

RIDA[®] QUICK Histamin

Colorimetric assay for the quantitative determination of
histamine in fresh fish and fish meal

Ensayo colorimétrico para el análisis cuantitativo
de histamina en pescado fresco y en harina de pescado

Art. No.: R1603

In vitro Test

Storage at 2 - 8 °C

Almacenar entre 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

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

Address / Dirección:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt

www.r-biopharm.com

For further questions please contact your local distributor.

Para cualquier pregunta por favor sírvase de contactar a su distributor local.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDA[®] and RIDASCREEN[®]
son marcas registradas de la empresa R-Biopharm AG
Fabricante: R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania

R-Biopharm AG está certificada con el ISO 9001.

Brief information

RIDA[®]QUICK Histamin (Art. No.: R1603) is a colorimetric assay for the quantitative determination of histamine in fresh fish and fish meal.

The test kit is sufficient for 48 determinations (sample determinations).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: Extraction, clean up with an ion-exchange column

Time requirement: Sample preparation (for 10 samples) approx. 15 min
 Test implementation (incubation time)..... approx. 10 min






Detection limit: Fresh fish20 ppm
 (corresponding to the Fish meal125 ppm
 standard substance)

Cross-reactions: The specificity of the RIDA[®]QUICK Histamin was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system.

Histamin	100 %
L-Histidine	< 1
Tyramine	< 1
L-Tyrosine	< 1
L-Phenylalanine.....	n.d.
L-Tryptophan	n.d.
Non-aromatic amino acids.....	n.d.
Tryptamine	n.d.
Serotonine	n.d.

Limitation: Fish such as tuna contain naturally very high levels of histidine concentrations which disturb the assay.

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		

1. Intended use

RIDA[®]QUICK Histamin is a colorimetric assay for the quantitative analysis of histamine in fish meal. If fresh fish samples are to be analyzed a validation has to be carried out (employ histamine-free and histamine containing (spiked) samples for each fish species).

2. General

Histamine is one of the biogenic amines. The amount of histamine formed depends on the bacterial species, the temperature and time of exposure, and may exceed 1000 ppm (mg/kg). If concentrations of amines exceed normal levels, possibly due to bacterial contamination of food, harmful effects may occur. The contents of histamine in food is regarded as criterion of quality.

3. Test principle

The RIDA[®]QUICK Histamin assay is a colorimetric assay. After extraction of the sample, a clean-up is carried out with an ion exchange column to separate histamine from impurities. After separation histamine is derivatized and the resulting dye is determined in a photometer at 450 nm wavelength. The optical density of the dye is proportional to the concentration of histamine in the sample. A standard curve allows the quantification of the histamine concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 samples. Each test kit contains:

6 x 8	Ion exchanger	Ion exchanger columns
1 x	Microtiter plate	Microtiter plate 96 wells non-coated (12 strips with 8 removable wells each)
6 x	Standard N	Histamine standard solutions, 0.9 ml each *) 0 ppm (zero standard), 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, ready to use
1 x	Elution buffer	Elution buffer (50 ml), ready to use
1 x	Washing buffer	Washing buffer (50 ml), 10 fold concentrate
1 x	Color reagent 1	Color reagent 1 (5.4 ml)
1 x	Color reagent 2	Color reagent 2 (5.4 ml)

*) The dilution factor 4 of the standards during the color reaction has already been taken into account.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment

- microtiter plate or strip photometer (450 nm)
- grinder (mill)
- graduated cylinder: 100 ml plastic or glass
- plastic tubes for preparing sample extract
- optional: shaker
- vortex
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents

- isopropanol
- distilled or deionized water
- 70 % isopropanol solution: prepare 70 % of isopropanol solution by mixing 70 ml pure isopropanol with 30 ml of distilled or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

This test should be performed only by trained laboratory staff. The instructions for performing the test must be followed strictly.

Isopropanol is inflammable.

7. Storage instructions

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

Return any unused ion exchanger columns to their original foil bag and reseal them.

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.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

Precipitates in any of the reagents may indicate spoilage and reagents may be deteriorated. Replace test kit if precipitates occur.

