

RIDASCREEN[®] Histamine (enzymatic)

Art. No. R1605

Enzymatischer Test zur quantitativen Bestimmung
von Histamin

Enzymatic assay for the quantitative determination of
histamine

Ensayo enzimático para el análisis cuantitativo
de histamina

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

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

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : info@r-biopharm.de

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Marken 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®Histamine (enzymatic) (Art. Nr. 1605) ist ein enzymatischer Test im Mikrotiterplattenformat zur quantitativen Bestimmung von Histamin in frischem Fisch, Dosenfisch, Fischmehl, Wein (in Kombination mit Art. No. R1699), Käse und Milch.

Alle Reagenzien für die Durchführung des enzymatischen Tests, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Fischproben) . ca. 25 min Testdurchführung (Inkubationszeit) 15 min
Standard:	Histamin
Nachweisgrenze:	Frisher Fisch, Dosenfisch 0,75 mg/kg Fischmehl 3,75 mg/kg Wein..... 0,54 mg/kg Käse..... 0,75 mg/kg
Bestimmungsgrenze:	Frisher Fisch, Dosenfisch 2 mg/kg Fischmehl 10 mg/kg Wein..... 1,4 mg/kg Käse..... 2 mg/kg
Wiederfindung:	ca. 85 - 105 %
Spezifität:	Das Enzym ist spezifisch für Histamin. Es bestehen keine Nebenaktivitäten für L-Histidin, L-Tryptophan, Serotonin, L-Tyrosin, Tyramin, L-Lysin, Trimethylamin.

Die Spezifität des RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) Tests wurde durch die Bestimmung der Nebenaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt (s.Validierungsbericht).

Produktangebot

RIDA® Sample Decolorant (R1699) (für Weinanalytik)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) wird zur quantitativen Bestimmung von Histamin in frischem Fisch, Dosenfisch, Fischmehl, Wein, Käse und Milch eingesetzt.

2. Allgemeines

Histamin ist ein Produkt der Zersetzung von Histidin, verursacht durch das Wachstum bestimmter Bakterien in proteinreichen Nahrungsmitteln wie Fisch, Wein, Käse und Milch.

Die Menge an gebildetem Histamin hängt von der Bakterienart, der Temperatur und der Expositionszeit ab und kann in Fisch 1000 mg/kg überschreiten. Fisch mit hohen Konzentrationen an Histamin wird oft mit der „Scombroid-Fischvergiftung“ in Verbindung gebracht.

Fisch guter Qualität enthält weniger als 10 mg/kg. Der Grenzwert für Histamin in Fisch- und Fischereierzeugnissen liegt zwischen 50 - 200 mg/kg je nach Fischart und Land. Ähnlich hohe Gehalte können in Käse festgestellt werden, während in Wein die Gehalte normalerweise 15 mg/l nicht überschreiten.

3. Testprinzip

Grundlage ist eine enzymatische Reaktion. Die Mikrotiterplatte ist mit einem Reagenz (Elektronenüberträger) und Farbstoff beschichtet.

Histamin-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Histamin zu Imidacetaldehyd in Anwesenheit von einem Elektronenüberträger und einem Farbstoff. Der sich bildende Farbstoff wird bei 450 nm gemessen und ist proportional zur Histaminkonzentration.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Buffer Puffer	farblos	gebrauchsfertig		15 ml
Standard 1 Standard 1	weiss	gebrauchsfertig	0 mg/l	1,2 ml
Standard 2 Standard 2	weiss	gebrauchsfertig	1 mg/l	1,2 ml
Standard 3 Standard 3	weiss	gebrauchsfertig	5 mg/l	1,2 ml
Standard 4 Standard 4	weiss	gebrauchsfertig	10 mg/l	1,2 ml
Standard 5 Standard 5	weiss	gebrauchsfertig	15 mg/l	1,2 ml
Standard 6 Standard 6	weiss	gebrauchsfertig	20 mg/l	1,2 ml
Enzyme solution Enzymlösung	rot	gebrauchsfertig		1 ml
Spiking solution Dotierlösung	blau	gebrauchsfertig	10 mg/ml	1 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte und Zubehör:

Für die Probenvorbereitung nur Plastik-Gefäße (kein Glas) verwenden.

- Vortex
- variable 100 - 200 µl Mikropipetten
- Multistepper-Pipette mit 10 µl, 100 µl, 150 µl und 200 µl Pipettiervolumen (z.B. Eppendorf combitips)
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- RIDA®SOFT Win.net (Z9996) ab **Version 1.92** zur Auswertung

Fischanalytik

- 50 ml Schraubverschluss-Röhrchen (z.B. Greiner; Mat. Nr. 227261)
- Homogenisator: Schlagmühle, Ultra-Turrax oder Mixer
- Wasserbad 100 °C
- Zentrifuge, zentrifugierbare Reagenzröhrchen

Wein- und Käseanalytik

- 1,5 - 2 ml Plastikgefäße (z.B. Eppendorf tube)
- Mixer, Blender (e.g. Mr. Magic)
- Mikrozentrifuge

5.2. Reagenzien:

–destilliertes oder deionisiertes Wasser

Weinanalytik

–RIDA[®] Sample Decolorant (R1699) zur Probenaufarbeitung

Käseanalytik

–1 N Perchlorsäure (z.B. Bernd Kraft, Art. No. 20126.2700)

–1 N KOH (z.B. Carl Roth, Art. No. K017.1)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite

www.r-biopharm.de

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Den Testkit auf keinen Fall einfrieren.

