



Kit AlerTox® ELISA Histamina

Ensayo ELISA competitivo para la detección cuantitativa de histamina en productos alimenticios como el pescado y el vino

Nº de producto KIT3065 (96 pocillos)





Índice

1. Introducción.....	3
1.1 Sensibilidad y especificidad del ensayo.....	3
1.2 Fundamento del ensayo	4
2. Materiales y almacenamiento	4
2.1 Materiales suministrados	4
2.2 Condiciones de almacenamiento y estabilidad.....	4
2.3 Material necesario pero no suministrado	5
2.4 Materiales/equipos opcionales	5
3. Procedimiento de ensayo	5
3.1 Preparación de reactivos	5
3.1.1 Preparar el tampón de lavado	5
3.1.2 Preparación de la placa ELISA	5
3.1.3 Preparar la normas (Derivatización)	6
3.2 Preparación de muestras (Derivatización)	6
3.2.1 Vino	6
3.2.2 Visión general del flujo de trabajo (Vino)	6
3.2.3 Pescado	7
3.2.4 Visión general del flujo de trabajo (Pescado)	7
3.3 Procedimiento ELISA	8
3.3.1 Visión general del flujo de trabajo.....	9
4. Cálculo e interpretación de los resultados	9
5. Precauciones generales	9
6. Información adicional	10
6.1 Resumen de las especificaciones.....	10
6.2 Recuperación.....	11
6.3 No reactividad cruzada.....	11
7. Ejemplo de diseño del ensayo	11
8. Descargo de responsabilidad.....	12
9. Información de contacto	12
10. Índice de cambio	12



1. Introducción

La histamina es una amina biogénica que se forma por descarboxilación enzimática del aminoácido histidina. Esto ocurre en los mastocitos y los leucocitos basófilos unidos a la heparina. En una respuesta alérgica de tipo I, la histamina endógena de los mastocitos y los leucocitos basófilos se libera tras la unión del antígeno a la IgE asociada a la membrana, dando lugar a reacciones alérgicas típicas. Sin embargo, la histamina también puede penetrar en el cuerpo humano a través de los alimentos y bebidas ingeridos, lo que puede provocar intolerancias alimentarias pseudoalérgicas.

Las intolerancias alimentarias, causadas por un aumento de las concentraciones de histamina, se caracterizan clínicamente por erupción cutánea, diarrea, vómitos, náuseas, picor, dolor de cabeza y asma. El alcance de la reacción depende de la cantidad de histamina ingerida. Las concentraciones tóxicas de histamina pueden deberse a una manipulación inadecuada o a la interrupción de la cadena de frío. Pueden provocar la llamada reacción escombroides, que aparece tras la degradación bacteriana de alimentos ricos en proteínas, especialmente pescados de la familia Scombridae. La Food and Drug Administration estadounidense ha establecido un nivel de acción de 50 ppm para la histamina en el pescado. Según el Reglamento 2073/2005 de la UE y sus posteriores modificaciones, el límite de histamina en el pescado o los productos a base de pescado es de 100 ppm. Este límite se eleva a 200 ppm si el pescado o los productos pesqueros han sido sometidos a maduración enzimática en salmuera.

Por lo tanto, deben controlarse las concentraciones de histamina en el pescado y los productos a base de pescado. El Kit AlerTox® ELISA Histamina es un sistema de detección sensible, capaz de cuantificar rápidamente las concentraciones de histamina en pescado y vino.

Nota: Lea atentamente este manual antes de iniciar la prueba. La prueba debe ser realizada por personal debidamente formado.

1.1 Sensibilidad y especificidad del ensayo

El Kit AlerTox ELISA Histamina proporciona reactivos para el análisis cuantitativo de histamina en productos alimenticios frescos y procesados, como pescado y vino. El límite de detección (LD) está entre 0,3 - 0,7 ppm de histamina, el límite de cuantificación (LQ) es de 2,0 ppm y la detección es cuantitativa entre 2,0 y 72 ppm (véase la Sección 6.1, *Resumen de Especificaciones*, para más detalles). La reactividad cruzada con otras matrices alimentarias se muestra en la siguiente tabla:

Matriz	Porcentaje de reactividad cruzada (%)
Histamina	100
1-metilhistamina	5
N-Acetilhistamina	0,02

Ver Sección 6.2, *Recuperación* y Sección 6.3, *No reactividad cruzada*, para datos adicionales.