9. Preparation of Samples

9.1. Preliminary comments

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.
2. Return all reagents to 2 - 8 °C (36 - 46 °F) immediately after use.
3. The washing buffer is provided as a 10fold concentrate. Before use dilute the washing buffer 1:10 (1+9) with distilled water, e. g. 1 ml buffer with 9 ml distilled water.
4. Notes regarding clean up procedure: Displace the top stopper of the column first, then remove the bottom stopper to avoid splashing off the gel matrix. The sample as well as the washing buffer should be applied carefully on the top of the column in order to avoid flushing the gel material.
5. Do not allow the columns to dry between working steps.
6. Reproducibility is largely dependent upon the consistency with which the columns are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined.

9.2. Fresh fish

Extraction

- homogenize 50 g of fish with 50 ml of distilled water
- transfer 1 g of homogenate into a polypropylene tube
- add 3 ml of isopropanol (100 %)
- mix with a vortex
- centrifuge: 3 min / at 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 1 ml of the supernatant for the clean up procedure

Clean up

- precondition the ion exchange column with 3 ml of diluted washing buffer (see 9.1.)
- add 1 ml of the supernatant onto the column and allow it to flow slowly into the column
- wash the column with 1 ml of 70 % isopropanol solution
- wash the column twice (2 x) with 3 ml of diluted washing buffer (see 9.1.)
- discard the washing solution and use a new tube to collect the histamine eluate
- pipet 0.5 ml of elution buffer carefully onto the column, allow it to flow slowly into the column and pipet again 0.5 ml of elution buffer onto the ion-exchanger column
- press some ml of air through the column to obtain the entire eluate
- mix the eluate with a vortex
- use 200 µl per well of the mixed eluate for the color reaction

9.3. Fish meal

Extraction

- weigh 2 g of ground sample and add it to a suitable container with 20 ml of 70 % isopropanol solution
- shake vigorously for four minutes (manually or with shaker)
- filter the extract through a paper filter (e. g. Whatman No. 1 filter), centrifuge or just let the solids settle for a few minutes
- use 200 µl of the filtrate or supernatant for the clean up procedure

Clean up

- precondition the ion exchange column with 3 ml of diluted washing buffer (see 9.1.)
- add 200 µl of the supernatant onto the column
- wash the column twice (2 x) with 3 ml of diluted washing buffer (see 9.1.)
- discard the washing solution and use a new tube to collect the histamine eluate
- pipet 0.5 ml of elution buffer carefully onto the column, allow it to flow slowly into the column and pipet again 0.5 ml of elution buffer onto the ion-exchanger column
- press some ml of air through the column to obtain the entire eluate
- mix the eluate with a vortex
- use 200 µl per well of the mixed eluate for the color reaction

10. Test procedure for the colorimetric assay

1. Mix the color reagents 1 and 2 in equal amounts (1+1). This mixture is stable for at least 10 hours.
2. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
3. Pipet 50 µl of standard and 150 µl elution buffer to each standard well. Use a new pipette tip for each standard.
4. Add 200 µl of each sample eluate to a new well.
5. Add 50 µl of the color reagent mixture to each well (samples and standards)
6. Measure the absorbance at 450 nm against an air blank. Read within 10 min.

11. Results

A special software, the RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999), is available to evaluate the RIDA®QUICK Histamin assay.

In order to obtain the histamine concentration in mg/kg (ppm) actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the described procedure (see 9.), the dilution factor is as follows:

fresh fish.....	8
fish meal.....	50

Therefore, the histamine measuring range of the standard curve is between 20 and 320 mg/kg (ppm) for fresh fish and between 125 to 2000 mg/kg (ppm) for fish meal.

Limitations:

- Very high concentrations of histidine and biogenic amines disturb the assay.

Important Note:

- Fresh fish samples have to be validated: Employ histamine-free and histamine containing (spiked) samples for each fish species. A spiking procedure and a spiking solution is available from your local distributor.
- Extract each sample twice.
- Further dilute samples with an absorbance > 3 and analyze again. The same sample extract can be used for retesting in applying less sample extract onto the column. If e.g. only 100 µl are applied, the dilution factor is 100 (the corresponding measuring range of the standard curve is 250 to 4000 mg/kg).
- This test should only be carried out by trained laboratory staff.

