

HISTAMARINE ENZYME IMMUNOASSAY KIT IM2369

The “Histamarine” enzyme immunoassay kit is intended for the quantitative determination of histamine concentrations in fresh, frozen or canned fish by fish processors or quality control laboratories.

It has been shown by the AOAC Research Institute-independent laboratory evaluation that the Histamarine test kit detects the presence of histamine in tuna, canned tuna and mahi-mahi.

The intended user should be familiar with enzyme immunoassays.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Histamine contained in a fish sample is determined by use of high affinity specific monoclonal antibodies coated to the wells in a microtiter plate. The amount of histamine bound to antibodies is measured by use of enzyme conjugate which catalyzes a color change in the plate wells. The intensity of color is inversely proportional to the concentration of histamine in the sample. The concentration is calculated by use of a calibration curve obtained with calibrators supplied with the kit.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision balance, blender, microtiter plate reader (405-414 nm).

Variable volume precision micropipets (20 µL, 200 µL, 1000 µL), 25 mL and 1 L graduate cylinders.

Plastic tubes and distilled water.

REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Let the components of the kit **equilibrate** to room temperature before use.

All reagents in the unopened kit are stable at 2-8 °C until the expiration date.

Reagent	Description	Reagent preparation	Storage after use*	Precautions
Plate	96 wells	ready-to-use	store at 2-8 °C in self-lock bag	
Calibrators	5 x 1 mL	ready-to-use	store at 2-8 °C	DANGER H316 H360 
Acylation reagent	2 vials lyophilized	dissolve with DMSO (volume on label)	store at -20 °C	Homogenize prior use.
DMSO	2 x 3 mL	ready-to-use	store at 2-8 °C, melt at room temperature	WARNING H227 H315 H319 H335 
Acylation buffer	4 x 5 mL	ready-to-use	store at 2-8 °C	DANGER H360 
Conjugate	2 vials lyophilized	dissolve with d.w.** (volume on label) Once dissolved, pour both vials into Vial for conjugate and mix.	See Vial for conjugate	When reconstituted wait 20 min before mixing. DANGER H316 H360 
Wash solution	1 x 50 mL	dilute with 950 mL of d.w.**	store 1 month at 2-8 °C (beyond at -20 °C)	DANGER H360 

Reagent	Description	Reagent preparation	Storage after use*	Precautions
Substrate buffer	1 x 30 mL	ready-to-use	store at 2-8 °C	DANGER H316 H318 H373 
Substrate	2 tablets of pNPP	dissolve 1 tablet in 15 mL of substrate buffer	store 24 h at 2-8 °C (beyond at -20 °C)	Handle with forceps. 
Stop solution	1 x 6 mL of NaOH	ready-to-use	store at 2-8 °C	DANGER H314 
Vial for conjugate	1 vial	Mix 2 vials of reconstituted conjugate	store 1 week at 2-8 °C (beyond at -20 °C)	DANGER H316 H360 

* until the expiration date

** distilled water

Note : Expiry dates printed on component vial labels apply to the long-term storage by manufacturer only, prior to assembling of the kit. Do not take into account.

ASSAY PROCEDURE

Conduct fish sampling per local regulatory requirements.

Extraction	Samples	Immunoassay	Results
<p>Weigh precisely the fish sample (between 1 and 10 grams).</p> <p>Crush to homogeneity in 8 mL of water per gram of fish in a blender.</p> <p>Centrifuge (10,000g 5 min) or filter (paper filter) or decant (carefully collect supernatant).</p>	<p>In plastic tubes containing 180 µL of acylation buffer dispense 20 µL of extraction supernatant.</p> <p>Add 50 µL of acylation reagent, mix.</p> <p>At this step, samples may be stored 48 h at 2-8 °C.</p>	<p>To plate wells add 50 µL of sample or of ready to use calibrator.</p> <p>Add 200 µL of conjugate.</p> <p>Incubate 30 min at 18-25 °C.</p> <p>Wash wells carefully.</p>	<p>To plate wells add 200 µL of substrate and incubate 30 min at 18-25 °C.</p> <p>Add 50 µL of stop solution.</p> <p>Read plate at 405-414 nm.</p>

RESULTS

Results are obtained by interpolation from calibration curve.