Importante: Este kit de histamina utiliza un ELISA competitivo para la detección. Por lo tanto, la preparación de la muestra y los protocolos ELISA difieren de los de otros kits ELISA AlerTox, que se basan en pruebas ELISA tipo sándwich.

Importante: No modifique el protocolo con respecto al tiempo, las temperaturas, el lavado de placas, los volúmenes de pipeteo, los tipos de tampones o los valores de pH de los tampones. Cualquiera de estas modificaciones del protocolo invalidará el sistema de ensayo.



1.2 Fundamento del ensayo

La prueba AlerTox ELISA Histamina se basa en el principio de un ELISA competitivo cuantitativo. La concentración de histamina es indirectamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de ensayo. He aquí un breve resumen de la prueba ELISA competitiva:

1. Se une un conjugado de histamina en la superficie de una placa de microtitulación. Añadir a los pocillos de la placa de ELISA que contienen histamina derivatizada o muestras de ensayo y un anticuerpo dirigido contra la histamina (anticuerpo primario). La histamina inmovilizada y la libre compiten por los sitios de unión del anticuerpo. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavan los pocillos con solución de lavado para eliminar el material no unido.
2. Añadir a los pocillos un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa dirigido contra el anticuerpo de histamina y, tras otra incubación de 5 minutos, se lava de nuevo la placa.
3. Añadir una solución de sustrato y se incuba durante 5 minutos, lo que produce el desarrollo de un color azul. La adición de una solución de parada inhibe el desarrollo del color, que se vuelve amarillo. El color amarillo se mide fotométricamente a 450 nm (OD_{450}).

2. Materiales y almacenamiento

2.1 Materiales suministrados

El kit contiene reactivos suficientes para 96 determinaciones (incluidos los estándares).

Artículo	Descripción	96 pocillos
1	Tiras rompibles de 8 pocillos, cada una recubierta con conjugados de histamina.	12 tiras
2	6 Estándares de Histamina AlerTox, concentraciones: 0 – 2,0 – 6,0 – 12,0 – 24,0 – 72,0 ppm.	6 x 4 mL
3	Solución de Reacción, que contiene 1,4-benzoquinona	1 x 3 mL
4	Solución Neutralizante	1 x 15 mL
5	Anticuerpo anti-histamina (anticuerpo primario, solución azul)	1 x 6 mL
6	Solución Conjugada, Anti-conejo-IgG-peroxidasa de rábano picante (HRP) (anticuerpo secundario, solución roja)	1 x 15 mL
7	Solución de Sustrato, que contiene trimetilbenceno (TMB).	1 x 15 mL
8	Solución de Parada, que contiene ácido sulfúrico (H_2SO_4).	1 x 15 mL
9	Tampón de Dilución de Muestras (solución roja)	2 x 60 mL
10	Solución de Lavado 10X	1 x 60 mL

2.2 Condiciones de almacenamiento y estabilidad

- Todos los componentes del kit deben conservarse entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) en la oscuridad. NO CONGELAR.
- Devolver todos los reactivos a entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) en la oscuridad inmediatamente después de su uso.
- La Solución de Lavado diluida (1X) puede utilizarse durante 4 semanas si se almacena a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F).

Importante: Si es necesario, redisuelva el precipitado calentando la Solución de Lavado 10X a 37 °C (99 °F) durante 15 minutos antes de la dilución. No utilice la solución si el precipitado no se redisuelve.

- Los extractos de la muestra son estables durante al menos 24 horas a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F) o durante más tiempo si se congelan.



2.3 Material necesario pero no suministrado

- Pipeta multicanal: 50–200 µL
- Puntas de pipeta estériles
- Pipetas: 10–100 µL, 100–1.000 µL
- Baño de agua, ajustable a 60 °C (140 °F)
- Recipientes de 15–100 mL para las extracciones
- Stomacher (homogeneizador), molino, mortero, batidora, etc.
- Lector de placas ELISA con filtro (450 nm) (Absorbance 96 ELISA Reader, Nº de producto MCH3005, o similar)
- Centrifugadora
- Agua bidestilada
- Mezclador vórtex
- Toallas de papel

2.4 Materiales/equipos opcionales

- Homogeneizador para la extracción de muestras
- Pipeta de repetición para minimizar la desviación del ensayo
- *Recomendado:* Un lavador de placas ELISA para reducir el tiempo de lavado y mejorar la consistencia.