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

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Wenn die Differenz der Extinktion $A_2 - A_1$ bei Standard 6 stark vom Analysenzertifikat abweicht, liegt vermutlich ein Reagenzienverfall vor.

9. Probenvorbereitung

Die Histamingehalte steigen auch in gekühlten Lebensmitteln weiter an, daher ist es wichtig, die Laboruntersuchungen direkt nach der Probenahme durchzuführen.

Für die Probenvorbereitung nur Plastik-Röhrchen verwenden.

9.1. Testvorbereitung

Unsaubere Laborausrüstung kann zu einer Kontamination von Proben oder Testkomponenten mit Histamin führen.

9.2. Frischfisch und Dosenfisch

- 5 g homogenisierte Probe in einem 50 ml PP-Schraubverschluss-Röhrchen einwiegen
- Probe mit 20 ml dest. Wasser übergießen
- Gefäß verschließen, schütteln oder vortexen bis die Probe gleichmäßig suspendiert ist
- Probe 20 min in ein kochendes Wasserbad stellen und gelegentlich schütteln
- kurz abkühlen lassen
- 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren (möglichst bei 4 °C)
Alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 2 min hochtourig zentrifugieren (> 10000 g).
- Sollte sich nach dem Zentrifugieren eine Fettschicht auf dem Extrakt gebildet haben, so wird diese vorsichtig durchstoßen und die Probenlösung in ein neues Gefäß pipettiert und nochmals zentrifugiert.**
(Wenn der Extrakt trüb ist, dann mit Spritzenfilter filtrieren.)
- 100 µl des **klaren Extraktes** unverdünnt im Test einsetzen

9.3. Fischmehl

- 1 g homogenisiertes Fischmehl in einem 50 ml PP-Schraubverschluss-Röhrchen einwiegen.
- Probe mit 25 ml dest. Wasser übergießen.
- Gefäß verschließen, schütteln oder vortexen bis die Probe gleichmäßig suspendiert ist
- Probe 20 min in ein kochendes Wasserbad stellen und gelegentlich schütteln
- kurz abkühlen lassen
- 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren (möglichst bei 4 °C)
Alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 2 min hochtourig zentrifugieren (> 10000 g).

Sollte sich nach dem Zentrifugieren eine Fettschicht auf dem Extrakt gebildet haben, so wird diese vorsichtig durchstochen und die Probenlösung in ein neues Gefäß pipettiert und nochmals zentrifugiert.

(Wenn der Extrakt trüb ist, dann mit Spritzenfilter filtrieren.)

–100 µl des **klaren Extraktes** unverdünnt im Test einsetzen

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage oder bei -20 °C drei Monate haltbar.

9.4. Wein

Weine (Rotwein, Weißwein, Rosé) enthalten Anthocyane und Polyphenole, welche vor der enzymatischen Analyse entfernt werden müssen.

–200 µl Reagenz 1 des RIDA® Sample Decolorant zu 200 µl Wein hinzugeben (Pipettenspitzen vorspülen)

–200 µl Reagenz 2 des RIDA® Sample Decolorant hinzufügen, vortexen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 2 min bei mind. 14000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)

–500 µl des Überstands in ein neues Gefäß transferieren

–100 µl Reagenz 3 des RIDA® Sample Decolorant hinzufügen, vortexen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren und 2 min bei 14000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)

–100 µl des **klaren Extraktes** im Test einsetzen

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C 1 Tag haltbar.

9.5. Käse

Wenn die Käserinde essbar ist, sollte sie Teil der repräsentativen Probe sein.

–60 g Käse in den Plastikaufsatz des Mixers einwiegen, 140 ml Wasser zufügen und für 15 Sekunden mixen, um alle Partikel zu suspendieren (zweimal wiederholen).

–Anschließend die Fettschicht mit einem Spatel entfernen. 50 ml der milchigen Suspension in ein Plastikgefäß überführen.

–10 min bei mind. 3500 g zentrifugieren (möglichst bei 4 °C)

–Anschließend die Fettschicht mit einem Spatel entfernen und 0,8 ml der klaren Lösung in ein Plastikgefäß überführen

–200 µl 1 N Perchlorsäure hinzufügen, gut mischen

–2 min bei 20000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)

–500 µl des klaren Überstands in ein neues Plastikgefäß überführen und 100 µl 1 N KOH hinzufügen und anschließend mischen

- 2 min bei 20000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)
- 100 µl des **klaren Extraktes** im Test einsetzen

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C 1 Tag haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

10.2. Testdurchführung

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.