Calibrator	Histamine (μM)	Absorbance	B/B0 (%)
1	0.1	1.754	100
2	1.0	0.907	47.7
3	5.0	0.384	15.4
4	11.0	0.275	8.7
5	50.0	0.165	1.9

Example of calibration curve, not to be used in calculation.

Using the absorbance of the 5 calibrators provided with the kit, draw a calibration curve on semi-log paper (or use appropriate software), plotting on the horizontal axis (log scale) the histamine concentration of the 5 calibrators and on the vertical axis (linear scale) the corresponding absorbance value obtained for each calibrator.

When the points have been plotted for each histamine calibrator, connect points resulting in a calibration curve. An example of how the curve should appear is presented in the table above.

Using the calibration curve, locate absorbance on vertical axis and read off corresponding histamine concentrations on horizontal axis.

A concentration of 1 μM read on the horizontal axis corresponds to a histamine concentration of 10 ppm (10 mg/kg) in the original tissue sample. This correspondency takes into account dilutions performed during sample preparation.

PERFORMANCE

The sensitivity, defined as the lowest concentration of acylated histamine significantly different from zero with a probability of 95 %, is 0.06 μM (0.6 ppm).

At the 1 μM concentration, 1-methyl histamine, 3-methyl histamine, putrescine and histidine do not show cross-reactivity higher than 0.05 % in the assay.

Recovery experiments performed on fish samples gave an average recovery of 101.0 %.

Intra-assay

Samples were assayed 25 times in the same series. The coefficients of variation were found below or equal to 13.4 %.

Inter-assay

Samples were assayed in duplicate in 10 different series. The coefficients of variation were found below or equal to 19.4 %.

TECHNICAL ASSISTANCE

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address: imunochem@beckman.com.

For the first test run please refer to our detailed Instructions (upon request)

HISTAMARINE

TROUSSE IMMUNOENZYMATIQUE Réf. IM2369

La trousse de dosage immunoenzymatique "Histamarine" permet aux industriels et laboratoires de contrôle de déterminer le taux d'histamine présent dans le poisson frais, congelé ou en conserve. Des connaissances en immunoanalyse sont souhaitables pour une utilisation optimale de la trousse.

La trousse a été évaluée par un laboratoire indépendant sur du thon frais, en boîte et de la dorade coryphène lors de la certification par l'AOAC Research Institute.

PRINCIPE DU DOSAGE

L'histamine contenue dans les échantillons de poisson est déterminée à l'aide d'anticorps monoclonaux de haute affinité, fixés à la paroi des puits de la plaque de microtitration. La quantité d'histamine liée aux anticorps est mesurée à l'aide de conjugué enzymatique catalysant une réaction colorée dans la plaque. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration d'histamine présente dans l'échantillon, calculée à partir d'une gamme étalon réalisée avec les calibrateurs fournis dans la trousse.

MATERIELS ET REACTIFS NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Balance de précision, broyeur, lecteur de microplaque (405-414 nm).

Micropipettes de précision à volume variable (20 µL, 200 µL, 1000 µL), éprouvettes graduées de 25 mL et 1 L.

Tubes en plastique et eau distillée (E.D.).

REACTIFS FOURNIS

Laisser les réactifs s'**équilibrer** à la température de la pièce avant usage.

Les réactifs non ouverts sont stables à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration.

Réactifs	Description	Préparation	Conservation*	Précautions
Plaque	96 puits	prête à l'emploi	à 2-8 °C dans le sachet fourni	
Calibrateurs	5 x 1 mL	prêt à l'emploi	à 2-8 °C	DANGER H316 H360 
Réactif d'acylation	2 flacons (lyophilisé)	reprendre en DMSO (volume sur l'étiquette)	à -20 °C	Homogénéiser avant usage
DMSO	2 x 3 mL	prêt à l'emploi	solide à 2-8 °C, laisser fondre à 18-22 °C	AVERTISSEMENT H227 H315 H319 H335 
Tampon d'acylation	4 x 5 mL	prêt à l'emploi	à 2-8 °C	DANGER H360 
Conjugué	1 flacon (lyophilisé)	reprendre en e.d.** (volume sur l'étiquette)	1 semaine à 2-8 °C (-20 °C au delà)	Après reprise, ne pas agiter avant 20 min DANGER H316 H360 
Solution de lavage	1 x 50 mL	diluer avec 950 mL d'e.d.	1 mois à 2-8 °C (-20 °C au delà)	DANGER H360 
Tampon substrat	1 x 30 mL	prêt à l'emploi	à 2-8 °C	DANGER H316 H318 H373  