3. Procedimiento de ensayo

3.1 Preparación de reactivos

Aconsejamos preparar los reactivos inmediatamente antes de su uso y preparar sólo la cantidad necesaria para el número de muestras más los 6 estándares. Se recomiendan mediciones por duplicado de cada muestra y estándar, de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y los requisitos de control de calidad.

Importante: Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F) en el momento de su uso.

3.1.1 Preparar el tampón de lavado

Diluya 1:10 la Solución de Lavado 10X con agua destilada para crear la solución 1X.

Importante: Si es necesario, redisuelva el precipitado calentando la Solución de Lavado 10X a 37 °C (99 °F) durante 15 minutos antes de diluirlo. No utilice la solución si el precipitado no se redisuelve.

Nota: Necesitará aproximadamente 1,9 mL de Solución de Lavado 1X por pocillo.

3.1.2 Preparación de la placa ELISA

Para preparar la placa ELISA, abra la bolsa de aluminio, extraiga el número de tiras necesarias para realizar el análisis (muestras más los 6 estándares, todo por duplicado) y coloque las tiras en un marco soporte.

Notas:

- Al abrir la bolsa de aluminio por primera vez, tenga cuidado de no cortar el cierre de la bolsa.
- Los pocillos no utilizados deben guardarse en la bolsa de aluminio con el agente desecante a una temperatura de entre 2 y 8 °C (36 y 46 °F). Asegúrese de que la bolsa quede bien cerrada.



3.1.3 Preparar la normas (Derivatización)

1. Transfiera 500 μL de cada estándar a tubos separados y añadir 25 μL de Solución de Reacción a cada estándar.
2. Mezclar bien e incubar durante 1 min.
3. Añadir 100 μL de Solución Neutralizante al estándar activado.
4. Mezclar bien e incubar durante 1 min.

Nota: Estos estándares ya están derivados y listos para el ensayo ELISA.

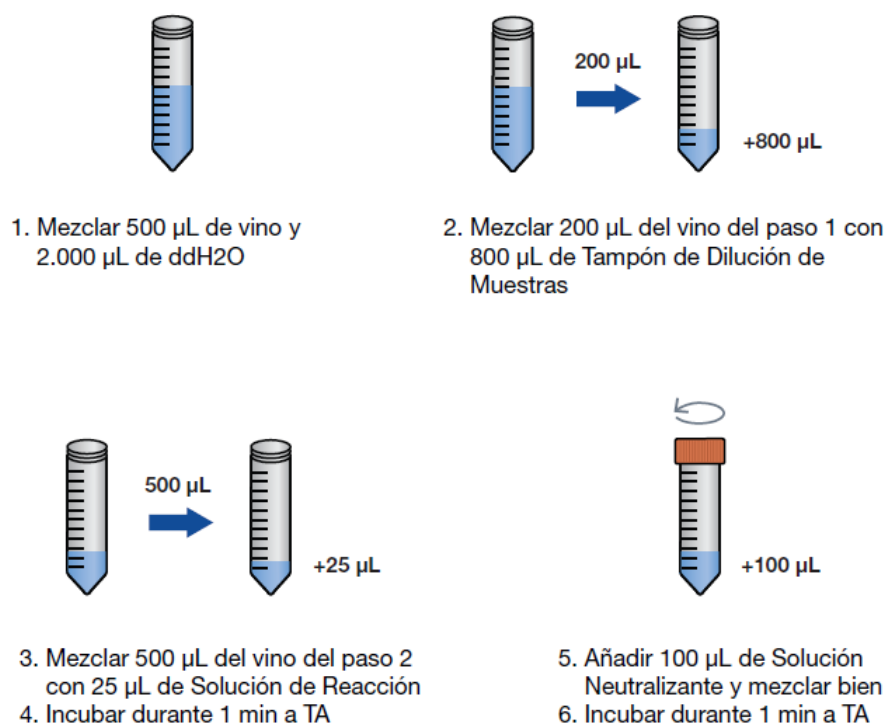
3.2 Preparación de muestras (Derivatización)

3.2.1 Vino

1. Mezclar 500 μL de vino con 2.000 μL de agua bidestilada (ddH_2O).
2. Transfiera 200 μL de esta mezcla (Paso 1) a un nuevo tubo que contenga 800 μL de Tampón de Dilución de Muestras.
3. Transfiera 500 μL de la muestra de vino diluida (Paso 2) a un nuevo tubo que contenga 25 μL de Solución de Reacción.
4. Mezclar bien e incubar durante 1 min a temperatura ambiente (entre 15 y 25 $^{\circ}\text{C}$, 59 y 77 $^{\circ}\text{F}$).
5. Añadir 100 μL de Solución Neutralizante a la muestra activada (Paso 4).
6. Mezclar bien e incubar durante 1 min a temperatura ambiente.

