

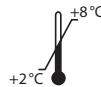
IDK[®] DAO ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Diaminoxidase (DAO)
in Serum*

For the in vitro determination of DAO in serum

Gültig ab / Valid from 2015-07-22

REF K 8510



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probenlagerung und -stabilität</i>	5
<i>Probenvorbereitung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzbereiche</i>	8
<i>Heparinbehandlung</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	11
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA-Test ist für die quantitative Bestimmung von Diaminoxidase (DAO) in Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Diaminoxidase (DAO) ist das entscheidende körpereigene Abbauenzym für Histamin. Obwohl DAO praktisch im gesamten Körper vorkommt, ist der Darm ihr wichtigster Wirkungsort. Die enzymatische Aktivität der DAO bestimmt die Abbau-geschwindigkeit des Histamins. Liegt ein DAO-Mangel bzw. eine -Hemmung vor, kann der Organismus mit der Nahrung aufgenommenes oder aus körpereigenen Zellen freigesetztes Histamin nicht rasch genug abbauen und es treten die Symptome einer Histamin-Intoleranz auf. Millionen von Menschen leiden nach dem Genuss bestimmter Nahrungsmittel unter Beschwerden wie Magen-Darm-Problemen, Migräne, Reizungen der Nasenschleimhaut, sowie anderen allergieähnlichen Symptomen. Zuviel Histamin im Körper kann für dieses umfangreiche Beschwerdebild verantwortlich sein.

Eine Bestimmung der DAO-Konzentration in Serum (K 8510) zusammen mit einer Bestimmung der DAO-Aktivität (K 8220 DAO REA) stellt einen geeigneten Marker für die Differentialdiagnostik der Histamin-Intoleranz und damit assoziierter Krankheitsbilder dar.

Unser *IDK*[®] DAO-ELISA bestimmt die Konzentration der Diaminoxidase in Serum.

Indikationen

- Häufige Kopfschmerzen oder Migräne
- Schnupfen nach dem Genuss histaminhaltiger Nahrungsmittel
- Gewebeödeme
- Schwellung der Augenlider
- Hautrötungen
- Gliederschmerzen
- Magen-Darm-Beschwerden
- Überwachung einer histaminfreien Diät

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit-Komponenten	Menge
K 8510	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 8510	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 5 x	4 x 100 ml
K 8510	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 8510	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8510	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8510	AB	Detektionsantikörper (biotinyliert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8510	CONJ	Konjugat (Streptavidin, peroxidase- markiert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8510	ABBUF	Verdünnungspuffer für AB und CONJ, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8510	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, ge- brauchsfertig	1 x 50 ml
K 8510	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8510	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Laborübliche Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1,5 ml)
- Laborübliches Reaktionsgefäß (15 ml)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Vortex-Mixer
- Reinstwasser*Inkubator bei 37 °C mit Schüttelfunktion
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und

organischen Molekülen ist (frei von Partikeln $> 0,2 \mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2 \text{M}\Omega \text{cm}$).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner $100 \mu\text{l}$** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:5** in Reinstwasser verdünnt werden ($200 \text{ml WASHBUF} + 800 \text{ml Reinstwasser}$), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Der **WASHBUF** kann bei **$2-8^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:5 verdünnter WASHBUF) ist bei **$2-8^\circ\text{C}$ einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

Achtung:

Dieser WASHBUF ist ausschließlich für den *IDK*[®] DAO-ELISA geeignet. Kristalle im WASHBUF vor der Verdünnung gründlich lösen.

- Der lyophilisierte **CAL** (Kalibrator) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei $2-8^\circ\text{C}$ bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der **CAL** (Kalibrator) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **$500 \mu\text{l}$ SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierter Kalibrator sowie Kontrollen können **nicht** gelagert werden.
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **$100 \mu\text{l}$ SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) pipettiert.
- **Vorbereitung von Konjugat und Detektionsantikörper:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** und das **Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** werden unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Verdünnungspuffer** verdünnt ($100 \mu\text{l CONJ} + 10 \text{ml ABBUF}$), ($100 \mu\text{l AB} + 10 \text{ml ABBUF}$). Das CONJ und das AB sind bei **$2-8^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) und **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes AB) **sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden**.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung und -stabilität

Lagerung bei Raumtemperatur (15–30 °C):	4 Tage
Lagerung bei 2–8 °C:	9 Tage
Lagerung bei -20 °C:	6 Monate

Probenvorbereitung

50 µl Probe in 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettieren, mit **200 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) versetzen und gut mischen (entspricht einer **1:5-Verdünnung**).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA Technik. Es werden polyklonale Antikörper, die gegen die rekombinante DAO generiert wurden, verwendet.

