



BIO-SHIELD HISTAMINE

TEST ELISA | Análisis in vitro

para la determinación cuantitativa de histamina en muestras de pescado crudo fresco o descongelado, pescado en conserva y harina de pescado

ProGnosis Biotech S.A. está certificada por TÜV Hel- las (TÜV NORD) según la norma ISO 9001:2015.

Utilice sólo la versión actual de la hoja de datos del producto que se incluye en el kit.

Bio-Shield Histamine, B6048/B6096/B60576, es un método de inmunoensayo que determina histamina en pescado fresco, pescado enlatado, pescado congelado, harina de pescado, queso y Muestras de vino. El kit ELISA contiene todos los reactivos necesarios para el método de inmunoensayo. La prueba ELISA es adecuada para 48/96/576 determinaciones (se incluyen los estándares). Se requiere un espectrofotómetro para placas ELISA microtiter.

Matrices:

Pescado: Fresco o descongelado: atún, sardinas, anchoa, bonito, caballa, bacalao, marlín, pez azul, calamar, llampuga. Conservas: atún, sardinas, anchoa, bonito, caballa, bacalao, marlín, pez azul, llampuga.

Productos de pescado: Harina de pescado, Harina de salmon, harina de calamar.

Muestras de vino: Vino tinto, Vino blanco, Vino rosado, Vino espumoso

Muestras de queso: (Quesos frescos y tiernos, quesos semicurados, quesos curados, quesos azules)

- Preparación de la muestra: extracción y dilución
- Tiempo de análisis (tiempo de incubación después de la preparación de las Muestras y los reactivos): 20 min
- Rango de la curva estándar: 0 - 200 ppm
- Vida útil: 12 months
- Almacenamiento: 2-8°C

Especificaciones:

- El LD del método es de 2.0 ppm..

- El LC del método es de 2.5 ppm.

- La recuperación de las extracciones a las matrices adicionales fue del 93.4% (CV = 9.6%).

- IC50 = 15 - 45 ppm.

- Cada duplicado de los estándares tiene un CV medio ≤6%.

- Reactividad cruzada

1. Descripción

Bio-Shield Histamine es una prueba ELISA para la detección de histamina en muestras de pescado crudo, fresco o descongelado, y pescado enlatado.

2. Información general

La histamina (HA) es una amina primaria heterocíclica y es el subproducto de la descarboxilación del aminoácido L-histidina por la enzima histidina descarboxilasa. Esta última es producida por ciertas bacterias que pueden encontrarse en los alimentos marinos. Las especies de peces más comunes que tienden a contener HA pertenecen a la familia de los Scombridae (atún, dorado, marlín, pez azul, sardina, anchoa, bonito, arenque y caballa). Después de la recolección de los peces, el crecimiento bacteriano da lugar a un aumento de las cantidades de histidina descarboxilasa, lo que a su vez induce la producción de HA. Los altos niveles de HA pueden causar envenenamiento escorbomide en los seres humanos, que consiste en varios síntomas, como erupción, náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión, palpitaciones cardíacas y debilidad muscular. La mayoría de los organismos gubernamentales de control en todo el mundo tienen reglamentos relativos a la cantidad de HA permitida en el pescado y los productos de pescado. Los niveles de HA en el pescado de buena calidad suelen estar por debajo de las 10 ppm. Los valores de HA entre 50 y 200 ppm son aceptables dependiendo de la especie de pescado y del país. La determinación precisa y rápida de la presencia de HA en los productos básicos es de suma importancia.

3. Principio del Método

La prueba cuantitativa se basa en los principios del ensayo inmunoenzimático. Los pocillos de las tiras microtíter están recubiertos con anticuerpos específicos de HA. La HA se extrae de las muestras con agua destilada o desionizada. Los estándares o muestras de HA y el conjugado HA-HRP (solución de detección) se añaden a los pocillos recubiertos. El conjugado HA-HRP se une a los sitios de unión de los anticuerpos recubiertos que no están ya ocupados por la HA de los estándares o muestras. Cualquier conjugado HA-HRP no ligado de solución de detección se elimina en un paso de lavado. Se añade un sustrato de cromógeno a los pocillos, lo que resulta en el desarrollo progresivo de un complejo de color azul con el anticuerpo de detección. El desarrollo del color se detiene entonces con la adición de ácido que hace que el producto final resultante se vuelva amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm y la intensidad del complejo de color producido es indirectamente proporcional a la concentración de HA presente en las muestras y patrones.