Substrat	2 tablettes (pNPP)	dissoudre 1 tablette par 15 mL de tampon substrat	24 h à 2-8 °C (-20 °C au delà)	Prélever à la pince.
Solution d'arrêt	1 x 6 mL (NaOH)	prête à l'emploi	à 2-8 °C	DANGER H314 
Flacon de conjugué	1 flacon	Mélanger 2 flacons de conjugué reconstitué	1 semaine à 2-8 °C (-20 °C au delà)	DANGER H316 H360 

* jusqu'à la date d'expiration ** eau distillée

Remarque: Les dates d'expiration imprimées sur les étiquettes des flacons, concernent uniquement le stockage à long terme des réactifs par le fabricant, avant l'assemblage de la trousse. Ne pas en tenir compte.

PROTOCOLE

Se conformer aux réglementations d'échantillonnage locales.

Extraction	Echantillons	Immunoessai	Résultats
Peser précisément l'échantillon de poisson (de 1 à 10 grammes). Broyer jusqu'à homogénéité dans un mixeur avec 8 mL d'e.d. par gramme de poisson. Centrifuger (10,000 g 5 min) ou filtrer (sur papier filtre) ou décanter (prélever le surnageant avec précaution).	Dans des tubes plastique contenant 180 µL de tampon d'acylation, ajouter 20 µL de surnageant d'extraction. Ajouter 50 µL de réactif d'acylation, mélanger. L'échantillon à ce stade peut être conservé 48 h à 2-8 °C.	Ajouter aux puits de la plaque 50 µL d'échantillon ou de calibrateur prêt à l'emploi, puis 200 µL de conjugué. Incuber 30 min à 18-25 °C. Laver soigneusement.	Ajouter 200 µL de substrat et incuber 30 min à 18-25 °C. Ajouter 50 µL de solution d'arrêt. Lire la plaque à 405-414 nm.

RESULTATS

Les résultats sont déduits de la courbe calibrateur par interpolation.

Calibrateur	Histamarine (µM)	Absorbance	B/B0 (%)
1	0.1	1.754	100
2	1.0	0.907	47.7
3	5.0	0.384	15.4
4	11.0	0.275	8.7
5	50.0	0.165	1.9

Exemple de courbe calibrateur, ne pas utiliser pour les calculs.

En utilisant l'absorbance obtenue avec les 5 calibrateurs du kit :

Tracer la courbe sur du papier semi-logarithmique en portant (ou utiliser un logiciel approprié)

- sur l'axe horizontal (échelle logarithmique) : les concentrations en histamine des calibrateurs.
- sur l'axe vertical (échelle linéaire) : les valeurs des absorbances lues pour chaque calibrateur.

Lorsque les points ont été reportés pour chaque calibrateur, tracer la courbe reliant chaque point pour obtenir une courbe calibrateur, dont un exemple est montré ci-dessus.

Utiliser la courbe calibrateur pour déterminer la concentration en histamine de chaque échantillon. Repérer l'absorbance sur l'axe des ordonnées ; le point correspondant de la courbe calibrateur, permet de déduire directement la concentration en histamine par lecture sur l'axe des abscisses.

Une concentration de 1 µM lue sur l'axe des abscisses correspond à une concentration en histamine de 10 ppm (10 mg/kg) dans l'échantillon de poisson d'origine. Cette correspondance tient compte des dilutions réalisées lors de la préparation de l'échantillon.

PERFORMANCES

La sensibilité, définie comme la plus petite concentration d'histamine acylée significativement différente du zéro avec une probabilité de 95 % est de 0,06 μ M (0,6 ppm).

Les 1-méthyl histamine, 3-méthyl histamine, putréscine, histidine présentent à la concentration de 1 μ M une réactivité croisée dans le dosage inférieure à 0,05 %.

Les tests de surcharge réalisés sur les échantillons de poisson montrent une récupération moyenne de 101,0 %.

Intra-essai

Des échantillons été dosés 25 fois dans une même série. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 13,4 %.

Inter-essais

Des échantillons été dosés en doublet dans 10 séries différentes. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 19,4 %.

ASSISTANCE TECHNIQUE

En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter : e-mail imunochem@beckman.com

Lors du premier dosage, nous recommandons de se référer au protocole détaillé (disponible sur demande).

