record standard and sample positions.

Alternatively, insert required number of acylation tubes into the acylation plate and use as reaction vials.

2. Add 100 µl of each standard solution, control or prepared sample to acylation tubes or separate wells of the acylation plate.
3. Add 25 µl of the acylation reagent to each acylation tube or well.
4. Add 200 µl of the acylation buffer to each acylation tube or well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Use 25 µl for the ELISA.

9.3. Test procedure for ELISA

Pipette carefully and avoid splashes. Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards, controls and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 25 µl of acylated standard solution, control or prepared sample to separate wells.
3. Add 100 µl of the anti-histamine antibody solution to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 40 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Alternatively, 30 min with a MTP-shaker (approx. 600 rpm)
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl of washing buffer (see 9.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of the conjugate solution to of each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 20 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Alternatively, 10 min with a MTP-shaker (approx. 600 rpm)

6. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl of washing buffer (see 9.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
7. Add 100 µl of the substrate-/chromogen solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) **in the dark**. Alternatively, 15 min with a MTP-shaker (approx. 600 rpm).
8. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm against an air blank. Read within 10 min after addition of stop solution.

10. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

The histamine concentration in µg/kg (ppb) corresponding to the absorbance of each sample is read from the calibration curve and then further multiplied by the corresponding dilution factor. The dilution factor depends on the sample preparation and is listed in the table below.

Sample preparation	Sample	Dilution factor
8.1.	red wine, white wine and sparkling wine	500
8.2.	milk	200
8.3.	cheese, fresh and canned fish	5 000
8.4.	fish meal	200 000

Recommendation

In order to ensure a high analytical performance:

- further dilute samples with absorbances < 0.4 and analyse again
- analyze each sample in duplicate
- the controls should be measured with a maximum deviation of +/- 30 % (otherwise repeat the assay)
- the optimal temperature for using the assay is 20 - 25 °C / 68 - 77 °F.

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.