



Instructions d'utilisation

HistaSure™ ELISA Fast-Track

Test ELISA pour le dosage rapide de l'histamine dans le poisson



REF FC E-3600



1. Utilisation et principe du test

Le test HistaSure™ ELISA^{Fast-Track} permet de doser de manière quantitative ou semi-quantitative le niveau d'histamine dans différents types de poissons scombridés, comme le thon, la dorade coryphène ou la sardine ainsi que dans des farines de poisson.

Ce kit nécessite la dérivation des échantillons à l'aide d'un agent d'acylation, afin de convertir l'histamine en N-acylhistamine. Dans cet ELISA par compétition, l'histamine est liée à la plaque de microtitration. La N-acylhistamine en suspension et l'histamine liée à la microplaque sont en compétition pour les sites de liaison de l'antisérum.

Ainsi, la quantité d'anticorps liés à l'histamine présente sur la microplaque est inversement proportionnelle à la concentration d'histamine dans l'échantillon. La réaction est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm.

2. Introduction

Le dosage de l'histamine dans le poisson frais est une stratégie de contrôle efficace pour réduire le risque de scombrottoxine. La production d'histamine dans le poisson est provoquée par la prolifération de certaines bactéries, qui convertissent l'histidine en histamine. Dans les espèces qui contiennent naturellement des taux d'histidine élevés, comme le thon, la teneur en histamine peut dépasser les 1 000 ppm (mg / kg) en cas de détérioration importante du poisson.

La consommation de poisson contenant des niveaux élevés d'histamine peut provoquer une forme d'allergie communément appelée "scombroidose". Un poisson est généralement considéré comme scombrottoxique lorsque la teneur en histamine est supérieure à 200 ppm. Un contrôle qualité efficace nécessite la détermination du niveau d'histamine dans une gamme allant de 10 à 200 ppm au sein d'un même lot, où des poissons strombotoxiques peuvent être disséminés (il est à noter que pour les gros poissons, la teneur en histamine peut varier au sein d'un même individu). Un poisson de bonne qualité contient moins de 10 ppm d'histamine, un niveau de 30 ppm indique une détérioration significative et 50 ppm est considéré comme une preuve de décomposition.

Les contrôles régelementaires (Règlement communautaire 2073/2005) requierent que sur 9 échantillons testés dans un lot: 1) la teneur moyenne en histamine ne dépasse pas 100 ppm, 2) qu'aucun échantillon ne dépasse 200 ppm, 3) que le nombre d'échantillons contenant un niveau d'histamine entre 100 et 200 ppm ne soit pas supérieur à deux.

3. Précautions et mesures de sécurité


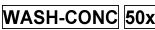

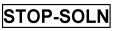


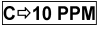
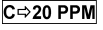
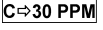
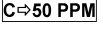
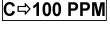
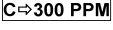

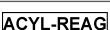


- Ce kit est destiné à un usage professionnel.
- Seul le respect des instructions d'utilisation et du protocole fourni garantit d'obtention de résultats fiables.
- Le port d'une blouse de laboratoire, de gants en latex et de lunettes de protection est nécessaire.
- Tous les réactifs du kit et les échantillons doivent être amenés à température ambiante (20-25 ° C) et mélangés doucement, avant utilisation.
- L'eau utilisée pour la réalisation du test doit être déminéralisée, distillée ou ultra-pure.
- La microplaque contient des bandes sécables. Les puits inutilisés doivent être conservés entre 2 ° C et 8 ° C dans le sachet en aluminium prévu à cet effet. Les puits sont à usage unique.
- Une fois le test commencé, toutes les étapes doivent être suivies sans interruption. Assurez-vous que les réactifs, matériels et appareils nécessaires soient prêts.
- Les temps d'incubation influencent les résultats. Les puits doivent être manipulés dans le même ordre.
- Pour éviter la contamination des réactifs, utiliser un nouvel embout de pipette jetable pour la distribution de chaque réactif, échantillon et standard.
- Ne pas mélanger les éléments de différents lots du kit dans un même kit et ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du kit.
- Eviter le contact avec la solution d'arrêt contenant 0,25 M H₂SO₄. Elle peut provoquer une irritation de la peau et des brûlures. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement à l'eau. Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement à l'eau. Le NaN₃ peut réagir avec le plomb et le cuivre pour former des azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer avec une grande quantité d'eau afin d'éviter leur accumulation.
- Le substrat TMB a un effet irritant sur la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver abondamment les yeux avec de l'eau. Pour un contact avec la peau, laver avec de l'eau et du savon. Laver les objets contaminés avant de les réutiliser.
- Pour plus d'information sur les substances dangereuses incluses dans ce kit, se référer aux fiches de données de sécurité (FDS). La fiche de données de sécurité de ce produit est disponible directement sur www.immusmol.com.
- Tous les réactifs doivent être considérés comme des déchets dangereux et éliminés selon la réglementation en vigueur.