Kalibrator, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf DAO zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-DAO Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird DAO aus der Probe von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann ein polyklonaler mit Biotin markierter anti-DAO Antikörper, zugegeben. Der nächste Schritt ist die Zugabe des Streptavidin-POD-Konjugats und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

1. Antikörper – DAO –biotinylierter Antikörper- - Streptavidin-POD-Konjugat

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem DAO-Gehalt direkt proportional. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve lässt sich die Konzentration der Proben ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL (Leerwert/Kalibrator/Proben/Kontrollen) im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der gut verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Detektionsantikörper in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.

12.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren
13.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log Model unter Verwendung der Angaben zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A,B,C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

Nach jeder Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Proben

Die ermittelte DAO-Konzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor **5** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Kalibrierkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereiche

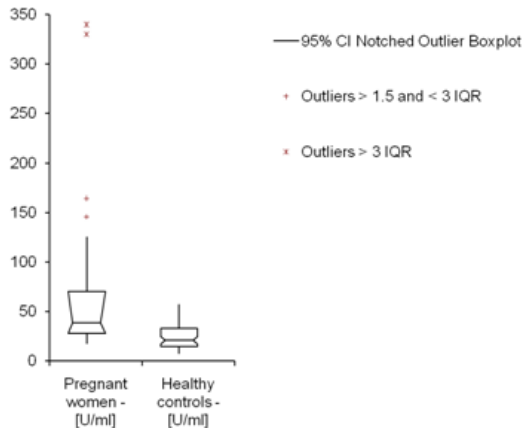
< 3 U/ml:	HIT (Histaminintoleranz) anzunehmen
3–10 U/ml:	HIT wahrscheinlich
> 10 U/ml:	HIT wenig wahrscheinlich

Umrechnungsfaktor: 1 U/ml = 1,25 ng/ml.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Vergleich "Schwangere Frauen" und "Gesunde Kontrollen"

Zur klinischen Evaluierung haben wir Proben von Schwangeren im Vergleich zu Proben von augenscheinlich Gesunden untersucht. Der *IDK*[®] DAO-ELISA zeigt, wie erforderlich und erwartet, bei Schwangeren höhere Werte im Vergleich zu Gesunden.



Heparinbehandlung

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass die DAO-Konzentration nach Heparingabe ansteigt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach der Gabe von Heparin bei gesunden Probanden die DAO-Konzentration innerhalb von 30 Minuten im Vergleich zum Basalwert stark angestiegen ist.

Behandlungsergebnis vor und nach Heparingabe

IDK[®] DAO-ELISA [U/ml]

	VOR Gabe	30 min NACH	60 min NACH
Patient 1	76	219	-
Patient 2	55	152	-
Patient 3	2,5	277	622
Patient 4	18,9	621	555

Der *IDK*[®] DAO-ELISA bestimmt die Konzentration des Enzyms, wohingegen die herkömmlichen Histaminintoleranztests mit Putrescin oder Histamin als Substrate die DAO-Aktivität bestimmen. Daher ist es nicht zwangsläufig eine Korrelation mit einem Koeffizienten $r > 0,8$ zu erwarten. Dies vor dem Hintergrund, dass die Aktivität nicht nur von der Anzahl der Moleküle abhängt, sondern Kofaktoren wie Vitamin C,

Vitamin B₆, Kupfer und Manganionen für die DAO Aktivität *in vitro* und *in vivo* mitentscheidend sind. Daher empfehlen wir bei der Histaminintoleranz-Diagnostik, wenn sie denn über Aktivitätstests bestimmt wird, zur Verifizierung der Ursache neben der DAO-Aktivität auch die genannten Kofaktoren mitzubestimmen. Die Ursache liegt möglicherweise nicht in einer verminderten DAO-Konzentration, sondern an einer Mangelsituation der Kofaktoren.

Die Histaminintoleranzsymptomatik kann durch DAO-Aktivitätsmangel hervorgerufen werden, weil die oben beschriebenen Kofaktoren in nicht ausreichender Menge vorliegen. Durch die Bestimmung der Kofaktoren kann ermittelt werden, welcher der Faktoren supplementiert werden sollte.