1. Je 150 µl Puffer mit einem Multistepper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und die **Platte vorsichtig manuell schütteln**.
2. Je 100 µl der Standardlösungen, der Kontrollen bzw. der vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung pipettieren. Die Pipettenspitzen sind vorzuspülen. **Anschließend die Platte vorsichtig manuell schütteln.**
3. Nach 3 min die Extinktion A_1 bei 450 nm ohne Referenzfilter messen.*
4. Mit einem Multistepper 10 µl der blau eingefärbten Enzymlösung in jede Kavität pipettieren. **Anschließend die Platte vorsichtig manuell schütteln.**
5. Nach 10 min die Extinktion A_2 bei 450 nm ohne Referenzfilter messen. Zur Auswertung die RIDA®SOFT Win.net benutzen, dazu A_1 und A_2 aufrufen und berechnen.

* Bei **Fisch** und **Wein** kann eine Schleichreaktion bei der nachfolgenden enzymatischen Analyse auftreten: Wird während der 3 minütigen Inkubation eine **zunehmende Gelbfärbung** in den Kavitäten beobachtet, so sollte auf Ascorbinsäuregehalte kleiner 250 mg/l getestet werden. Ist keine Ascorbinsäure vorhanden, sollte die Inkubationszeit auf 10 min erhöht werden.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Produkte entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996, ab Version 1.88) erhältlich. Die Auswertung sollte mittels linearer Regression erfolgen, dabei muss der Verdünnungsfaktor der Proben berücksichtigt werden. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Probe	Verdünnungs-faktor	Messbereich
Frischer Fisch / Dosenfisch	5	2 - 100 mg/kg
Fischmehl	25	10 - 500 mg/kg
Wein	3,6	1,4 - 72 mg/l
Käse	5	2 - 100 mg/kg

Höhere Extinktionswerte (E_{450nm}) der Kalibrationsgeraden im Vergleich zu den Daten des Zertifikates, insbesondere für den Null-Standard, können auf eine Histamin-Kontamination hinweisen. Proben mit Extinktionswerten (E_{450nm}) > Standard 6 mit Wasser entsprechend verdünnen und nochmals bestimmen.

Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- Jede Probe als Doppelbestimmung messen.
- Histamin-freie und Histamin-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen.

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung sollte die dem Kit beiliegende Dotierlösung zum Spiken verwendet werden.

10 mg/l Spike-Kontrolle

- 1:1000 Verdünnung der Dotierlösung Histamin (10 mg/ml) in 2 Schritten, z.B.
 - 100 µl + 3,9 ml Wasser (1:40)
 - 200 µl hiervon + 4,8 ml Wasser (1:1000 insgesamt)
- 100 µl im Test einsetzen

50 mg/kg Histamin-haltige dotierte Fischprobe:

- 25 µl der Dotierlösung Histamin (10 mg/ml) zu 5 g homogenisierter Fischprobe pipettieren
- Probe mit 20 ml Wasser aufarbeiten (siehe 9.2.)

250 mg/kg histamin-haltige dotierte Fischmehlprobe:

- 25 µl der Dotierlösung Histamin (10 mg/ml) zu 1 g homogenisierter Fischmehlprobe pipettieren
- Probe mit 25 ml Wasser aufarbeiten (siehe 9.3.)

10 mg/l Histamin-haltige Weinprobe:

- 10 µl der Dotierlösung Histamin (10 mg/ml) zu 10 ml Wein pipettieren
- Anschließend die Probe mit dem RIDA[®] Sample Decolorant aufarbeiten (siehe 9.4.)

Bitte beachten:

Für weitere Produktinformationen und Applikationen (z.B. Milch) kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic)

Brief information

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) (Art. No. 1605) is an enzymatic test in microtiter plate format for the quantitative determination of histamine in fresh fish, canned fish, fish meal, wine (in combination with Art. No. R1699), cheese and milk.

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

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

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (10 fish samples. approx. 25 min test implementation (incubation time) 15 min
Standard:	histamine
Limit of detection:	fresh fish, canned fish 0.75 mg/kg fish meal 3.75 mg/kg wine 0.54 mg/kg cheese 0.75 mg/kg
Limit of quantification:	fresh fish, canned fish 2 mg/kg fish meal 10 mg/kg wine 1.4 mg/kg cheese 2 mg/kg
Recovery:	approx. 85 - 105 %
Specificity:	The enzyme is specific for histamine. There are no side reactions to L-histidine, L-tryptophan, serotonin, L-tyrosine, tyramine, L-lysine, trimethylamine.

The specificity of RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) has been evaluated by the determination of the side activities of the respective substances in a buffer system (see validation report).

Related products

RIDA® Sample Decolorant (R1699) (for wine analysis)

1. Intended use

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) is used for the quantitative determination of histamine in fresh fish, canned fish, fish meal, wine, cheese and milk.

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 and wine.

The amount of histamine formed depends on the bacterial species, the temperature and the time of exposure, and may exceed in fish 1000 mg/kg. Fish containing high levels of histamine have been associated with poisoning commonly referred to as “scombroid poisoning”.