4. Reactivos suministrados

El kit ELISA Bio-Shield Histamine contiene suficientes reactivos y materiales para 48/96/576 mediciones (incluidos los estándares).

Reactivos (Almacenar a 2-8°C)	Cant. para 48 pocillos	Cant. para 96 pocillos	Cant. para 576 pocillos	Formato	Color tapa
Placa de tiras de un solo corte	48 pocillos	96 pocillos	6 x 96 pocillos	Listo para usar (precubierto)	-
Pocillos de dilución	48 pocillos	96 pocillos	6 x 96 pocillos	Listo para usar (color verde)	-
Film sellador	2 hojas	2 hojas	12 hojas	Listo para usar	-
Estándares 1-6 (0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 ppm de Histamina en solución acuosa) (corresponden a 0, 5, 25, 50, 100 y 200 ppm)	6 viales de plástico (1.5 ml)	6 viales de plástico (1.5 ml)	3 juegos de 6 viales de plástico (cada una 3 ml)	Listo para usar	Marrón
Sol. de detección Histamina	1 vial plástico (7,5ml)	1 vial plástico (15ml)	6 viales de plástico (15ml)	Listo para usar	Verde
Buffer de dilución Histamina	1 vial de plástico (60ml)	1 vial de plástico (60ml)	9 viales de plástico (60ml)	Listo para usar	Rojo
Buffer de lavado	1 vial de plástico (50ml)	1 vial de plástico (50ml)	3 viales de plástico (50ml)	20X Concentrado (diluir en agua destilada)	Blanco
Sustrato TMB	1 vial de plástico (7,5ml)	1 vial de plástico (15ml)	2 viales de plástico (45ml)	Listo para usar	Marrón
Solución STOP	1 vial de plástico (7,5ml)	1 vial de plástico (15ml)	2 viales de plástico (45ml)	Listo para usar	Amarillo

X-compuesto activo	Reactividad cruzada (%)
Histamine	100
3-methylhistamine	<0.01
Tyramine	<0.01
Tryptamine	<0.01
Putrescine	<0.01
Histidine	<0.01
Cadaverine	<0.01
Spermine	<0.01
Trimethylamine	<0.01
Serotonin	<0.01
L-tryptophan	<0.01
L-phenylalanine	<0.01
L-histidine	<0.01
L-tyrosine	<0.01

5. Materiales necesarios pero no suministrados

- Un molinillo con capacidad suficiente para convertir la muestra en partículas de café instantáneo fino
- Balanza con capacidad de medición de 0 - 50g y probeta graduada - 100mL
- Metanol (10.50 mL de grado reactivo por muestra) y agua destilada o desionizada
- Papel de filtro Whatman #1 o equivalente, embudo de filtro y frascos variados de laboratorio de plásti co o vidrio 50 - 125ml
- Mezclador de vórtice y lector de placas microtíter con filtro de 450 nm
- Micropipetas monocanal regulables de 100, 200 y 1000 µl con puntas desechables (una pipeta repetitiva de 100µl es adecuada) para los pasos de TMB y solución STOP.
- Micropipeta multicanal de 50 - 300 µl con puntas y depósitos desechables

6. Instrucciones de almacenamiento

Almacene los reactivos del kit entre 2 y 8°C (35 - 46°F). No congele ningún componente suministrado. Vuelva a guardar inmediatamente las tiras sin usar de la placa microtíter en la bolsa junto **con la bolsa de desecante** suministrada y almacénelas a 2 - 8°C. Después de su uso, los reactivos restantes deben ser devueltos a la cámara frigorífica (2 - 8°C). La caducidad del kit y de los reactivos respectivamente se indica en las etiquetas y no se acepta ninguna garantía de calidad después de la fecha de caducidad. La caducidad de los componentes del kit sólo puede garantizarse si los componentes se almacenan adecuadamente, así como si el reactivo no se contamina con la primera manipulación, en caso de uso repetido de un componente. Debido al sustrato incoloro de TMB y a la sensibilidad a la luz, evite la exposición a la luz directa. No intercambie reactivos individuales entre kits de diferentes números de lote.