Medikamentenwirkung

Bei weiterem Auftreten der Histaminintoleranz-Erscheinungen können Medikamente den DAO-Aktivitätsmangel verursachen. Beispiele hierfür sind:

(aus Maintz u. Novak 2007)

Muskelrelaxantien	Pancuronium, Alcuronium, D-Tubocurarine
Narkosemittel	Thiopental
Analgetika	Morphin, Pethidin, nichtsteroidale Antiphlogistika, Acetylsalicylsäure, Metamizol
Lokalanästhetika	Prilocain
Antihypotonika	Dobutamin
Blutdrucksenkende Mittel	Verapamil, Alprenolol, Dihydralazin
Antiarrhythmika	Propafenon
Diuretika	Amilorid
Darmmotilität beeinflussende Mittel	Metoclopramid
Antibiotika	Cefuroxim, Cefotiam, Isoniazid, Pentamidin, Clavulansäure, Choroquin
Mukolytika	Acetylcystein, Ambroxol
Broncholytika	Aminophyllin
H ₂ -Rezeptor-Antagonisten	Cimetidin
Zytostatika	Cyclophosphamid
Antidepressiva	Amitriptylin

Bei der Einnahme solcher Medikamente sollte der Arzt kontaktiert werden, ob nicht alternative Medikamente empfohlen werden können und möglicherweise damit die Histaminintoleranz-Symptomatik behoben werden kann.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 16-mal in einem *IDK*[®] DAO-ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay (n = 16)

Probe	DAO [U/ml]	VK [%]
1	5,0	1,42
2	5,9	1,72

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 8-mal an drei verschiedenen Tagen von verschiedenen Personen im *IDK*[®] DAO-ELISA gemessen.

Inter-Assay (n = 8)

Probe	DAO [U/ml]	VK [%]
1	23,27	7,9
2	13,36	10,7

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben unterschiedlicher Konzentrationen wurden auf Verdünnungsgerechtigkeit überprüft. (n = 2)

Probe	Verdünnung	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]
A	1:5	15,65	15,65
	1:10	7,83	7,68
	1:20	3,92	3,86
	1:40	1,96	1,86
B	1:5	5,58	5,58
	1:10	2,79	2,89
	1:20	1,39	1,45
	1:40	0,7	0,7

Analytische Sensitivität

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	0,079 U/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	0,120 U/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,120 U/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.

- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST









- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*[®] ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Sattler J et al. (1988) Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions* **23**:361-65.
2. Tufvesson G et al. (1969) Determination of DAO-activity in normal human blood serum. *Scand J Clin Lab Invest* **24**:163-68.
3. Wantke F et al. (1999) The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase of plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. *Inflammation Research* **48**:169-70.

4. Wantke F et al. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model für food intolerance. *Allergy Proceedings* **15**:27-32.
5. Wantke F et al. (1998) Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. *Inflammation Research* **47**:396-400.
6. Jarisch R et al. (1999) Role of food allergy and food intolerance in recurrent urticaria. In: Wüthrich B (Hrsg): *The Atopy Syndrome in the Third Millennium. Curr Probl Dermatol*, Basel, Karger, **28**:64-73.
7. Wantke F et al. (1993) Histamine free diet: treatment of choice for histamine induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches *Clin Exp Allergy* **23**: 982-85.
8. Götz M et al. (1996) Histamin-Intoleranz und Diaminoxidasemangel *Allergologie* **9**: 426-30.
9. Jarisch Reinhart, Histamin-Intoleranz. **1. Auflage** (1999), *Thieme-Verlag*, Stuttgart

Verwendete Symbole:

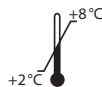
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

IDK[®] DAO ELISA

For the in vitro determination of DAO in serum

Valid from 2015-07-22

REF K 8510



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	20
<i>Sample stability</i>	20
<i>Sample preparation</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference range</i>	23
<i>Heparin treatment</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Sample dilution</i>	26
<i>Analytical Sensitivity</i>	26
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	28

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of diamine oxidase (DAO) in serum. For *in vitro* diagnostic only.

2. INTRODUCTION

Diamine oxidase (DAO) is a body's own enzyme that metabolizes histamine. Although DAO is found practically in the whole body, the most important site of its action is the intestine. The enzymatic activity of DAO determines the histamine degradation speed. In the case of DAO deficiency or inhibition, incorporated or endogenous histamine cannot be degraded quickly enough, and the symptoms of histamine intolerance are presented. Millions of people suffer from gastrointestinal problems, migraine, irritations of nasal mucosa and other allergy-like symptoms after consumption of certain nutrients. Too much histamine in the body can be the reason for this wide range of symptoms.

The determination of DAO serum concentration (K 8510) combined with the determination of DAO activity (K 8220 DAO REA) is a suitable marker for the differential diagnosis of histamine intolerance and associated symptoms.