4. Stockage et conservation

Conserver les réactifs à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration. Ne pas utiliser les composants au-delà de la date de péremption indiquée sur les étiquettes des éléments du kit. Ne pas mélanger des éléments issus de lots différents lors d'un même dosage.

5. Composants

5.1 Elements du kit

| REF | Symbole | Réactif | Format | Couleur | Statut |
|-----------|---|-------------------------------|--------------|-------------|--|
| BA D-0035 |  MB 48 | Plaque de préparation | 1 x 48 wells | | Prête à l'emploi |
| BA E-0030 |  WASH-CONC 50x | Tampon de lavage concentré | 1 x 20 ml l | Violet | concentré |
| BA E-0055 |  SUBSTRATE | Substrat | 1 x 12 ml | Noir | Prêt à l'emploi |
| BA E-0080 |  STOP-SOLN | Solution d'arrêt | 1 x 12 ml | Gris clair | Prêt à l'emploi |
| FC E-3601 |  C-0 PPM | Standard 0 ppm | 1 x 4 ml | Blanc | Prêt à l'emploi |
| FC E-3602 |  C-3 PPM | Standard 3 ppm | 1 x 4 ml | Jaune clair | Prêt à l'emploi |
| FC E-3603 |  C-10 PPM | Standard 10 ppm | 1 x 4 ml | Orange | Prêt à l'emploi |
| FC E-3604 |  C-20 PPM | Standard 20 ppm | 1 x 4 ml l | Vert clair | Prêt à l'emploi |
| FC E-3605 |  C-30 PPM | Standard 30 ppm | 1 x 4 ml l | Violet | Prêt à l'emploi |
| FC E-3606 |  C-50 PPM | Standard 50 ppm | 1 x 4 ml | Bleu foncé | Prêt à l'emploi |
| FC E-3607 |  C-100 PPM | Standard 100 ppm l | 1 x 4 ml | Gris clair | Prêt à l'emploi |
| FC E-3608 |  C-300 PPM | Standard 300 ppm | 1 x 4 ml | Noir | Prêt à l'emploi |
| FC E-3611 |  ACYL-BUFF | Tampon d'acylation | 2 x 50 ml | Blanc | Prêt à l'emploi |
| FC E-3612 |  ACYL-REAG | Réactif d'acylation | 1 x 3 ml | Marron | Prêt à l'emploi |
| FC E-3631 |  HIS | Bandes de microtitration | 1 x 48 wells | | 6 bandes sécables de 8 puits chacune |
| FC E-3640 |  HIS AB CONJ | Antisérums histamine conjugué | 1 x 6 ml | Rouge | Prêt à l'emploi, IgG de chèvre anti-Histamine conjugué avec de la peroxydase |