7. Seguridad y precauciones de uso

- Evite cualquier contacto de la piel con los estándares HA, la Solución STOP (8% H₃PO₄) y el TMB (tóxico). Use guantes. En caso de contacto, lávese bien con agua.

- Todos los reactivos deben calentarse a temperatura ambiente antes de su uso y cubrirse cuando no se utilicen. **Utilice una punta de pipeta de plástico desechable limpia para cada reactivo, para evitar la contaminación cruzada. Cuando pipetee reactivos, mantenga un orden consistente de adición de pocillo a pocillo. Esto asegurará tiempos de incubación iguales para todos los pocillos.**

- Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar el tampón de lavado y todo el líquido de lavado residual debe ser eliminado de los pocillos mediante una aspiración eficiente o por decantación, seguida de golpear la placa con fuerza sobre papel absorbente. Nunca introduzca papel absorbente en el pozo. Lea la absorbancia dentro de los 60 minutos siguientes a la finalización del ensayo.

8. Signos de reactivos en mal estado

- La coloración azulada del sustrato de cromógeno antes de la prueba ELISA.

- Un valor de menos de 0,7 unidades de absorbancia (ABS 450nm) para el Estándar Cero (St1).

9. Preparación de muestras y reactivos

9.1 Preparación de reactivos

Diluya el concentrado de la solución 20X con agua destilada para obtener una solución de trabajo 1X.

Preparación del tampón de lavado 1X: En caso de que aparezcan cristales en el tampón de lavado, es necesario calentarlos desintegrándolos suavemente (con las manos). Vierta todo el contenido de la solución concentrada (50ml) en una probeta graduada limpia de 1000ml, enjuague el frasco con agua destilada o desionizada y vierta de nuevo el contenido en la probeta y llene hasta un volumen final de 1000ml con agua destilada o desionizada. Mezclar suavemente para evitar la formación de espuma, transfiriendo la solución final de la probeta a una botella limpia y repetirlo dos veces. La botella limpia con la solución de trabajo 1X Wash Buffer puede dejarse fuera del refrigerador durante el procedimiento del método y posteriormente almacenarse a 2 - 8°C durante un mes.

9.2 Muestras de pescado crudo fresco o descongelado

A. Limpiar y eviscerar tres pescados.

B. Cortar tres trozos transversales de 2,5 cm (1 pulgada) de espesor, desde la parte posterior de la aleta pectoral, a medio camino de la ventral y uno posterior a ésta.

C. Deshuesar las secciones y mezclar o triturar las muestras combinadas hasta que sean homogéneas. Almacene las muestras a 2-8°C (35-46°F) hasta que sean analizadas.

D. Añada 10 g (o 5 g) de la mezcla homogénea a un frasco de extracción desechable limpio que contenga 190 mL (o 95 mL) de agua destilada o desionizada.

E. Cierre la botella y mezcle utilizando un rodillo durante 5 minutos (o un vórtex durante 1 minuto).

F. Deje que el sólido se asiente en el fondo de la botella durante unos 30 segundos, filtre 5 - 10 mL del extracto a través de un papel de filtro Whatman #1 (o equivalente), recoja el filtrado y diluya 10 veces con el tampón de dilución (ejemplo: 50 µL filtrado + 450 µL tampón de dilución o 100µL + 900µL).

G. La muestra extraída debería tener un valor de pH de 6.2—7.5. Si el pH es menor de 6.2 o mayor de 7.5 debe ser neutralizado usando Na OH o HCl, respectivamente.

H. Utilizar 150µl (o 100µl) de cada filtrado diluido final directamente en el inmunoensayo.

I. En caso de que la muestra contenga más de 200 ppm de histamina, se sugiere una dilución adicional con agua desionizada como la que aparece en la tabla siguiente. Multiplicar el resultado final de histamina en ppm por 2.