Fish of good quality contains less than 10 mg/kg histamine. The limit value for fish and products thereof is between 50 and 200 mg/kg depending on the fish species and the country. Similar high concentrations can be found in cheese, while histamine in wine usually does not exceed 15 mg/l.

3. Test principle

The basis is an enzymatic reaction. The microtiterplate is coated with a reagent (electron carrier) and a dye.

Histamine-dehydrogenase catalyzes the oxidation of histamine to imidacetaldehyde in presence of an electron carrier and a dye. The forming dye is measured at 450 nm and is proportional to the histamine concentration.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses). All reagents are ready to use. Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Buffer	Transparent	Ready to use		15 ml
Standard 1	White	Ready to use	0 mg/l	1.2 ml
Standard 2	White	Ready to use	1 mg/l	1.2 ml
Standard 3	White	Ready to use	5 mg/l	1.2 ml
Standard 4	White	Ready to use	10 mg/l	1.2 ml
Standard 5	White	Ready to use	15 mg/l	1.2 ml
Standard 6	White	Ready to use	20 mg/l	1.2 ml
Enzyme solution	Red	Ready to use		1 ml
Spiking solution	blue	Ready to use	10 mg/ml	1 ml

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

For the sample preparation only plastic vials (no glass) should be used.

- vortex
- variable 100 - 200 µl micropipettes
- multistepper-pipette with 10 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl pipetting volume (e.g. Eppendorf combitips)
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- RIDA®SOFT Win.net (Z9996); use **version 1.92** or newer for calculation

Fish analysis

- 50 ml PP screw-cap vials (e.g. Greiner; Product No. 227261)
- homogenizer: laboratory mincer / grinder, Ultra-Turrax or mixer
- water bath (100 °C / 212 °F)
- centrifuge, centrifuge vials

Wine and cheese analysis

- 1.5 - 2 ml plastic vials (e.g. Eppendorf tube)
- mixer, blender (e.g. Mr. Magic)
- microcentrifuge

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water

Wine analysis

- RIDA® Sample Decolorant (R1699) for sample preparation

Cheese analysis

- 1 N perchloric acid (e.g. Bernd Kraft, Art. No. 20126.2700)
- 1 N KOH (e.g. Carl Roth, Art. No. K017.1)

6. Warnings and precautions for the users

This test should be carried out only by trained laboratory technicians. The instructions for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

7. Storage instructions

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

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).

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

If the difference between absorption of $A_2 - A_1$ of standard 6 is differing strongly from the certificate of analysis, then a deterioration of reagents is likely.

9. Preparation of samples

The histamine concentration increases also in refrigerated food, therefore it is important to carry out the laboratory analysis directly after sampling. **Use only plastic vials for the sample preparation.**

9.1. Preliminary comments

Dirty laboratory equipment can lead to contamination of samples and test components with histamine.

9.2. Fresh fish and canned fish

- weigh 5 g of homogenized sample into a 50 ml PP-screw cap vial
- pour 20 ml of dist. water over the sample.
- close the vial and shake or vortex until the sample is evenly suspended
- incubate the sample for 20 min in a boiling water bath and shake from time to time
- allow the sample to cool
- centrifuge for 10 min at least 2500 g (if possible at 4 °C (39 °F)
Alternatively transfer 2 ml of the extract into centrifugation vials and centrifuge at high speed (> 10000g) for 2 min in a micro-centrifuge.
If a layer of fat has formed on top of the extract after centrifugation then carefully penetrate through the fat layer and pipette the sample into a new vial and centrifuge again. (If the extract is cloudy then filter with a syringe filter.
- pipette 100 µl of the undiluted **clear extract** in the assay).

9.3. Fish meal

- weigh 1 g of homogenized fish meal into a 50 ml PP-screw cap vial
- pour 25 ml of dist. water over the sample
- close the vial and shake or vortex until the sample is evenly suspended
- incubate the sample for 20 min in a boiling water bath and shake from time to time
- allow the sample to cool
- centrifuge for 10 min at least 2500 g (if possible at 4 °C (39 °F)
Alternatively transfer 2 ml of the extract into centrifugation vials and centrifuge at high speed (> 10000g) for 2 min in a micro-centrifuge.
If a layer of fat has formed on top of the extract after centrifugation then carefully penetrate through the fat layer and pipette the sample in a new vial and centrifuge again. (If the extract is cloudy then filter with a syringe filter).
- Pipette 100 µl the undiluted **clear extract** in the assay.

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days or at -20 °C (-4 °F) for three months.

9.4. Wine

Wine (red wine, white wine, Rosé) contains anthocyanins and polyphenols which have to be removed prior to the enzymatic analysis.

- Add 200 µl Reagent 1 of RIDA[®] Sample Decolorant to 200 µl wine (rinse pipette tip)
- Add 200 µl Reagent 2 of RIDA[®] Sample Decolorant, vortex and incubate 5 min at room temperature, then centrifuge 2 min at a minimum of 14000 g (room temperature)
- Transfer 500 µl of the supernatant in a new vial
- Add 100 µl Reagent 3 of RIDA[®] Sample Decolorant, vortex and incubate 5 min at room temperature then centrifuge at 14000 g (room temperature)
- Use 100 µl of the **clear extract** in the assay

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 1 day.

