

RIDASCREEN® Histamin

REF R1601

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Histamin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of histamine

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:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

RIDA[®], RIDASCREEN[®] und RIDASOFT[®]
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG.
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA[®], RIDASCREEN[®] and RIDASOFT[®]
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) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe 1. Verwendungszweck).

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

Probenvorbereitung: unterschiedlich je nach Probe (siehe 9.)

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

Nachweisgrenze: Sekt, Weißwein, Rotwein 250 ppb
(Matrix-abhängig) Milch 100 ppb
Käse, frischer Fisch, Dosenfisch 2,5 ppm
Fischmehl..... 100 ppm

Wiederfindung: Sekt, Weißwein, Rotwein95 %
(Matrix-abhängig) Milch109 %
Käse, frischer Fisch, Dosenfisch100 %
Fischmehl.....96 %

Spezifität: Histamin100 %
3-Methyl-Histamin ca. 0,01 %
Tyramin n.n.
L-Phenylalanin n.n.
L-Histidin n.n.
L-Tyrosin n.n.
Tryptamin n.n.
5-Hydroxy-Indol-Essigsäure n.n.
Serotonin..... n.n.

Weitere Produkte für den Nachweis von Histamin

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) (Art. Nr. 1605)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Histamin (R1061) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Histamin in Weißwein, Rotwein, Sekt, Milch, Käse, frischem Fisch, Dosenfisch und Fischmehl. Es ist davon auszugehen, dass der Test auch für die Analyse weiterer Lebensmittel geeignet ist; dies ist vom Anwender zu überprüfen.

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. Grundlage des kompetitiven ELISA ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Histamin beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Proben und anti-Histamin-Antikörper. Freies, acyliertes Histamin und immobilisiertes Histamin konkurrieren um die Histamin-Antikörper-Bindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nach einem Waschschrift werden Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Konjugat) zugegeben, die an die gebundenen Antikörper-Histamin-Komplexe binden. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Das an die Antikörper gebundene Konjugat wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Histamin -Konzentration in der Probe.

Das Ergebnis wird in ng/ml bzw. µg/kg (ppb) Histamin angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Konzentration	Inhalt
Reagenzien für Probenacylierung				
Acylation plate Acylierungsplatte (unbeschichtet)	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Acylation tubes Acylierungsröhrchen	-	gebrauchsfertig		96 Stück (Plastik)
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 ng/ml	4 ml
Standard 2 Standard 2	hellgelb	gebrauchsfertig	0,5 ng/ml	4 ml
Standard 3 Standard 3	hellrot	gebrauchsfertig	1,5 ng/ml	4 ml
Standard 4 Standard 4	schwarz	gebrauchsfertig	5,0 ng/ml	4 ml
Standard 5 Standard 5	grau	gebrauchsfertig	15,0 ng/ml	4 ml
Standard 6 Standard 6	schwarz	gebrauchsfertig	50,0 ng/ml	4 ml
Control 1 Kontrolle 1	gelbgrün	gebrauchsfertig	siehe Flaschenetikett	4 ml
Control 2 Kontrolle 2	dunkelrot	gebrauchsfertig	siehe Flaschenetikett	4 ml
Acylation reagent Acylierungsreagenz	grün	gebrauchsfertig		3 ml
Acylation buffer Acylierungspuffer	braun	gebrauchsfertig, rot gefärbt		22 ml
Reagenzien für Enzymimmunoassay				
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Wash buffer Waschpuffer	rosa	Konzentrat	50x	20 ml
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		12 ml
Anti-histamin Antibody Antikörper	blau	gebrauchsfertig		12 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen	schwarz	gebrauchsfertig		12 ml
Stop solution Stopp-Lösung	grau	gebrauchsfertig		12 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Laborhandschuhe
- Waage
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (Plastik)
- Schüttler/Rotator
- Messpipetten
- Messzylinder
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Zum Verkürzen der Inkubationszeit: Mikrotiterplatte (MTP)-Schüttler (Schüttelamplitude 3mm, ca. 600 rpm)
- Gegebenenfalls: 8 Kanalpipette für 100 µl
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996FF)

5.2. Reagenzien

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

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Die Wells der Platten dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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

Das Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

- Eine bläuliche Färbung des Substrats/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten.
- Eine Extinktion kleiner 0,9 ($E_{450\text{ nm}} < 0,9$) für Standard 1.