Volumen filtrado	Volumen de agua (destilada o desionizada)	Factor de dilución	Rango de cuantificación	LC
1000µL	1000µL	2	0 - 400ppm	5ppm

9.3 Pescado en conserva

A. Ponga todo el contenido de la lata, la carne y el líquido, en una licuadora. Mezclar hasta que sea homogéneo. Almacene las muestras a 2-8°C (35-46°F) hasta que sean analizadas.

B. Añada 10 g (o 5 g) de la mezcla homogénea a una botella de extracción desechable limpia que contenga 190 mL (o 95 mL) de agua destilada o desionizada.

C. Siga el procedimiento de extracción y dilución como se describe en el paso 9.2

9.4 Harina de pescado/queso (Quesos frescos y tiernos, quesos semicurados, quesos curados, quesos azules)

A. Pesar 2 g de harina de pescado o queso homogeneizados, añadir 40 ml de agua desionizada y mezclar con un vórtex durante 1 minuto.

B. Dejar que las partículas se asienten, filtrar 5 - 10 mL del extracto a través de un papel de filtro Whatman #1 (o equivalente), recoger el filtrado y diluir 10 veces con el tampón de dilución (ejemplo: 50 µL filtrado + 450 µL tampón de dilución o 100 µL + 900 µL)

C. La muestra extraída debería tener un valor de pH de 6.2—7.5. Si el pH es menor de 6.2 o mayor de 7.5 debe ser neutralizado usando Na OH o HCl, respectivamente.

D. Utilizar 150µl (o 100µl) de cada filtrado diluido final directamente en el inmunoensayo.

NOTA: Utilice únicamente viales de plástico (por ejemplo, polipropileno, PP) para la preparación de la muestra. La HA se adsorbe en las superficies de vidrio, lo que conduce a una reducción de las recuperaciones.

9.5 Muestras de vino

A. La muestra extraída debe tener un valor de pH de 6.2 - 7.5. Si el pH es inferior a 6,2 o superior a 7,5, debe neutralizarse utilizando NaOH o HCl, respectivamente.

B. Diluya la muestra de vino neutralizada 10 veces con el tampón de dilución (ejemplo: 50 µL de filtrado + 450 µL de tampón de dilución o 100µL + 900µL).

C. Utilice 150µl (o 100µl) de cada filtrado diluido final directamente en el inmunoensayo.

D. Divida el resultado final de Histamina (ppm) por un factor de 20.

E. El rango del método pasa a ser 0 - 10 ppm y el LOQ = 0,125 ppm.

10. Procedimiento del método

10.1 Diseño del ensayo: Determinar el número de tiras de micropocillos necesarias para analizar el número deseado de muestras, además del número apropiado de pocillos necesarios para los estándares. Teniendo en cuenta que cada muestra y cada estándar puede ser analizado en forma individual o por duplicado, crear una plantilla. **NOTA:** No utilice más de 48 pocillos (seis tiras) en un solo experiment.

PRECAUCIÓN: Utilice las posiciones de los estándares como el **ejemplo de placa** mostrado abajo (**NECESARIO**) y anote las posiciones de las muestras que se pueden poner en todos los pocillos vacíos restantes de la plantilla.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St1	St1											
B	St2	St2											
C	St3	St3											
D	St4	St4											
E	St5	St5											
F	St6	St6											
G													
H													

Ejemplo de plantilla (ejemplo para una curva estándar de 6 puntos)

10.2 Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (19 - 24°C) antes de usarlos. Retire los **estándares** (Estándar 1-6) y coloque un pocillo de dilución (verde) en un soporte de microcubetas para cada estándar y muestra que se vaya a analizar. Colocar el **número apropiado** de pocillos de Microtitulación Recubiertos de Anticuerpos en otro soporte de microcubetas. Vuelva a sellar inmediatamente las tiras no utilizadas de la placa microtíter en la bolsa junto con la bolsa de desecante suministrada. Las muestras deben guardarse en un lugar fresco.

10.3 Añada **150µl (o 100µl)** de Solución de Detección de HA a cada pocillo de dilución.

10.4 Utilizando una nueva punta de pipeta para cada uno, añada **150 µL (o 100µl)** de cada Estándar (**Estándar 1 - 6**) y la muestra preparada (ver Capítulo 9) al pocillo de dilución apropiado que contiene la solución de detección de HA. Mezclar cebando la pipeta al menos 5 veces.