9.5. Cheese

If the cheese rind is edible then it should also be part of the representative sample.

- Weigh in 60 g of cheese into the plastic cup of blender and add 140 ml of water. Mix for 15 sec. to suspend all particles. Repeat two more times.
- Remove the fat layer with a spatula. Transfer 50 ml of the unclear solution to an plastic vial.
- Centrifuge at 3500 g for 10 min (at 4°C if possible).
- Remove the fat layer with a spatula and transfer 0,8 ml of the clear solution to an plastic vial.
- Add 200 µl 1 N perchloric acid, mix well.
- Centrifuge at 20000 g for 2 min at room temperature.
- Transfer 500 µl of the clear supernatant to a new Eppendorf centrifuge vial and add 100 µl 1 N KOH
- Mix and centrifuge 2 min at least 20000 g at room temperature
- Use 100 µl of **clear extract** per

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 1 day.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

10.2. Test implementation

Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.

1. Using a multi-stepper, add 150 µl of buffer to the wells and **carefully shake the plate manually**.
2. Add 100 µl of standards, controls or prepared samples to separate wells in duplicate. Flush the pipette tips. **Thereafter, carefully shake the plate manually**.
3. After 3 min the absorption A1 is measured at 450 nm without a reference filter.*
4. Add 10 µl of the blue dyed enzyme solution with a multi-stepper to each well. Thereafter, **carefully shake the plate manually**.
5. After 10 min the absorption A2 is measured at 450 nm without a reference filter. For evaluation use the RIDA®SOFT Win.net, select A1 and A2 and calculate.

*For **fish** and **wine** a creep reaction may occur during the subsequent enzymatic analysis: If during the 3 minute incubation an **increasing yellow coloration** is observed, then test for ascorbic acid concentrations lower than 250 mg/l. If no ascorbic acid is observed then increase the incubation time to 10 min.

11. Results

At R-Biopharm AG a special software, the RIDA[®]SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996, use version 1.88 or newer), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] assays. The calculation should be done using linear regression, the dilution factor of the samples has to be taken into account. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Sample	Dilution factor	Measuring range
Fresh/canned fish	5	2 - 100 mg/kg
Fish meal	25	10 - 500 mg/kg
Wine	3.6	1.4 - 72 mg/kg
Cheese	5	2 - 100 mg/kg

In comparison with the certificate, higher values of the absorbance ($A_{450\text{ nm}}$) for the calibration curve, especially for the zero standard, may be a result of histamine contamination.

A further dilution with water and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 6.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

- Each sample should be measured in duplicate.
- Employ also histamine-free and histamine-containing (spiked) samples as test controls.

To verify the correct and interference-free implementation of the test procedure the spike solution contained in the kit should be used for spiking.

10 mg/l spike control

- 1:1000 dilution of the Spiking Solution Histamin (10 mg/ml) in two steps e.g.
100 µl + 3.9 ml water (1:40)
200 µl thereof + 4.8 ml water (1:1000 in total)
- Use 100 µl in the assay.

50 mg/kg histamine spiked fish sample

- pipette 25 µl of the Spiking Solution Histamine (10 mg/ml) to 5 g homogenized fish
- extract the sample with 20 ml of water (see 9.2.)

250 mg/kg histamine spike fish meal sample

- pipette 25 µl of the Spiking Solution Histamine (10 mg/ml) to 1 g homogenized fish meal sample
- extract the sample with 25 ml of water (see 9.3.)

10 mg/l histamine spiked wine sample

- pipette 10 µl of the Spiking Solution Histamine (10 mg/ml) to 10 ml wine
- extract the sample with RIDA[®] Sample Decolorant (see 9.4)

Please note:

For further product information and applications (e.g. milk) please contact your local distributor or R-Biopharm AG.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. 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. Defective products will be replaced. 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.

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic)

Introducción

El kit RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) (Art. No. R1605) es un ensayo enzimático, en formato de microplaca, para la determinación cuantitativa de histamina en pescado fresco, conservas de pescado, harina de pescado, vinos (en combinación con Art. No. R1699), quesos y leche. El kit contiene todos los reactivos necesarios para el ensayo enzimático, incluso los patrones.

El kit permite realizar 96 determinaciones (incluyendo los patrones).

Se requiere un lector de placas para la cuantificación.

Preparación de muestras: homogeneización y extracción

Tiempo requerido: preparación de muestras (10 muestras de pescado),
.....aprox. 25 min.
procedimiento del ensayo (incubación).....15 min.

Patrones: histamina

Límites de detección:	pescado fresco y conservas	0,75 mg/kg (ppm)
	harina de pescado	3,75 mg/kg (ppm)
	vinos	0,54 mg/kg (ppm)
	quesos	0,75 mg/kg (ppm)

Límites de cuantificación:

pescado fresco y conservas	2 mg/kg (ppm)
harina de pescado	10 mg/kg (ppm)
vinos	1,4mg/kg (ppm)
quesos	2 mg/kg (ppm)

Recuperación aproximadamente 85 - 105 %

Especificidad: El enzima es específico para histamina.