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.

RIDA[®]QUICK Histamin

Información breve

RIDA[®]QUICK Histamin (Art. No. R1603) es un ensayo colorimétrico para la determinación cuantitativa de histamina en pescado fresco y en harina de pescado.

El kit alcanza para realizar 48 determinaciones (determinaciones de muestras). Para cuantificar se requiere un espectrofotómetro (lector de ELISA) de placas o de tiras.

Preparación de las muestras: Extracción, purificado mediante columnas de intercambio iónico (clean-up)

Tiempo requerido: Preparación de las muestras (10) approx. 15 min
Ensayo (tiempo de incubación) approx. 10 min






Limite de detección: (respecto a la substancia estándar) Pescado fresco.....20 ppm
Harina de pescado.....125 ppm

Actividad cruzada: La especificidad de RIDA[®]QUICK Histamin fue determinada mediante el análisis de las reacciones cruzadas con las substancias correspondientes en solución tampón.

Histamina 100 %
L-Histidina< 1
Tyramina< 1
L-Tyrosina< 1
L-Phenylalaninan.d.
L-Tryptophanon.d.
Aminoácidos no aromáticosn.d.
Tryptaminan.d.
Serotoninan.d.

Limitación: Pescados como el atún contienen una concentración natural de histidina a niveles lo suficientemente altos para interferir el ensayo.

Simbolos usados:

	Contiene suficiente para <n> tests		Productor
	Temperatura de almacenaje	LOT	Lote
	Usar antes de	CONT	Contenido
	Lea el protocolo completo antes del uso	REF	Numero del kit
IVU	Solo para uso "in vitro"		

1. Generalidades

El RIDA[®]QUICK Histamin es un ensayo colorimétrico para la determinación cuantitativa de histamina en pescado fresco y en harina de pescado. Si han de ser analizadas muestras de pescado fresco es necesario realizar una validación de la muestra concreta. (Use muestras enriquecidas con histamina y muestras sin enriquecer en los análisis de cada especie animal)

2. Introducción

La histamina es una de las aminas biogénicas. La cantidad de histamina formada depende de las especies bacterianas, la temperatura y el tiempo de exposición. Puede llegar a exceder los 1000 ppm (mg/kg). Si las concentraciones de las aminas exceden los niveles normales, debido posiblemente a la contaminación bacteriana de los nutrientes, pueden aparecer efectos nocivos. El contenido de histamina en los alimentos es considerado como un criterio de calidad.

3. Fundamento del test

El RIDA[®]QUICK Histamin es un ensayo colorimétrico. Después de la extracción de la muestra, se hace una purificación con una columna de intercambio iónico para separar la histamina de contaminantes. Después de la separación, la histamina se derivatiza y el color resultante se determina en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. La densidad óptica del color es directamente proporcional a la concentración de histamina en la muestra. La curva de estándares permite la cuantificación de histamina en la muestra.

4. Contenido del kit

Cada kit contiene material suficiente para el análisis de 48 muestras. Cada kit contiene:

6 x 8	Ion exchanger	Columnas de intercambio de iónico
1 x	Microtiter plate	Placa con 96 pocillos no recubiertos (12 tiras, cada una con 8 pocillos separables)
6 x	Standard N	Soluciones de estándares de histamina *), (0,9 ml cada una) 0 ppm (estándar cero), 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm listas para su uso
1 x	Elution buffer	Solución de elución (50 ml), lista para su uso
1 x	Washing buffer	Solución de lavado (50 ml), 10 x concentrado
1 x	Color reagent 1	Reactivo de color 1 (5,4 ml)
1 x	Color reagent 2	Reactivo de color 2 (5,4 ml)

*) El factor 4 de dilución de los estándares durante la reacción colorante ya ha sido considerado.