Nota: Esta muestra ya está derivatizada y lista para el ensayo ELISA.

3.2.2 Visión general del flujo de trabajo (Vino)



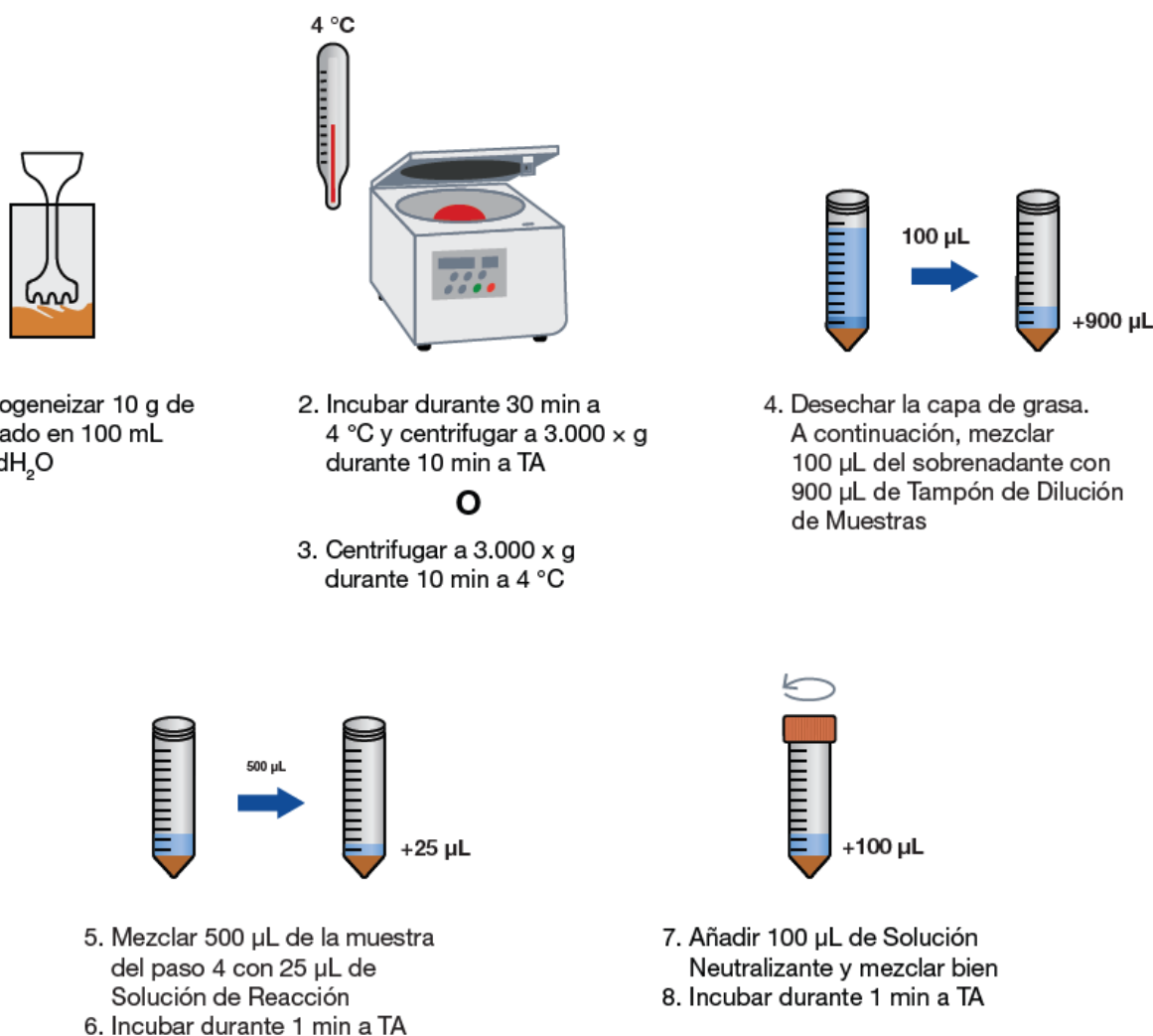


3.2.3 *Pescado*

1. Homogeneizar 10 g de muestra de pescado en 100 mL de agua bidestilada (ddH₂O).
 2. Incubar durante 30 min a 4 °C (39 °F).
- Nota:** Este paso puede omitirse si el Paso 3 se realiza con una centrífuga a 4 °C (39 °F).
3. Centrifugar a un mínimo de 3.000 x g durante al menos 10 min.
 4. Deseche la capa de grasa superior y transfiera 100 µL del sobrenadante a un nuevo tubo que contenga 900 µL de Tampón de Dilución de Muestras.
 5. Transfiera 500 µL de la muestra de pescado diluida (Paso 4) a un nuevo tubo que contenga 25 µL de Solución de Reacción.
 6. Mezclar bien e incubar durante 1 min a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).
 7. Añadir 100 µL de Solución Neutralizante a la muestra activada (Paso 6).
 8. Mezclar bien e incubar durante 1 min a temperatura ambiente.

Nota: Esta muestra derivatizada ya está lista para el ensayo ELISA.

3.2.4 *Visión general del flujo de trabajo (Pescado)*





3.3 Procedimiento ELISA

Importante: Los puntos más críticos del procedimiento ELISA son la temperatura, el tiempo y el lavado de los pocillos de la placa. Un lavado insuficiente dará lugar a una precisión deficiente y falsos resultados.

Nota: Para una mayor reproducibilidad, recomendamos utilizar un lavador de placas automatizado en buen estado en los siguientes Pasos 4 y 7.

1. Añadir 100 µL de estándares derivatizados o extractos de muestras por duplicado en los pocillos apropiados de la placa de microtitulación.

Nota: Consulte *la Sección 7, Ejemplo de diseño del ensayo*. Si tiene un gran número de muestras, pipetee un conjunto de estándares antes de las muestras y el conjunto duplicado de estándares después de las muestras y utilice los valores medios aritméticos para los cálculos.

2. Añadir 50 µL de anticuerpo anti-histamina en cada pocillo.
3. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).
4. Lavar la placa tres veces con 300 µL de Tampón de Lavado 1X por pocillo.

Nota: Al final del lavado automático o entre cada lavado manual, invierta la placa y golpéeela contra un material absorbente (toallas de papel limpias y secas) para vaciar los pocillos y eliminar el líquido residual.