1.2 Composants additionnels et équipement requis non fournis avec le kit

- Micropipette de précision (50 µl)
- Embouts de micropipette (50 µl)
- Pipette manuelle répétitive
- Embouts pour pipette répétitive (5 ml , 25 ml)
- Grinder (moulin) ou mixeur ménager
- Cylindre en plastique graduée (250 ml)
- Eau déminéralisée, distillée ou ultra-pure
- Balance (capable de peser 5 à 50 grammes, 0,1 gramme de précision)
- Entonnoir et papier filtre (ou centrifugeuse)
- Minuteur
- Marqueur étanche
- Papier absorbant
- Agitateur de microplaques (secousses d'amplitude 2 mm ; environ 600 rpm)
- Lecteur ELISA capable de lire l'absorbance à 450 nm

6. Protocole du test

6.1 Préparation des réactifs

Tampon de lavage

Diluer le tampon de lavage concentré avec 20 ml d'eau (deminéralisée, distillée ou ultra-pure) pour un volume final de 1000 ml. Stocker jusqu'à 6 mois à 2-8 °C .

Réactif d'acylation

Le réactif d'acylation a un point de congélation à 18,5° C. Avant utilisation, veiller à ce que le réactif atteigne la température ambiante et forme une solution homogène, sans cristaux.

6.2 Préparation de l'échantillon

Les protocoles suivants pour la préparation des échantillons sont basés sur la **méthode officielle AOAC 937,07**. L'échantillonnage doit être effectué conformément à la réglementation nationale en vigueur.

A. POISSON FRAIS OU CONGELÉ

- Garder le poisson congelé avant analyse .
- Décongeler les échantillons au réfrigérateur ou dans l'eau froide. Ne pas décongeler les échantillons au bain-marie. Jeter le liquide obtenu lors de la décongélation.
- Une fois décongelés, stocker les échantillons au réfrigérateur (2 - 8 ° C).

- POISSON ENTIER

- Nettoyer et éviscérer les poissons.
- Pour les poisson dont la taille est inférieure à 15 cm, utiliser 5 à 10 poissons.
- Pour les poissons dont la taille est supérieure à 15 cm, prélever 3 tranches de 2,5 cm de large sur au moins 3 poissons (une tranche derrière les nagoires pectorales, une tranche à mi-chemin entre la première tranche et l'anus, et une tranche juste avant l'anus. Enlever l'arrête centrale.
- Mixer les échantillons jusqu'à homogénéisation.

- FILET DE POISSON

- Utilisez le filet entier. Mixer jusqu'à homogénéisation.

B. CONSERVE DE POISSON

- Verser l'intégralité du contenu de la conserve (viande et liquide) dans un mixeur et mélanger jusqu'à homogénéisation.

C. CONSERVES CONTENANT DE L'HUILE, DE LA SAUCE, DE LA SAUMURE OU DU BOUILLON

- Égoutter pendant 2 minutes sur un tamis N°8 ou tamponner l'échantillon avec un essuie-tout . Placer le poisson dans un mixeur et mélanger jusqu'à homogénéisation.

D. FARINE DE POISSON

- Mélanger l'échantillon jusqu'à homogénéisation..

6.3 Extraction

Peser 10 g d'échantillon préalablement préparé, ajouter 240 ml d'eau (deminéralisée , distillée ou ultra-pure) et homogénéiser pendant 1 à 2 minutes dans un grinder ou un mixeur.

* Les échantillons de farine de poisson sont agités pendant 10 minutes à température ambiante.

.....
Filtrer l'homogénat à travers un filtre papier plié (alternativement, un aliquot de l'homogénat peut être centrifugé pendant 5 minutes à vitesse maximale). Si une couche de gras se forme, l'enlever par aspiration.
.....

Utilisez 50 µl de l'extrait d'échantillon pour l'acylation.
.....

6.4 Test ELISA pour le dosage de l'histamine

Pour les étapes suivantes (Acylation et ELISA) laisser l'ensemble des réactifs et des échantillons atteindre la température ambiante.

A. DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Pour la détermination semi-quantitative, sélectionner le seuil de votre choix parmi les standards fournis dans le kit. Les standards suivants sont disponibles : 3, 10, 20, 30, 50, 100 ou 300 ppm.

B. DÉTERMINATION QUANTITATIVE

Pour un dosage quantitatif, utiliser les standards suivants, fournis dans le kit : 0, 3, 10, 30, 100 et 300 ppm. Ces 6 standards servent à établir la courbe standard (se référer à la section 7.)