No hay reacciones cruzadas con L-histidina, L-triptófano, serotonina, L-tirosina, tiramina, L-lisina, trimetilamina.

La especificidad del kit RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) ha sido evaluada mediante la determinación de la actividad de las respectivas sustancias en un sistema tampón (ver informe de validación).

Productos relacionados:

RIDA® Sample Decolorant (R1699) (para análisis de vinos)

1. Uso recomendado

El kit RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) se emplea para la determinación cuantitativa de histamina en pescado fresco, conservas de pescado, harina de pescado, vinos, quesos y leche.

2. Información general

La histamina es un producto de descomposición de la histidina causada por el crecimiento de ciertas bacterias en alimentos ricos en proteínas como pescados, vinos, quesos y leche.

La cantidad de histamina formada depende de las bacterias presentes, de la temperatura y el tiempo de exposición, y puede superar las 1.000 ppm (mg/kg) en pescados. El pescado que contiene altos niveles de histamina se asocia con la intoxicación alimentaria conocida como “escombroidosis” o “intoxicación histamínica”

El pescado de buena calidad contiene menos de 10 ppm de histamina. El límite máximo para pescados y productos derivados varía entre 50 y 200 mg/kg, dependiendo de la especie de pescado y del país. Concentraciones similares pueden encontrarse en quesos, mientras que el contenido de histamina en vinos no excede de 15 mg/l.

3. Principio del ensayo

El ensayo se basa en una reacción enzimática. La microplaca está tapizada con un reactivo (portador de electrones) y un colorante. La Histamina deshidrogenasa cataliza la oxidación de la histamina a imidazol acetaldehído en presencia de un portador de electrones y un colorante. El color que se desarrolla se mide a 450 nm y es proporcional a la concentración de histamina.

4. Reactivos suministrados

Cada kit contiene material suficiente para realizar 96 determinaciones (incluyendo los patrones). Todos reactivos están listos para su uso. Cada kit contiene:

Componente	Color de la tapa	Presentación		
Microtiter plate Microplaca	-	Listo para usar		96 pocillos
Buffer Tampón	transparente	Listo para usar		15 ml
Standard 1 Patrón 1	blanca	Listo para usar	0 mg/l	1,2 ml
Standard 2 Patrón 2	blanca	Listo para usar	1 mg/l	1,2 ml
Standard 3 Patrón 3	blanca	Listo para usar	5 mg/l	1,2 ml
Standard 4 Patrón 4	blanca	Listo para usar	10 mg/l	1,2 ml
Standard 5 Patrón 5	blanca	Listo para usar	15 mg/l	1,2 ml
Standard 6 Patrón 6	blanca	Listo para usar	20 mg/l	1,2 ml
Enzyme solution Solución enzimática	roja	Listo para usar		1 ml
Spiking solution Solución de fortificación	azul	Listo para usar	10 mg/ml	1 ml

5. Material necesario pero no suministrado

5.1. Equipamiento:

Utilizar solamente viales de plástico (no de vidrio) para la preparación de muestras.

- agitador, Vortex
- pipeta automática de volumen variable 100 - 200 µl
- pipeta de repetición para volúmenes de 10 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl (ej.: Eppendorf combitipps)
- lector de placas (450 nm)
- RIDA® SOFT Win.net (Z9996), a partir de la **versión 1.92**, para realizar cálculos

Análisis de pescado

- viales PP de 50 ml con tapa de rosca (ej.: Greiner; Cat. Nr. 227261)
- Homogeneizador: picadora de laboratorio, Ultra-Turrax o agitadora
- baño (100 °C / 212 °F)
- centrífuga, viales/tubos para centrífuga

Análisis de vinos y quesos

- viales de plástico de 1,5 – 2 ml (ej.: tubos Eppendorf)
- agitador, picadora (ej.: Mr. Magic)
- Microcentrífuga

5.2. Reactivos:

–agua destilada o desionizada

Análisis de vinos

–RIDA[®] Sample Decolorant (R1699) para la preparación de muestras.

Análisis de quesos

–Ácido perclórico 1 N (ej.: Bernd Kraft, Art. No. 20126.2700)

–KOH 1 N (ej.: Carl Roth, Art. No. K017.1)

6. Precauciones y advertencias para los Usuarios

Este ensayo debe ser realizado por personal de laboratorio especializado. Las instrucciones deben seguirse de manera estricta.

El kit puede contener sustancias perjudiciales para la salud. La información de seguridad de los componentes de este producto se encuentra en la correspondiente ficha de seguridad, disponible en nuestra página web: www.r-biopharm.de.

7. Instrucciones de almacenamiento

Almacenar el kit a 2 - 8 °C (35 - 46 °F). No congelar ninguno de los componentes del kit.

Conservar los pocillos no utilizados a su envase original, cerrado y con el desecante provisto, y almacenar a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

La garantía de calidad no es válida después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del kit.