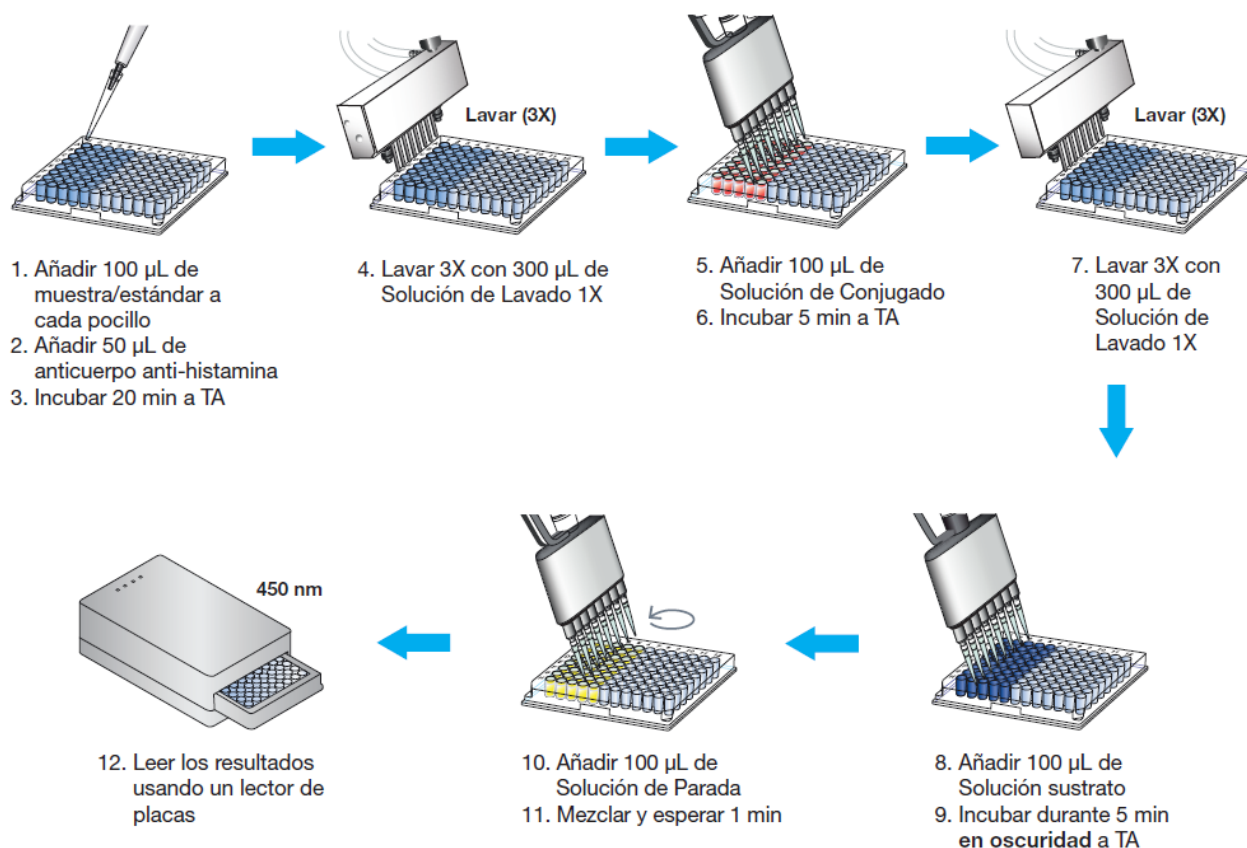
5. Añadir 100 µL de Solución de Conjugado en cada pocillo.
6. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).
7. Lavar la placa como se describe en el Paso 4.
8. Añadir 100 µL de Solución de Sustrato en cada pocillo.
9. Dejar que la reacción se desarrolle en la oscuridad (el cromógeno es sensible a la luz) durante 5 min a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F).
10. Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de Solución de Parada en cada pocillo.
11. Agite suavemente la placa con la mano y espere 1 min.
12. Para medir los resultados, utilice un lector de placas ELISA con un filtro de 450 nm ($DO_{450\text{ nm}}$), siguiendo las instrucciones del fabricante del instrumento.

Nota: Los pocillos que contienen color azul se volverán amarillos en presencia de histamina derivatizada.

Importante: Si los resultados de alguna muestra caen fuera del rango de la curva estándar de histamina derivatizada, no extrapole los datos. En su lugar, diluya el extracto de la muestra con el Tampón de Extracción y Dilución de Muestras diluido (1X) y repita el ensayo ELISA utilizando este extracto de muestra diluido y los estándares, por duplicado.



3.3.1 Visión general del flujo de trabajo



4. Cálculo e interpretación de los resultados

Los estándares se preparan para una determinación directa de la concentración de histamina en la muestra. La dilución de las muestras en el proceso de extracción, tal y como se describe en los procedimientos de preparación de muestras, ya se tiene en cuenta a la hora de calcular los niveles. Sin embargo, los resultados deben tener en cuenta cualquier dilución adicional (por ejemplo, debida a una elevada concentración de la muestra) y las muestras de vino (véase el Paso 4 más adelante).

1. Calcular el valor medio de $OD_{450\text{ nm}}$ para cada conjunto de estándares de referencia y muestras.
2. Para crear la curva estándar, trazar los valores medios de DO de los estándares de referencia en el eje y frente a la concentración de histamina en ppm en el eje x.
3. Utilizando el valor medio de densidad óptica (DO) de cada muestra, determinar la concentración correspondiente de histamina en ppm a partir de la curva estándar.
4. Para las muestras de vino, multiplique los resultados por 0,25 para obtener la concentración de histamina en la muestra original.

5. Precauciones generales

- Si su piel entra en contacto con sustancias tóxicas o irritantes, enjuague la zona afectada con abundante agua y busque atención médica si es necesario. Consulte la SDS, disponible en www.hygiena.com/SDS.
 - La Solución de Reacción contiene 1,4-benzoquinona. Si esta solución entra en contacto con la piel, aclare la zona afectada con abundante agua. Consulte la SDS.



