



## Arbeitsanleitung

Histamin

96 Tests

Enzymimmunoassay  
zur quantitativen  
Bestimmung von  
Histamin in Lebensmitteln

Best.-Nr.: HIS-E02

Version: 1. Dezember 2022

**Gold Standard Diagnostics  
Kassel GmbH**

Otto-Hahn-Str. 16  
D-34123 Kassel

Tel.: +49 (0) 561 491742-0  
Fax: +49 (0) 561 491742-20

[info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:info.kassel@eu.goldstandarddiagnostics.com)

[www.kassel.goldstandarddiagnostics.com](http://www.kassel.goldstandarddiagnostics.com)

Empfindlichkeit	2 ng/mL
Wiederfindung (Wein, Fisch, Käse)	90%
Inkubationszeit	80 min

## Allgemeines

Histamin ist ein biogenes Amin, das durch enzymatische Decarboxylierung aus der Aminosäure Histidin entsteht und in den Mastzellen und basophilen Leukozyten an Heparin gebunden vorkommt. Bei Typ I Allergien wird endogenes Histamin von Mastzellen und basophilen Leukozyten durch Antigenbindung an membranassoziertes IgE freigesetzt, und es kommt zu den typischen allergischen Reaktionen. Histamin kann aber auch über die Nahrung in den menschlichen Körper gelangen und hierdurch pseudoallergische Nahrungsmittelunverträglichkeiten hervorrufen. Die auftretende Symptomatik ist von denen einer Allergie nicht zu unterscheiden. Von Lebensmittelallergien spricht man aber nur, wenn die krankhaften Symptome als Folge einer immunologischen Reaktion entstehen. Nicht-immunologische Reaktionen auf Lebensmittel werden als Lebensmittelintoleranzen bezeichnet.

Lebensmittelunverträglichkeiten, die durch erhöhte Histaminkonzentrationen der Nahrung hervorgerufen werden, sind klinisch durch Hautrötung, Durchfall, Erbrechen, Übelkeit, Juckreiz, Kopfschmerzen und Asthma charakterisiert. Das Ausmaß der Reaktion ist von der aufgenommenen Menge an Histamin abhängig. Verstärkt werden können diese Reaktionen durch einen Diaminoxidasemangel.

Von Histaminintoleranzen müssen toxische Reaktionen abgegrenzt werden, die durch sehr hohe Histaminkonzentrationen verursacht werden. Toxische Histaminkonzentrationen, welche die sogenannte Scombroid-Reaktion hervorrufen, entstehen durch bakterielle Zersetzung von eiweißreichen Nahrungsmitteln, insbesondere Fisch.

Histamin findet sich vor allem in Käse, Fisch, Spinat, geräucherten Produkten und Rotwein. Die in verschiedenen Nahrungsmitteln, aber auch in Nahrungsmitteln derselben Art vorkommenden Histaminkonzentrationen weisen häufig große Unterschiede auf. So können in verschiedenen Käsesorten Histamingehalte von 600 - 1000 mg/kg auftreten. Der **Gold Standard Diagnostics Histamin Test** ist eine schnelle, preisgünstige und empfindliche Methode, um Histamin in Wein, Fisch oder Käse nachzuweisen. Es können 40 vorbereitete Proben in 80 Minuten im Doppelansatz bestimmt werden.

## Testprinzip

Der **Gold Standard Diagnostics Histamin Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein Histamin-Konjugat ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die derivatisierte Histamin enthaltende Probe bzw. Standards, sowie ein Histamin-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Konkurrenz

zwischen festphasengebundenem Histamin und Histamin der Probe um die freien Bindungsstellen des Antikörpers statt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein gegen den Histamin-Antikörper gerichtetes Konjugat wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren 30 minütigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Histamin-Konzentration ist der Intensität der Färbung umgekehrt proportional.

### Vorsichtsmaßnahmen

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für

das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

### Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.
5. Die Reaktionslösung enthält 1,4-Benzochinon. Sollte ein Haut- oder Augenkontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.

### Reagenzien

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Histamin-Konjugat.
2. Histamin Standards: 6 Fläschchen mit je 4,0 mL (0; 2; 4; 10; 40; 100 ng/mL). Die Standards müssen vor dem Einsatz im Test derivatisiert werden (siehe *Vorbereitung der Reagenzien*).
3. Reaktionslösung: 3 mL, gebrauchsfertig.
4. Neutralisationslösung: 15 mL, gebrauchsfertig.
5. Anti-Histamin Antikörper (Kaninchen): 6 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
6. Konjugat (anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
7. Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
8. Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 15 mL, gebrauchsfertig.

9. Probenverdünner (PBS), 60 mL, gebrauchsfertig.
10. Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat, blau eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
11. Zwei Plastikfolien zur Abdeckung der Streifen während der Inkubation.
12. Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen.
13. Arbeitsanleitung.

## Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

### Geräte

- 25, 50, 100 und 500 µL Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mixer
- Zentrifuge

### Reagenzien

- 0,1 M Salzsäure (HCl)

## Probenvorbereitung

### Wein

- 500 µL Wein werden mit 500 µL Probenverdünner (1:2) gemischt. Zu dieser verdünnten Weinprobe werden 50 µL Reaktionslösung pipettiert, gründlich gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- 200 µL Neutralisationslösung werden zu der Probe pipettiert, gründlich gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- Die Probe kann jetzt direkt im Test eingesetzt werden.

### Käse und Fisch

- 10 g Käse bzw. Fisch werden mit 50 mL 0,1 M HCl in einem Mixer 5 Minuten homogenisiert.
- Das Probenhomogenat wird anschließend 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Dabei bilden sich drei Phasen: eine obere feste Fettschicht, eine mittlere trübe wässrige Schicht und ein unteres Pellet.
- 500 µL der trüben wässrigen Phase werden entnommen. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Fettpartikel aus der oberen festen Phase pipettiert werden. Gegebenenfalls die Fettschicht vorsichtig entfernen. Die 500 µL Probe werden mit 500 µL Probenverdünner (1:2) gemischt.

- Zu dieser verdünnten Käse- oder Fischprobe werden 50 µL Reaktionslösung pipettiert, gründlich gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- 200 µL Neutralisationslösung werden zu der Probe pipettiert, gründlich gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- Die Probe kann jetzt direkt im Test eingesetzt werden.

Anmerkung: Die unterschiedlich hohen Konzentrationen an Histamin in den verschiedenen Lebensmitteln können es erforderlich machen, dass die Proben zusätzlich 1:10 oder 1:100 mit Probenverdünner verdünnt werden müssen.

## Vorbereitung der Reagenzien

Vor dem Einsatz im Test müssen die Standards wie folgt derivatisiert werden:

- Zu je 500 µL Standard werden 25 µL Reaktionslösung pipettiert, gründlich gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- 100 µL Neutralisationslösung werden zu den jeweiligen Standards pipettiert, gründlich gemischt und 20 Minuten stehen gelassen.
- Die Standards können jetzt direkt im Test eingesetzt werden.

## Testdurchführung

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL derivatisierte Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben. Sofort im Anschluss in jede Vertiefung 50 µL des Histamin-Antikörpers pipettieren.
3. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 45 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Maus-IgG-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.

6. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (oder 45 Minuten ohne Schüttler) inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4. beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

### Berechnung der Ergebnisse

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ng/mL (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ng/mL für Histamin abgelesen.
4. Um die in einer Probe tatsächlich enthaltene Konzentration zu errechnen, muss der aus der Eichkurve abgelesene Wert noch mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt, multipliziert werden. Der Verdünnungsfaktor ist **2 für Wein** und **10 für Käse und Fisch** unter Verwendung der oben beschriebenen Probenvorbereitungsmethode.

### Typische Standardkurve

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Extinktionen sind in Prozent der Extinktion des 0 ng/mL-Standards angegeben. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Histamin (ng/mL)	OD-% von 0 ng/mL
0	100
2	65
4	49
10	34
40	18
100	13

### Technische Daten

#### *Empfindlichkeit*

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Gold Standard Diagnostics Histamin Tests** beträgt 2 ng/mL bezogen auf die Standardkurve.

#### *Wiederfindung*

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde mit 90% für Wein-, Fisch- oder Käseproben bestimmt.

#### *Intraassay-Präzision*

Der Intraassay-Variationskoeffizient des Histamin-Tests wurde mit 5% bestimmt.

#### *Kreuzreaktionen relativ zu Histamin (=100%)*

N-Acetylhistamin	6%
1-Methylhistamin	0,05%
Histidin	0%
Serotonin	0%

### Literatur

1. Götz, M. et al: *Histaminintoleranz und Diaminoxidasemangel*, Allergologie, 19 (9), 394 - 398 (1996).
2. Bieger, W.P. und von Baehr, R.: *Nahrungsmittelallergien I. Allgemeine Grundlagen*; Naturheilpraxis, 49 (3), 313 - 326 (1996).
3. Kaiser, R. und Bauer, Ch.: *Vorkommen und Bestimmung von Histamin in Käse*; Lebensmittelchemie, 49, 84 (1993).
4. Wantke, F.M. et al.: *The red wine provocation test: intolerance to histamine as model for food allergy*; Allergy Proc. 15, 27 - 32 (1994).
5. Wüthrich, B.: *Lebensmittelallergien und -intoleranzen*; Lebensmittelchemie, 50, 155 - 156 (1996).