6.4.1 Acylation

1. Pipeter 50 µl de standard (s) et d'extraits d'échantillons dans les puits de la plaque de préparation.
2. Ajouter 1,5 ml de tampon d'acylation en une seule fois à tous les puits (!). L'utilisation d'une pipette répétitive (25 ml, se référer à la section 5) est recommandée.
3. Ajouter 50 µl du réactif d'acylation à tous les puits. (Changement de couleur du jaune au rose !)
Passer immédiatement à l'étape 4. (!)
4. Incuber 5 minutes à température ambiante (20-25 °C) sur un agitateur (à 600 rpm). Assurez-vous que le mélange est complet (légère couleur rose).
5. Prendre 50 µl pour le test ELISA

6.4.2 Test ELISA de l'histamine

1. Pipeter 50 µl de standards et d'échantillons acylés dans les puits de la microplaque ELISA.
2. Pipeter 100 µl de sérum anti-histamine dans tous les puits. L'utilisation d'une pipette répétitive (5 ml, se référer à la section 5.) est recommandée.
3. Incuber 10 minutes à température ambiante (20-25 °C) sur un agitateur (à 600 rpm).
4. Jeter ou aspirer le contenu des puits. Laver la plaque 3 fois de la manière suivante: ajouter 300 µl de tampon de lavage, jeter le contenu, retourner la plaque et l'égoutter sur du papier absorbant.
5. Pipeter 100 µl de substrat dans chaque puit. L'utilisation d'une pipette répétitive (5 ml, se référer à la section 5.) est recommandée.
6. Incuber pendant 10 min à température ambiante (20-25 °C) sur un agitateur (à 600 rpm). Éviter l'exposition directe à la lumière (!)
7. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt à chaque puit et agiter la microplaque afin d'assurer une répartition homogène de la solution. L'utilisation d'une pipette répétitive (5 ml, se référer à la section 5.) est recommandée.
8. Lire l'absorbance dans les 10 minutes en utilisant un lecteur de microplaques réglé à 450 nm.

7. Calcul des résultats

A. RÉSULTATS SEMI- QUANTITATIFS :

- Si l'absorbance de l'échantillon est **supérieure** à celle du standard seuil choisi , l'échantillon a réussi le test.
- Si l'absorbance de l'échantillon est **inférieure** à celle du standard seuil choisi , l'échantillon a échoué.

B. RÉSULTATS QUANTITATIFS:

Les lectures d'absorbance des 6 standards (0, 3, 10, 30, 100 et 300 ppm) sont utilisées pour établir une courbe standard.

Tracer les lectures d'absorbance des standards (axe des ordonnées, linéaire) par rapport aux concentrations des standards (axe des abscisses, log), en utilisant une concentration de 0,001 ppm pour le contrôle 0 (cet alignement est nécessaire en raison de la présentation logarithmique des données). Pour tracer la courbe, une régression non linéaire doit être appliquée. Les concentrations des échantillons peuvent être lues directement à partir de cette courbe standard.

Si un échantillon est hors courbe, il doit être dilué avec de l'eau (1:10) et ré-analysé. Le résultat obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution, soit 10.

8. Garantie

Ce test a été soumis à des contrôles de qualité internes et externes rigoureux. Toute modification de ce kit d'analyse et de son protocole, ainsi que l'utilisation de réactifs tiers, peuvent avoir une influence négative sur les résultats du test et ne sont donc pas couverts par la garantie. Le fabricant décline toute responsabilité pour les dommages survenus pendant le transport.

9. Echantillons de poisson éligibles

Jusqu'à présent, le test HistaSure™ ELISA^{Fast-Track} s'avère compatible avec tous les types d'échantillons de poisson testés. Les tableaux ci-dessous illustrent les applications majeures du test.