No intercambiar reactivos entre kits de lotes diferentes.

8. Indicación de inestabilidad o deterioro de los reactivos

Si la diferencia de absorbancia $A_2 - A_1$ del patrón 6 obtenida es muy diferente respecto al valor indicado en el Certificado de Análisis, puede deberse al deterioro de los reactivos.

9. Preparación de las muestras

La concentración de histamina también aumenta en **los** alimentos refrigerados, por lo que es importante realizar el análisis inmediatamente después del muestreo. **Utilizar solamente viales de plástico para la preparación de muestras.**

9.1. Comentarios preliminares

El material de laboratorio sucio puede causar la contaminación con histamina de las muestras y de los componentes del kit.

9.2. Pescado fresco y conservas de pescado

- Pesar 5 g de muestra homogeneizada en un vial de PP de 50 ml con tapa de rosca
- añadir 20 ml de agua destilada.
- cerrar el vial, agitar (Vortex) hasta que la muestra esté suspendida de manera homogénea
- incubar la muestra, durante 20 min en baño a 100 °C, agitando periódicamente.
- dejar que la muestra se enfríe
- centrifugar durante 10 min, al menos a 2.500 g, (si es posible, a 4 °C - 39 °F)
Alternativamente transferir 2 ml del extracto a un vial de centrífuga y centrifugar a alta velocidad (> 10.000g) durante 2 min en la microcentrífuga.
Si se observa una capa de grasa sobre el extracto después de centrifugar, tomar la muestra a través de ella, pipetear en otro vial y centrifugar nuevamente. (Si el extracto es turbio, filtrar con un filtro de jeringa).
- tomar 100 µl del **extracto claro** sin diluir para realizar el ensayo

9.3. Harina de pescado

- Pesar 1 g de harina de pescado en un vial de PP de 50 ml con tapa de rosca
- añadir 25 ml de agua destilada
- cerrar el vial, agitar (Vortex) hasta que la muestra esté suspendida de manera homogénea
- incubar la muestra, durante 20 min en baño a 100 °C, agitando periódicamente.
- dejar que la muestra se enfríe
- centrifugar durante 10 min, al menos a 2.500 g, (si es posible a 4 °C - 39 °F)
Alternativamente transferir 2 ml del extracto a un vial de centrífuga y centrifugar a alta velocidad (> 10.000 g) durante 2 min en la microcentrífuga.
Si se observa una capa de grasa sobre el extracto después de centrifugar,

tomar la muestra a través de ella, pipetear en otro vial y centrifugar nuevamente. (Si el extracto es turbio, filtrar con un filtro de jeringa).

–tomar 100 µl del **extracto claro** sin diluir para realizar el ensayo

Los extractos de muestra se pueden almacenar a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) durante 3 días y a -20 °C (-4 °F) durante tres meses.

9.4. Vinos

Los vinos (tintos, blancos y rosados) contienen antocianos y polifenoles que hay que eliminar antes de realizar el ensayo enzimático.

–Añadir 200 µl de Reactivo 1 del RIDA® Sample Decolorant a 200 µl de vino (enjuagar la punta de la pipeta en el líquido antes de pipetear)

–Añadir 200 µl de Reactivo 2 del RIDA® Sample Decolorant, agitar (Vortex) e incubar durante 5 min a temperatura ambiente, luego centrifugar durante 2 min a un mínimo de 14.000 g (temperatura ambiente)

–Transferir 500 µl del sobrenadante a un nuevo vial.

–Añadir 100 µl de Reactivo 3 del RIDA® Sample Decolorant, agitar (Vortex) e incubar durante 5 min a temperatura ambiente, luego centrifugar durante 2 min a un mínimo de 14.000 g (temperatura ambiente)

–tomar 100 µl del **extracto claro** para realizar el ensayo

Los extractos de muestra se pueden almacenar a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) durante 1 día.

9.5. Quesos

Si la corteza del queso es comestible también debe formar parte de la muestra representativa que se toma para ser analizada.

–Pesar 60 g de queso en un vaso de plástico de la picadora y añadir 140 ml de agua. Mezclar durante 15 segundos para homogeneizar la muestra. Repetir dos veces más.

–Retirar la capa de grasa con una espátula. Transferir 50 ml del extracto turbido a un tubo de plástico.

–Centrifugar a 3.500 g durante 10 min (si es posible, a 4 °C).

–Retirar la capa de grasa con una espátula y transferir 0,8 ml del extracto claro a un vial de plástico

–añadir 200 µl de Ácido perclórico 1 N, mezclar bien.

–Centrifugar a 20.000 g durante 2 min, a temperatura ambiente.

–Transferir 500 µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y añadir 100 µl de KOH 1 N.

- Mezclar y centrifugar 2 min, al menos a 20.000 g, a temperatura ambiente.
- tomar 100 µl del **extracto claro** para realizar el ensayo

Los extractos de muestra se pueden almacenar a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) durante 1 día.