- La Solución de Sustrato contiene TMB, que es altamente tóxico si se inhala, ingiere o entra en contacto con la piel. Consulte la SDS.
- La Solución de Parada contiene H_2SO_4 , que es corrosivo. Consulte la SDS.
- Manipule el kit de ensayo de acuerdo con las BPL.
 - No utilice reactivos después de la fecha de caducidad del kit.
 - Manipular todas las soluciones con guantes.
 - Durante la extracción de la muestra, evite la contaminación cruzada.
 - Los dispositivos, como la batidora, deben limpiarse después de cada preparación de la muestra.
 - Utilice puntas de pipeta estériles.
 - No intercambie las tapas de los viales de reactivos.
 - No intercambie reactivos entre kits con números de lote diferentes.
- No altere los reactivos. Hacerlo puede causar resultados inexactos.
- Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C, 59 y 77 °F) antes de su uso.
- No utilice las soluciones si se enturbian o precipitan. La única excepción es el Solución de Lavado 10X, que puede tener precipitados cristalinos que deben disolverse completamente antes de su uso (véase la sección 2.2).
- La Solución de Sustrato es sensible a la luz. Evite la exposición a la luz directa y guárdela en la oscuridad.
- Utilice únicamente agua destilada para la dilución de tampones concentrados.
- No deje que los pocillos se sequen completamente.
- Evite incubar las placas multipocillos en bancos de trabajo fríos.

6. Información adicional

6.1 Resumen de las especificaciones

Especificación	AlerTox ELISA Histamina	
Objetivo	Histamina	
Límite de detección (LD)	0,3 – 0,7 ppm	
Límite de cuantificación (LC)	2 ppm	
Rango de concentración de estándares	0,0 – 72 ppm	
Rango de cuantificación	2,0 – 72 ppm	
Factores de cálculo	Vino	Multiplicar los resultados por 0,25
	Pescado	No se necesitan cálculos adicionales

Para los datos de ensayo específicos del lote y los criterios de aceptación/rechazo de los valores medidos, véase el Certificado de Análisis (www.hygiena.com/COA).



6.2 Recuperación

Matriz*	Recuperación (%)
Bacalao	102
Solla	95
Salmón	84
Trucha	96
Atún	99
Vino (tinto)	97

* Analizado en matrices típicas.

6.3 No reactividad cruzada

De las matrices que se probaron, se encontró que las siguientes no presentaban reacción cruzada con el Kit AlerTox ELISA Histamina:

Matrices no reactivas
Histidina
Serotonina

7. Ejemplo de diseño del ensayo

S0: Estándar cero (sin antígeno): el valor medio = B_0 .

S1 – S5: Estándares: el valor medio = B.

SP: Muestras: el valor medio = B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S0	S0	SP3	SP3	SP11	SP11						
B	S1	S1	SP4	SP4	SP12	SP12						
C	S2	S2	SP5	SP5	Etc.	Etc.						
D	S3	S3	SP6	SP6	Etc.	Etc.						
E	S4	S4	SP7	SP7	Etc.	Etc.						
F	S5	S5	SP8	SP8	Etc.	Etc.						
G	SP1	SP1	SP9	SP9	Etc.	Etc.						
H	SP2	SP2	SP10	SP10	Etc.	Etc.						



8. Descargo de responsabilidad

Estos productos están fabricados con materias primas de alta calidad. No se ofrece garantía de ningún tipo, ni expresa ni implícita, en cuanto a su idoneidad más allá de la medición del contenido de antígeno diana cuando se utilizan exactamente de acuerdo con estas instrucciones, excepto en lo relativo a la calidad de estos materiales.

El uso del kit para cualquier otro fin está fuera de su uso previsto. Cualquier daño, incluidos los daños o gastos consecuentes o especiales derivados directa o indirectamente del uso de este producto, se limitan al valor de sustitución del kit.

9. Información de contacto

Para más información, visite www.hygiena.com/contact. Para obtener asistencia técnica, visite www.hygiena.com/support.

10. Índice de cambio

INS3065 REVA, febrero de 2022

Instrucciones iniciales.

INS-KIT3065-001-REVA, enero 2025

Modificaciones menores en la sección 2.1. Añadidos flujos de trabajo gráficos. Se ha actualizado el diseño y el número de identificación del documento.



Hygiena

Camarillo, CA 93012

EE.UU.

www.hygiena.com/support

Fabricado por

Hygiena Diagnóstica España S.L.

P. I. Parque Plata

Calle Cañada Real 31 - 35

41900, Camas (Sevilla), España

www.hygiena.com