5. Reactivos adicionales y accesorios requeridos

5.1. Equipo

- espectrofotómetro para placas de microtitulación o para tiras de pocillos (450 nm)
- molinillo para desmenuzar las muestras
- probeta graduada de 100 ml de plástico o de vidrio
- tubos de ensayo de plástico para la preparación de la muestra
- opcional: agitador
- vortex
- papel de filtro: Whatman No. 1 o equivalente
- micropipetas variables de 20 - 200 µl y 200 - 1000 µl

5.2. Reactivos

- isopropanol
- agua destilada o desionizada
- solución de isopropanol al 70 %: prepare una solución de isopropanol al 70 % mezclando 70 ml de isopropanol puro con 30 ml de agua destilada o desionizada

6. Precauciones


Este análisis debe ser llevado a cabo únicamente por personal entrenado de laboratorio. Las instrucciones para la realización del ensayo deben ser seguidas estrictamente.

¡El isopropanol es inflamable!

7. Almacenaje de reactivos

Almacene el kit entre 2 - 8 °C. No congele ningún componente.

Devuelva las columnas de intercambio de iónico no utilizadas a su embalaje original y consérvelos bien cerrados.

No se ofrece garantía de calidad después de la fecha de caducidad (vea  en la etiqueta de la caja).

No intercambie reactivos individuales entre tests de diferentes lotes.

8. Inestabilidad o deterioro de reactivos

La aparición de un precipitado en cualquiera de los reactivos puede indicar una adulteración y los reactivos pueden estar deteriorados. Reemplace el kit si se presentan precipitados.

9. Preparación de las muestras

9.1. Comentarios preliminares

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de ser utilizados.
2. Guarde todos los reactivos a una temperatura entre 2 - 8 °C inmediatamente después de ser utilizados.
3. El tampón de lavado se encuentra en el test 10 x concentrado. Antes de usarlo diluya la solución de lavado 1:10 (1+9) con agua destilada, p. ej. 1 ml de solución de lavado concentrada con 9 ml de agua destilada.
4. Nota importante referente al purificado mediante columnas (clean-up): Quite primero el tapón superior de la columna, luego quite el tapón inferior para evitar salpicaduras del gel. Tanto la muestra como la solución de lavado deben aplicarse cuidadosamente sobre el gel de la columna para no remover la capa de este material y crear así zonas de menor densidad de gel.

5. No permita que las columnas se sequen durante las diferentes etapas del test.
6. La reproducibilidad de los resultados depende principalmente del cuidado con que se lavan las columnas. Siga cuidadosamente la secuencia recomendada de lavado como está descrita en el procedimiento.

9.2. Pescado fresco

Extracción

- homogenizar 50 g de pescado con 50 ml de agua destilada
- transferir 1 g de la muestra homogenizada a un tubo de plástico
- añadir 3 ml de isopropanol (100 %)
- mezclar con vortex
- centrifugar: 3 minutos a un mínimo de 2000 g y a temperatura ambiente (20 - 25 °C)
- utilice 1 ml del sobrenadante (vea “clean up”)

Purificado mediante columnas (clean-up)

- precondicionar la columna con 3 ml de solución de lavado diluida (vea 9.1.)
- añadir 1 ml del sobrenadante (vea extracción, arriba) a las columnas y permita que el sobrenadante vaya penetrando en el gel
- lavar la columna con 1 ml de solución de isopropanol al 70 %
- lavar la columna 2 veces con 3 ml de solución de lavado diluida (vea 9.1.)
- desechar la solución de lavado y usar un nuevo tubo para recoger el eluado
- añadir cuidadosamente 0,5 ml de solución de elución a la columna, permita que la solución vaya penetrando en el gel y pipetear otros 0,5 ml de solución de elución en la columna
- presione unos ml de aire por la columna para obtener el eluado completo
- mezcle el eluado con un agitador (vortex)
- utilice 200 µl del eluado agitado por microcavidad para la reacción colorimétrica