10.5 Utilizando una pipeta multicanal, transferir **100 µL** del contenido de cada Microcubeta de Dilución a los correspondientes Pocillos de Microtitulación Recubiertos de Anticuerpos. Cubrir las microcubetas con la película de sellado e incubar a temperatura ambiente durante **10 min**.

10.6 Retire la película de sellado y lave la placa como se indica a continuación: Aspirar el líquido de cada pocillo en el fregadero y golpear fuertemente el soporte de las microcubetas boca abajo (cuatro veces seguidas) sobre un papel absorbente para asegurar la completa eliminación del líquido de los pocillos. Dispense **300 µL de tampón de lavado 1X** (véase 9.1) en cada pocillo con la botella de lavado o la micropipeta multicanal utilizando el depósito de reactivos adecuado y agitando la placa manualmente durante unos segundos. Repita este proceso otras tres veces (**un total de 4 veces**). **PRECAUCIÓN:** Es importante no permitir que las microcubetas se sequen entre los pasos de trabajo.

10.7 Aspirar el líquido como se ha descrito anteriormente y añadir **100 µL** por pocillo de **Sustrato TMB** (verter 1ml por cada 8 pocillos en un depósito). Cubrir las microcubetas con la película de sellado, agitando la placa manualmente durante unos segundos e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante **10 min.**

10.8 Retire la película de sellado y añada **100 µL** por pocillo de la **Solución STOP** a cada pocillo (vierta 1ml por cada 8 pocillos en un depósito). Mezcle suavemente agitando de nuevo la placa manualmente.

10.9 Medir la absorbancia a 450 nm. Lea el valor de absorbancia de cada pocillo (dentro de los 60 minutos siguientes al paso 10.8) en un espectrofotómetro usando **450 nm** como longitud de onda primaria y opcionalmente 620 nm como longitud de onda de referencia (610 nm a 650 nm es aceptable).

11. Data Analysis

• Automáticamente

Un software específico, Prognosis-Data-Reader, está disponible para su descarga gratuita (contacto: info@prognosis-biotech.com) para evaluar el kit ELISA Bio-Shield HA. La evaluación se lleva a cabo mediante una simple transferencia de valores de datos después de la medición.

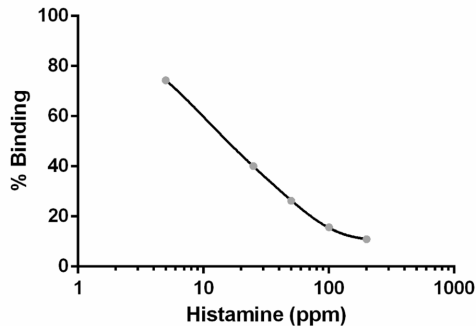
• Manualmente

Calcular los valores medios de absorbancia para cada conjunto de estándares y muestras duplicados. Lo ideal es que los duplicados estén dentro del 10% de la media. Utilice la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Abs. del estándar o muestra}}{\text{Abs. del estándar 1}} \times 100 = \% \text{ Binding}$$

El estándar 1 es igual al 100 % y los valores de absorbancia se indican en porcentajes. La concentración de HA (ppm) en cada muestra se determina extrapolando los valores de DO frente a las concentraciones de HA en las soluciones estándar, utilizando una curva estándar de decaimiento exponencial de dos fases con eje X logarítmico.