9. Probenvorbereitung und -extraktion

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Unsaubere Laborausrüstung kann zu einer Kontamination im Test führen. Es wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung nach jeder Probe gründlich zu reinigen,
- Probenaufarbeitung und Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen,

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

Für die Probenvorbereitung nur Plastik-Röhrchen verwenden!!!

9.1. Sekt, Weißwein, Rotwein

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

9.2. Milch

- 4 ml Milch zentrifugieren: 10 min / 3.000 x g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 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

9.3. 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 / 2.500 x g bei Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Fettschicht entfernen oder durchstoßen
- 1 ml Überstand mit 9 ml dest. 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

9.4. Fischmehl

- 1 g Fischmehl mit 200 ml dest. Wasser versetzen und 15 min mischen
- Aliquot zentrifugieren: 5 min / 2.500 x 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

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 50fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:50 (1+49) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 10 ml Pufferkonzentrat + 490 ml dest. Wasser). Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von ca. 4 Wochen bei 2 - 8 °C.

Das **Acylierungsreagenz** liegt gebrauchsfertig vor und 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.

10.2. Testdurchführung der Acylierung

Vorsichtig pipettieren und Spritzer vermeiden.

1. Alle Standards, Kontrollen und Proben sollten in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Die Positionen der Standards und der Proben in der Acylierungsplatte 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.

10.3. Testdurchführung des ELISA

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

Es wird empfohlen den Antikörper, das Konjugat, Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren um eine Zeitverzögerung über die Platte zu 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 als Doppelbestimmung 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 verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen.

5. Je 100 µl Konjugat 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 verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen.
7. Je 100 Substrat/Chromogen 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-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)**, erhältlich.

Für die Auswertung ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Die Kriterien sowie der Verlauf der Standardkurve können dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Die der Extinktion entsprechende Histamin-Konzentration 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
9.1.	Rotwein, Weißwein, Sekt	500
9.2.	Milch	200
9.3.	Käse, frischer Fisch, Dosenfisch	5.000
9.4.	Fischmehl	200.000

12. Grenzen der Methode

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis. Zuverlässige Messergebnisse, die im üblichen Schwankungsbereich der Methode liegen, sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal +/- 1 % gegeben.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{nm}}$) < 0,4 können weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Histamin-Konzentration berücksichtigt werden.

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmittel nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Warengruppen validiert werden. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven / erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

13. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten wird empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen) zu befolgen.
- Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. Es ist aber zu beachten, dass sich hierdurch das Risiko erhöht, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen.
- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorspülen.
- Zur Qualitätskontrolle sollten Testkontrollen mitgeführt werden. Hierfür sind die im Kit enthaltenen Kontrollen zu verwenden.

- Die Kontrollen sollten mit einer maximalen Abweichung von +/- 30 % gemessen werden (andernfalls Test wiederholen).
- Den Enzymimmunoassay bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) durchführen.




Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2010-06-14	Version 1
2020-08-28	Version 2 Vorgenommene Änderung: 4. Packungsinhalt Generelle sprachliche Überarbeitung

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM)
	Hersteller + Adresse

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

Brief information

RIDASCREEN® Histamine (Art. No. R1601) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of histamine in foodstuffs validated for the method (see 1. Intended use).

All reagents required for the enzyme immunoassay, 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: different depending on the sample (see 9.)

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

Limit of detection: 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.

Related products for histamine determination

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) (Art. No. 1601)

1. Intended use

RIDASCREEN® Histamin (Art. No. R1601) 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. It can be assumed that the test is also suitable for the analysis of other foodstuffs; this must be checked by the user.

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. The competitive ELISA is based on an antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with histamine. Standards or samples and anti-histamine antibodies are added. Free acylated histamine and bound histamine compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). 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.