9.3. Harina de pescado

Extracción

- pesar 2 g de la muestra molida y agregar 20 ml de solución isopropanol 70 %
- agitar vigorosamente durante cuatro minutos (a mano o con agitador)
- filtrar el extracto a través del papel de filtro (p. ej. Whatman No. 1), centrifugar o simplemente dejarlo sedimentar por algunos minutos
- use 200 µl del filtrado o del sobrenadante para la purificar con las columnas (vea “clean up”)

Purificado mediante columnas (clean-up)

- precondicionar la columna con 3 ml de solución de lavado diluida (vea 9.1.)
- añadir 200 µl del sobrenadante a las columnas
- lavar 2 veces con 3 ml de solución de lavado diluida (vea 9.1.)
- desechar la solución de lavado y usar un nuevo tubo para recoger el eluado
- añadir cuidadosamente 0,5 ml de solución de elución a la columna, permitir que la solución vaya penetrando en el gel y pipetear otros 0,5 ml de solución de elución en la columna
- presione unos ml de aire por la columna para obtener el eluado completo
- mezcle el eluado con un agitador (vortex)
- utilice 200 µl del eluado agitado por pocillo para la reacción colorimétrica

10. Procedimiento

1. Mezcle los reactivos de color 1 y 2 en una proporción de 1+1. Esta mezcla es estable durante 10 horas como mínimo.
2. Coloque el número suficiente de pocillos en el marco porta cavidades para los estándares y para las muestras a analizar. Marque las posiciones de los estándares y de las muestras.
3. Agregue 50 µl de estándares y 150 µl de la solución de elución en cada cavidad para la dilución de los estándares. Utilice una punta de pipeta nueva para cada estándar.
4. Agregue 200 µl de cada eluado de la muestra en un nuevo pocillo.
5. Agregue 50 µl de la mezcla de reactivo de color en cada uno de los pocillos (muestras y estándares).
6. Mida la absorción a 450 nm respecto un blanco de aire. Mida la absorción dentro de los 10 primeros minutos.

11. Resultados

Para la evaluación y análisis de los resultados se puede obtener de R-Biopharm ó de su distribuidor local un software especial, el RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999) para el ensayo de RIDA[®]QUICK Histamin.

Para obtener la concentración real de histamina contenida en una muestra en mg/kg (ppm), la concentración leída de la curva de calibración debe multiplicarse por el factor de dilución correspondiente. Trabajando de acuerdo con el procedimiento descrito (vea 9.), los factores de dilución son los siguientes:

pescado.....	8
harina de pescado.....	50

Por consiguiente, el rango de cuantificación de histamina de la curva de estándares está entre 20 y 320 mg/kg (ppm) para pescado y entre 125 y 2000 mg/kg (ppm) para harina de pescado.

Limitaciones:

- Las altas concentraciones de histidina y aminas biogénicas pueden perturbar el ensayo.

Advertencia:

- Las muestras de pescado fresco han de ser validadas. Use muestras enriquecidas con histamina y muestras sin enriquecer en los análisis de cada especie animal. Un procedimiento de fortificación y una disolución de histamina para experimentos de fortificación está a su disposición. Por favor, pregunte a su distribuidor local.
- Realice extracciones de la muestra por duplicado.
- Diluya más las muestras con una absorción > 3 y analícelas de nuevo. Se puede utilizar el mismo extracto para la nueva cuantificación. Para evitar una sobrecarga de las columnas, aplique menos extracto sobre ellas, p. ej. si van a ser usados sólo 100 µl, el factor de dilución es 100 (el rango de cuantificación correspondiente en la curva estándar estaría entre 250 y 4000 mg/kg).
- Este ensayo sólo debería ser realizado por personal de laboratorio entrenado.

R-Biopharm no brinda garantía de ningún tipo, expresa o implícita, excepto que los materiales de los cuales sus productos son hechos corresponden a las normas estándares de calidad. Si algún material es defectuoso, R-Biopharm va a proceder al reemplazo del mismo. Quedan expresamente fuera de esta garantía la comerciabilidad de este producto, los daños directos o indirectos producidos por su uso indebido o por ser usados para propósitos no previstos en su diseño, los deterioros producidos por defectos de almacenaje, así como también los daños producidos como consecuencia de su utilización para otros fines.