Our *IDK*[®] DAO ELISA kit is intended for determination of the diamine oxidase (DAO) concentration in serum.

Indications

- Frequent headaches or migraine
- Snuffles after consumption of histamine-containing nutrients
- Tissue oedema
- Eyelid turgor
- Skin redness
- Limb aches
- Gastrointestinal discomfort
- Monitoring of a histamine free diet

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 8510	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8510	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 5 x	4 x 100 ml
K 8510	CAL	Calibrator, lyophilized	4 x 1 vials

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 8510	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8510	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8510	AB	Detection antibody, (biotinylated), concentrate	1 x 200 µl
K 8510	CONJ	Conjugate (Streptavidin, peroxidase-labeled), concentrate	1 x 200 µl
K 8510	ABBUF	Dilution buffer for AB und CONJ, ready to use	1 x 50 ml
K 8510	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 8510	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 8510	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Standard laboratory reaction vessels (1.5 ml)
- Standard laboratory reaction vessel (15 ml)
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Vortex mixer
- Ultra pure water*
- Shaking incubator at 37 °C
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with ultra pure water **1:5** before use (200 ml WASHBUF + 800 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer (1:5 diluted WASHBUF)** can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month.**

Please note:

This WASHBUF is intended only for use in the IDK® DAO ELISA. Crystals in the WASHBUF must be completely dissolved before dilution.

- The lyophilized **CAL** (calibrator) and **CTRL** (controls) are stable at 2–8 °C until the expiry date stated on the label. The **CAL** (calibrator) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl SAMPLEBUF** (sample dilution buffer). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted calibrator and controls are **not stable**.
- Use **100 µl SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) as **BLANK**.
- **Preparation of the conjugate and the detection antibody:** The **conjugate concentrate (CONJ)** and the **detection antibody concentrate (AB)** must be diluted **1:101** in dilution buffer (100 µl CONJ + 10 ml ABBUF) (100 µl AB + 10 ml ABBUF). The CONJ and the AB are stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) and detection antibody (1:101 diluted AB) are not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

Sample stability

Storage at room temperature (15–30 °C):	4 days
Storage at 2–8 °C:	9 days
Storage at -20 °C:	6 months

Sample preparation

Pipet **50 µl** of sample in a 1.5 ml reaction vial, add **200 µl SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) and mix well (corresponds to **1:5 dilution**).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the “sandwich” technique with two polyclonal antibodies against recombinant DAO.

Calibrator, controls and diluted samples which are assayed for DAO are added into the wells of a micro plate coated with polyclonal rabbit anti- DAO antibody. During the first incubation step, DAO is bound by the immobilized primary antibody. Then a biotinylated polyclonal anti-DAO antibody, is added into each microtiter well. In the next step, the streptavidin-POD-conjugate is added and a “sandwich” of 1st antibody – DAO - biotinylated antibody – streptavidin-POD-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of DAO. DAO, present in the patients’ samples, is quantified by referring the optical density (OD) of the samples to a lot-dependent master calibration curve. This is done by using calibrator that is run with each test.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL (blank/calibrator/sample/controls) on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips in the carefully closed aluminium packaging at 2–8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details, please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash each well 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of BLANK/CAL/SAMPLE/CTRL (controls) into the respective wells.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at 37 °C on a horizontal mixer.
4.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 100 µl of detection antibody into each well, mix gently.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer.
7.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl of conjugate into each well.
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal mixer.
10.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
11.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
12.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30 °C) in the dark.
13.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, shake well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Samples

The obtained DAO concentration must be multiplied by the dilution factor of **5**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used to get the real concentration.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the calibration curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the ana-

lysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

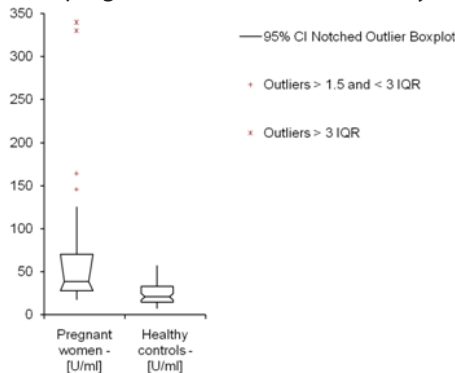
< 3 U/ml:	high incidence for HIT (Histamine intolerance)
3 - 10 U/ml:	HIT probable
> 10 U/ml:	low incidence for HIT

Conversion factor: 1 U/ml = 1.25 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

Comparison “Pregnant women” and “Healthy controls”

For the clinical evaluation of this assay we have analyzed samples from pregnant women and apparently healthy controls. The *IDK*® DAO ELISA detects, as required and expected, higher values in pregnant women than in healthy controls.