9.1 Espèces validées lors de la certification AOAC

| Espèce de poisson | Format |
|-------------------|---|
| Thon | - Morceaux en conserve (non-Albacore) - Thon jaune frais/congelé |
| Dorade Coryphène | - Fraîche/congelée |
| Sardine | - Conserves à l'huile |
| Farine de poisson | |

9.1 Espèces validées lors de tests internes

| Espèce de poisson | Format |
|-------------------|---------------------------------------|
| Maquereau | - Fumé |
| Anchois | - Frais - En saumure - en sauce |
| Hareng | - Conserves à l'huile |
| Alose | - Salée à sec - Fermentée |
| Hareng | - Fumé |
| Saumon | - Fumé |
| Bonite | - Lakerda |

10. Caractéristiques du test

Ce test remplit des critères de performance de l'AOAC pour le dosage de l'histamine dans le thon frais / congelé albacore, les conserves de thon pâle (non-albacore) en morceaux, la dorade coryphène congelée, les sardines à l'huile en conserve dans l'huile et la farine de poisson.

Spécificité

| Substance | Réactivité croisée à l'histamine (%) |
|-------------------|--------------------------------------|
| Histamine | 100 |
| L-Tryptophan | nd |
| Tryptamine | nd |
| 3-Methylhistamine | 0.44 |
| L-Histidine | nd |
| L-Tyrosine | nd |
| L-Tyrosine | nd |
| Tyramine | 0.69 |
| Cadaverine | 0.40 |
| Spermine | nd |
| Putrescine | nd |
| Triméthylamine | nd |

nd = non détectable

Plage de détection

| Echantillon | Plage (ppm) | Moyenne (%) | Plage (%) | Intra CV moyen (%) - N=7 | Gamme CV (%) |
|---------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------|--------------|
| Thon Frais/Congelé | 5.25 – 218.6 | 91.8 | 85.2 – 99.6 | 7.58 | 4.13 – 10.8 |
| Thon en boîte | 5.49 – 267.3 | 99.8 | 94.7 – 106.5 | 8.74 | 3.17 – 13.9 |
| Dorade coryphène congelée | 6.38 – 199.0 | 87.3 | 79.1 – 103.1 | 6.19 | 2.97 – 9.56 |
| Sardines en boîte | 5.27 – 249.9 | 87.6 | 76.8 – 99.7 | 5.65 | 1.80 – 9.22 |
| Farine de poisson | 9.4 – 244.2 | 86.0 | 79.0 – 93.9 | 4.89 | 2.09 – 7.92 |

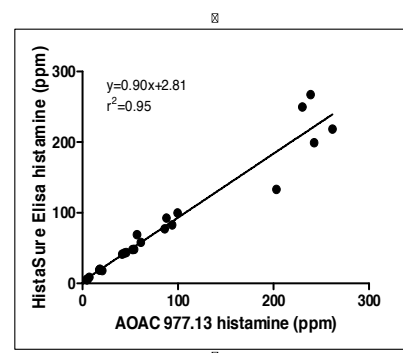
| | Moyenne (ppm) | n | Inter CV % |
|-----------|---------------|--------|------------|
| Lot à lot | 25.8 | 3 lots | 4.16 |

Limite de détection











| | |
|--------------------------------|----------|
| LOD (Limite de Détection) | 0.44 ppm |
| LOQ (Limite de Quantification) | 1.31 ppm |

Comparaison AOAC

Test ELISA HistaSure vs méthode fluorimétrique de l'AOAC 977.13: échantillons de thon frais / congelé, thon en conserve, dorade coryphène congelée et conserves de sardines.



Symboles

| | | | | | |
|---|-----------------------------------|---|---------------|---|--|
|  | Permet de tester <n> échantillons |  | Fabriquant |  | Température de stockage |
|  | Référence |  | Numéro du lot |  | Date de péremption |
|  | Attention |  | Contenu |  | Consultez les instructions d'utilisation |
|  | Uniquement pour la Recherche | | | | |

Contact

ImmuSmol SAS

PTIB – Hôpital X. Arnoz
Avenue Haut Lévêque
33600 Pessac – France
Tél : 05 47 30 27 72
@ : contact@immusmol.com
www.immusmol.com