The results is expressed in ng/ml or µg/kg (ppb) histamine.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format	Concentration	Volume
Reagents for sample acylation				
Acylation plate	-	ready to use		96 wells
Acylation tubes	-	ready to use		96 tubes (plastic)
Standard 1	white	ready to use	0 ng/ml	4 ml
Standard 2	light yellow	ready to use	0.5 ng/ml	4 ml
Standard 3	light red	ready to use	1.5 ng/ml	4 ml
Standard 4	black	ready to use	5.0 ng/ml	4 ml
Standard 5	grey	ready to use	15.0 ng/ml	4 ml
Standard 6	black	ready to use	50.0 ng/ml	4 ml
Control 1	yellow green	ready to use	see bottle label	4 ml
Control 2	dark red	ready to use	see bottle label	4 ml
Acylation reagent	green	ready to use		3 ml
Acylation buffer	brown	ready to use, red-colored		22 ml
Reagents for the enzyme immunoassay				
Microtiter plate	-	ready to use		96 wells
Wash buffer	rose	concentrate	50x	20 ml
Conjugate	red	ready to use		12 ml
Anti-histamine Antibody	blue	ready to use		12 ml
Substrate/Chromogen	black	ready to use		12 ml
Stop solution	grey	ready to use		12 ml

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Gloves
- Scale
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge + centrifugal vials (plastic)
- Shaker/rotator
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- To shorten incubation time: microtiter plate (MTP) shaker (shaking amplitude 3 mm, approx. 600 rpm)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 µl
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996FF)

5.2. Reagents

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

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction 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 (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

Do not reuse wells of the plates. Use separate pipet tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

Ensure the proper and responsible disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

7. Storage instructions

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

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

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 is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Any bluish coloration of the substrate/chromogen prior to test implementation.
- A value of less than 0.9 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.9$) for standard 1.

9. Preparation and extraction of samples

Before starting and during the assay wear gloves. Impure laboratory equipment may lead to contamination of the assay. Hence, it is recommended to take the following precautionary measures:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation,
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the assay procedure,

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

For sample preparation use only plastic vials!!!

9.1. Sparkling wine, white wine, red wine

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

9.2. Milk

- centrifuge 4 ml milk for 10 min / 3,000 x g at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- 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

9.3. 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 / 2,500 x 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 dist. water
- apply 100 µl per acylation tube or per well in the acylation plate

9.4. Fish meal

- mix 1 g of fish meal with 200 ml of dist. water and stir for 15 min
- centrifuge aliquot: 5 min / 2,500 x g at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute 200 µl of the supernatant with 200 ml of dist. water
- apply 100 µl per acylation tube or per well in the acylation plate

10. Test implementation

10.1. 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 dist. 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. 4 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.

10.2. Test procedure for the acylation

Pipette carefully and avoid splashes.

1. All standards, controls and samples should be run in duplicate. Record standard and sample positions on the acylation plate.
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.

10.3. Test procedure for ELISA

Pipette carefully and avoid splashes. Careful washing is very important. Avoid drying of the wells between the steps.

It is recommended to pipette the antibody, conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

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 10.1.) 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 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
7. Add 100 µl of substrate/chromogen 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.

11. Results

A special software, the **RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF)**, is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

For the evaluation it must be clarified, that all quality criteria are fulfilled for the current test run. The criteria as well as the course of the standard curve can be taken from the attached certificate of analysis.

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
9.1.	red wine, white wine, sparkling wine	500
9.2.	milk	200
9.3.	cheese, fresh and canned fish	5,000
9.4.	fish meal	200,000

12. Limits of the method

An incorrect weight of the sample to be analysed has an influence on the measurement results. A sufficient accuracy is given with a fluctuation of max. +/- 1 %.

A further dilution and new detection of samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{nm}}$) > 0.4. In case of a further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the histamine concentration.

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product groups could be validated due to the large number of foods. When analysing a non-validated matrix, it is recommended to verify the results obtained by means of spike experiments.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive / increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spike experiments.

Detection and determination limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

13. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- Follow the general quality assurance requirements for laboratories (e.g. performing duplicate determinations).
- Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. This has no influence on the function of the test kit. However, it should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors).
- Rinse pipette tips with standard or sample extract before pipetting.
- Test controls should be carried along for quality control. The controls contained in the kit should be used for this purpose.
- The controls should be measured with a maximum deviation of +/- 30 % (otherwise repeat the assay).
- The optimal temperature for using the assay is at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Further product information and applications, please contact your local distributor or R-Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2010-06-14	Version 1
2020-08-28	Version 2 Applied changes: 4. Reagents provided General linguistic revision

Explanation of symbols

- General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

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.

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:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321