10. Procedimiento del ensayo

10.1. Preparación del ensayo

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 – 77 °F) para realizar el ensayo y se deben agitar cuidadosamente antes de usar.

10.2. Procedimiento del ensayo

Insertar en el soporte el número de pocillos necesarios para analizar todos los patrones y las muestras por duplicado. Anotar la posición de los patrones y de las muestras.

1. Añadir 150 µl de tampón en cada pocillo empleando la pipeta de repetición.
Una vez finalizado, agitar la placa cuidadosamente de forma manual.
2. Añadir 100 µl de patrones, controles y muestras preparadas en los correspondientes pocillos, por duplicado. Tras dispensar, desechar la punta de pipeta. **Una vez finalizado, agitar la placa cuidadosamente de forma manual.**
3. Incubar durante 3 min y medir la absorbancia A1 a 450 nm, sin utilizar filtro de referencia.*
4. Añadir 10 µl de la solución enzimática (color azul) en cada pocillo, empleando la pipeta de repetición. **Luego agitar cuidadosamente la placa de forma manual.**
5. Incubar durante 10 min y medir la absorbancia A2 a 450 nm, sin utilizar filtro de referencia. Para obtener los resultados se utiliza el programa RIDA®SOFT Win.net, seleccionar A1 y A2 y calcular.

*Para **vinos** y **pescado** puede haber una reacción de fluencia durante el ensayo enzimático: si se observa un **incremento de coloración amarilla** durante el 3º minuto de incubación, se debe comprobar que la concentración de ácido ascórbico está por debajo de los 250 mg/l. Si no se detecta la presencia de ácido ascórbico entonces aumentar el tiempo de incubación hasta los 10 min.

11. Resultados

R-Biopharm AG dispone del programa especial denominado RIDA[®] SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996, a partir de la versión 1.92), para el cálculo de resultados de los ensayos RIDASCREEN[®]. El cálculo debe realizarse utilizando una regresión lineal. Se debe considerar el factor de dilución. La curva de los patrones figura en el Certificado de Calidad incluido en la caja del kit.

Muestras	Factor de dilución	Rango de medida
Pescado fresco / conservas	5	2 - 100 mg/kg
Harina de pescado	25	10 - 500 mg/kg
Vinos	3,6	1,4 - 72 mg/l
Quesos	5	2 - 100 mg/kg

Si se obtienen valores de absorbancia ($A_{450\text{nm}}$) de la curva de calibración altos, en comparación con el Certificado de Calidad, y especialmente para el patrón 1 (0 ppm), la causa puede ser una contaminación con histamina.

Se recomienda realizar una dilución con agua y volver a hacer la determinación de aquellas muestras cuyos valores de absorbancia ($A_{450\text{nm}}$) sean superiores a la absorbancia del patrón 6.

Recomendaciones:

Con la finalidad de asegurar los resultados analíticos:

- Cada muestra debe analizarse por duplicado.
- Emplear muestras libres de histamina y muestras conteniendo histamina (muestras fortificadas) como controles.

Para verificar que el procedimiento del ensayo es correcto, y que no hay interferencias, se deben fortificar muestras empleando la solución de fortificación incluida en el kit.

Control de la solución de fortificación de 10 mg/l

- diluir 1:1000 la solución de fortificación (Spiking Solution de 10 mg/ml) en dos pasos:
 - 100 µl + 3,9 ml agua (dilución 1:40)
 - 200 µl de la dilución anterior + 4,8 ml de agua (dilución final 1:1000)
- utilizar 100 µl de la dilución final para realizar el ensayo

Muestra de pescado fortificada a 50 mg/kg de histamina

- añadir 25 µl de la solución de fortificación (Spiking Solution de 10 mg/ml) a 5 g de pescado homogeneizado
- añadir 20 ml de agua y continuar según el apartado 9.2

Muestra de harina de pescado fortificada a 250 mg/kg de histamina

- añadir 25 µl de la solución de fortificación (Spiking Solution de 10 mg/ml) a 1 g de harina de pescado homogeneizada.
- añadir 25 ml de agua y continuar según el apartado 9.3.

Muestra de vino fortificada a 10 mg/l de histamina

- añadir 10 µl de la solución de fortificación (Spiking Solution de 10 mg/ml) a 10 ml de vino.
- extraer la muestra empleando el kit RIDA[®] Sample Decolorant (ver 9.4)

Nota:

Para obtener información adicional y otras aplicaciones (ej.: leche) por favor contacte con el Distribuidor local o con R-Biopharm AG.

Los datos corresponden al estado actual de la tecnología y ofrecen información sobre nuestros productos y su utilización. R-Biopharm no ofrece ninguna garantía, sea expresa o implícita, excepto que los materiales y reactivos con los que están fabricados sus productos son de una calidad standard. Los productos defectuosos serán reemplazados. No se ofrece ninguna garantía de comercialización de este producto o de la idoneidad del producto para cualquier propósito. R-Biopharm no será responsable de ningún daño, incluyendo los daños especiales o daños consecuentes, o de los gastos que surjan directa o indirectamente de la utilización de este producto.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321