Heparin treatment

Furthermore, DAO levels in healthy study participants increased sharply within 30 minutes of heparin administration. It has been documented in scientific literature that DAO levels rise after heparin administration.

Treatment outcome before and after heparin administration

IDK® DAO ELISA [U/ml]

	BEFORE administration	30 min AFTER	60 min AFTER
Patient 1	76	219	-
Patient 2	55	152	-
Patient 3	2.5	277	622
Patient 4	18.9	621	555

Since the IDK® DAO ELISA determines DAO concentration while the conventional histamine intolerance tests with putrescine or histamine as substrates determine DAO activity, the correlation coefficient must not necessarily be $r > 0.8$. This can be explained by the fact that the activity does not depend on the number of molecules alone, but also on cofactors such as vitamin C, vitamin B6, copper or manganese ions in vitro and in vivo. For the diagnosis of histamine intolerance via DAO activity test we therefore recommend to determine the above mentioned cofactors as well. The problem may not be a low DAO level, but a cofactor deficiency.

The symptoms of histamine intolerance can be caused by low DAO activity because the above-mentioned cofactors are not sufficiently available. By quantitating the cofactors it can be determined which one needs to be supplemented.

Medication effects

In addition, histamine intolerance symptoms may be due to low DAO activity caused by medication such as:

Muscle relaxants	Pancuronium, alcuronium, D-tubocurarine
Narcotics	Thiopental
Analgetics	Morphine, pethidine, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetylsalicylic acid, metamizole
Local anesthetics	Prilocaine
Antihypotonics	Dobutamine
Antihypertensive drugs	Verapamil, alprenolol, dihydralazine
Antiarrhythmics	Propafenone
Diuretics	Amiloride
Drugs influencing gut motility	Metoclopramide

Antibiotics	Cefuroxime, cefotiam, isoniazid, pentamidin, clavulanic acid, choroquine
Mucolytics	Acetylcysteine, ambroxol
Broncholytics	Aminophylline
H2-receptor antagonists	Cimetidine
Cytostatics	Cyclophosphamide
Antidepressants	Amitriptyline

If you are taking such medication, you may want to discuss with your physician alternative medication in order to relieve your symptoms.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 16)

The precision (intra-assay variation) was calculated from 16 replicate determinations on each of two samples.

Sample	DAO [U/ml]	CV [%]
1	5.0	1.42
2	5.9	1.72

Inter-Assay (n = 8)

The total precision (inter-assay variation) was calculated from data on 2 samples obtained in 8 different assays by different technicians on three different days.

Probe	DAO [U/ml]	CV [%]
1	23.27	7.9
2	13.36	10.7

Sample dilution

Two patient samples were diluted and assayed. The results are shown below:

Linearity n= 2

Sample	Dilution	Expected [U/ml]	Measured [U/ml]
A	1:5	15.65	15.65
	1:10	7.83	7.68
	1:20	3.92	3.86
	1:40	1.96	1.86
B	1:5	5.58	5.58
	1:10	2.79	2.89
	1:20	1.39	1.45
	1:40	0.7	0.7

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 0.079 U/ml

Limit of detection, LoD 0.120 U/ml

Limit of quantitation, LoQ 0.120 U/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any

spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*[®] is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Sattler J et al. (1988) Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions* **23**:361-65.
2. Tufvesson G et al. (1969) Determination of DAO-activity in normal human blood serum. *Scand J Clin Lab Invest* **24**:163-68.
3. Wantke F et al. (1999) The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase of plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. *Inflammation Research* **48**:169-70.
4. Wantke F et al. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model für food intolerance. *Allergy Proceedings* **15**:27-32.
5. Wantke F et al. (1998) Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. *Inflammation Research* **47**:396-400.
6. Jarisch R et al. (1999) Role of food allergy and food intolerance in recurrent urticaria. In: Wüthrich B (Hrsg): *The Atopy Syndrome in the Third Millennium. Curr Probl Dermatol*, Basel, Karger, **28**:64-73.
7. Wantke F et al. (1993) Histamine free diet: treatment of choice for histamine induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches *Clin Exp Allergy* **23**: 982-85.
8. Götz M et al. (1996) Histamin-Intoleranz und Diaminoxidasemangel *Allergologie* **9**: 426-30.
9. Jarisch Reinhart, Histamin-Intoleranz. **1. Auflage** (1999), *Thieme-Verlag*, Stuttgart

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by