12. Ejemplo de Curva Estándar (0 - 200ppm)



13. Evaluación del desempeño

13.1 Materiales de referencia

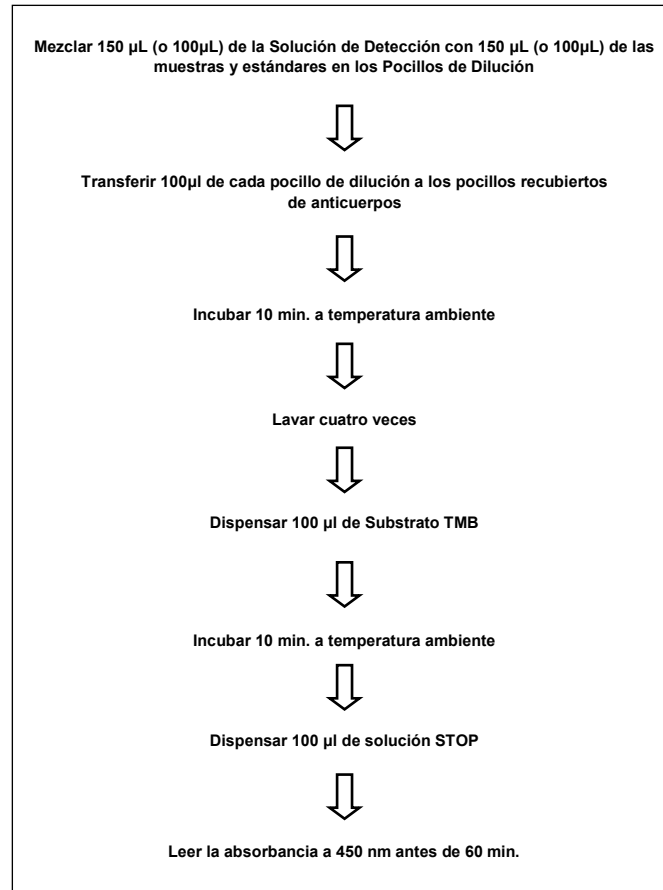
Se están utilizando varios materiales de referencia para la evaluación de cada producto de ProGnosis Biotech S.A. en el contexto del control de calidad realizado por el Departamento de Control de Calidad. Por favor, solicite un informe de validación, incluyendo los resultados, en info@prognosis-biotech.com.

13.2 Ensayos de aptitud

Todos nuestros productos participan con frecuencia en pruebas de aptitud. Para obtener más información, visite la página del producto individual en nuestro sitio web: www.prognosis-biotech.com

14. Resumen del método

Tiempo total del procedimiento (después de la preparación de las muestras y los reactivos): 20 min.



TEST ELISA | Análisis in vitro

para la determinación cuantitativa de la histamina en muestras de pescado crudo fresco o descongelado, pescado en conserva y harina de pescado

ProGnosis Biotech S.A. está certificada por TÜV Hellas (TÜV NORD) según la norma ISO 9001:2015.

Utilice sólo la versión actual de la hoja de datos del producto que se incluye en el kit.

Bio-Shield Histamine, B6048/B6096/B60576, es un método de inmunoensayo que determina histamina en pescado fresco, pescado enlatado, pescado congelado, harina de pescado, queso y Muestras de vino. El kit ELISA contiene todos los reactivos necesarios para el método de inmunoensayo. La prueba ELISA es adecuada para 48/96/576 determinaciones (se incluyen los estándares). Se requiere un espectrofotómetro para placas ELISA microtiter.

Matrices:

Pescado: Fresco o descongelado: atún, sardinas, anchoa, bonito, caballa, bacalao, marlín, pez azul, calamar, llampuga. Conservas: atún, sardinas, anchoa, bonito, caballa, bacalao, marlín, pez azul, llampuga.

Productos de pescado: Harina de pescado, Harina de salmon, harina de calamar.

Muestras de vino: Vino tinto, Vino blanco, Vino rosado, Vino espumoso

Muestras de queso: (Quesos frescos y tiernos, quesos semicurados, quesos curados, quesos azules)

- Preparación de la muestra: extracción y dilución
- Tiempo de análisis (tiempo de incubación después de la preparación de las Muestras y los reactivos): 20 min
- Rango de la curva estándar: 0 - 200 ppm
- Vida útil: 12 months
- Almacenamiento: 2-8°C



www.prognosis-biotech.com

e: info@prognosis-biotech.com

t: +30 2410 623922

f: +30 700 700 6262

Farsalon 153 | 41335 Larissa, Greece



All immune assays supplied by ProGnosis Biotech S.A., are warranted to meet or exceed our published specification when used under normal conditions in your laboratory. If the product fails during the stated period, a replacement product will be issued.

ProGnosis Biotech S.A. makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. ProGnosis Biotech S.A. shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product. This method is considered to be a screening method, before a legal action, samples detected as positives must be confirmed with a confirmation method. This product is meant to be used only For Research or Manufacturing use and by qualified technicians.