

IDK[®] DAO ELISA

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

*For the in vitro determination of DAO
in dried blood spots*

Gültig ab / Valid from 2015-07-22

REF K 8500DBS



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. PROBENABNAHME UND -LAGERUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Vorbereitung der Trockenblutproben</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzbereiche</i>	9
<i>Heparinbehandlung</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</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 Trockenblutproben 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 Symp-tome einer Histamin-Intoleranz auf. Millionen von Menschen leiden nach dem Ge-nuss bestimmter Nahrungsmittel unter Beschwerden wie Magen-Darm-Problemen, Migräne, Reizungen der Nasenschleimhaut, sowie anderen allergieähnlichen Symp-tomen. Zuviel Histamin im Körper kann für dieses umfangreiche Beschwerdebild verantwortlich sein.

Eine Bestimmung der DAO-Konzentration in Serum (K 8500) oder Trockenblutpro-ben (K 8500DBS) zusammen mit einer Bestimmung der 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 Diaminooxidase in Trocken-blutproben.

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 8500DBS	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 8500DBS	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 5 x	4 x 100 ml
K 8500DBS	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationsangabe der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 8500DBS	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500DBS	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500DBS	AB	Detektionsantikörper (biotinyliert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8500DBS	CONJ	Konjugat (Streptavidin, peroxidase- markiert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8500DBS	ABBUF	Verdünnungspuffer für AB und CONJ, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8500DBS	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, ge- brauchsfertig	1 x 50 ml
K 8500DBS	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8500DBS	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
- Zentrifuge, 3000 g

- 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 > 0,2µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≥ 18,2 MΩ 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 µl** 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 ml WASHBUF + 800 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Vor jedem Einsatz den verdünnten Waschpuffer gut mischen. Der **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:5 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8°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.

- Die lyophilisierten **Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards können nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers:** Das **Konzentrat des biotinylierten Detektionsantikörpers (AB)** wird vor Gebrauch **1:101** in **ABBUF** verdünnt (100 µl AB + 10 ml ABBUF). Das AB ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Der **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **ABBUF** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml ABBUF). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann 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. PROBENABNAHME UND -LAGERUNG

Wichtig: Eine Woche vor der Blutabnahme Antihistaminika absetzen. Die Patienten müssen nicht nüchtern sein. Damit der basale Wert vor Diäten und anderen therapeutischen Maßnahmen ermittelt werden kann, sollte auf eine histaminarme Diät verzichtet werden.

Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind für 3 Wochen bei Raumtemperatur stabil.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

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

Standards, 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 vom Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird ein polyklonaler mit Biotin markierter anti-DAO-Antikörper zugegeben. Der nächste Schritt ist die Zugabe des Streptavidin-POD-Konjugats, 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. Aus den ermittelten Standardwerten wird eine Standardkurve, optische Dichte (Absorption bei 450 nm) gegen Standardkonzentration, erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Vorbereitung der Trockenblutproben

Als Probenmaterial eignen sich **50 µl Vollblut**, die auf einen von Immundiagnostik freigegebenen Trockenprobenträger (wir empfehlen DrySpot-ID, Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) aufgetropft und vollständig getrocknet sind.

1.	1,5-ml-Reaktionsgefäße aus Polypropylen vorbeschriften.
2.	Filter aus Testbrief entnehmen (da es sich um potenziell infektiöses Material handeln könnte, bitte immer mit Handschuhen arbeiten).
3.	Filter in vorbeschriftetes Gefäß geben.
4.	400 µl Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) pro Probe zugeben und 20 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) stehen lassen.
5.	10 sec vortexen. Der Filter entfärbt sich hierbei.
6.	Die Proben 5 min bei 3000 g zentrifugieren, um Filterreste zu entfernen.

Pipettierschema

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der 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 verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl STD/Probe/CTRL in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Wells verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen pipettieren.

6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Wells verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem 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 Wells verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem 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 bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Proben

Die ermittelte DAO-Konzentration wird mit dem **Verdünnungsfaktor 6** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × 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

Folgende Referenzbereiche sind in „Histamin-Intoleranz“, herausgegeben von Reinhardt Jarisch, 2. Auflage, Thieme-Verlag, publiziert:

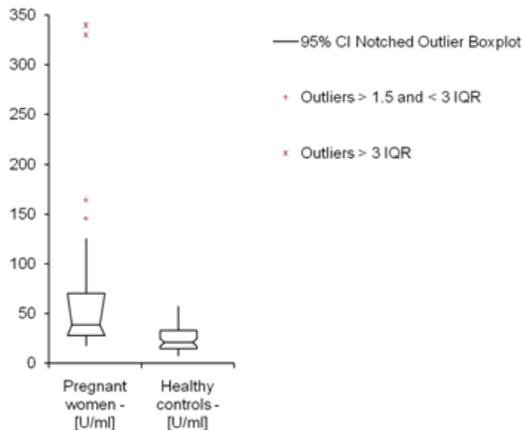
- < 3 U/ml: HIT (Histaminintoleranz) anzunehmen
- 3–10 U/ml: HIT wahrscheinlich
- > 10 U/ml: HIT wenig wahrscheinlich

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 Heparin-gabe 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 Heparin-gabe

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
H2-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

Intra-Assay (n = 28)

Probe	DAO [U/ml]	VK [%]
1	12,7	7,1
2	23,3	6,2

Inter-Assay (n = 10)

Probe	DAO [U/ml]	VK [%]
1	22,2	6,4
2	11,9	9,3

Analytische Sensitivität

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	0,0786 U/ml
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	0,120 U/ml
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,119 U/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie:EP-17-A durchgeführt.

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. **2. Auflage** (2004), *Thieme-Verlag*, Stuttgart

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



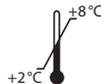
Verwendbar bis

IDK[®] DAO ELISA

*For the in vitro determination of DAO
in dried blood spot*

Valid from 2015-07-22

REF K 8500DBS



IVD



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 COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Preparation of the dried blood spots</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
<i>Heparin treatment</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Precision and reproducibility</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	27

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of diamine oxidase (DAO) in dried blood spots. 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 8500) 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 8500DBS	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8500DBS	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 5 x	4 x 100 ml
K 8500DBS	STD	Standards, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 5 vials

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 8500DBS	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8500DBS	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8500DBS	AB	Detection antibody, (biotinylated), concentrate	1 x 200 µl
K 8500DBS	CONJ	Conjugate (Streptavidin, peroxidase-labeled), concentrate	1 x 200 µl
K 8500DBS	ABBUF	Dilution buffer for AB und CONJ, ready to use	1 x 50 ml
K 8500DBS	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 8500DBS	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 8500DBS	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 purchase order number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Standard laboratory reaction vessels made of polypropylene (1.5 ml)
- Standard laboratory reaction vessel (15 ml)
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g
- 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 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. Mix the wash buffer well before each use. **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 **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) 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 standards are not stable.**
- **Preparation of the detection antibody:** Before use, the **biotinylated antibody concentrate (AB)** must be diluted **1:101** in ABBUF (100 µl AB + 10 ml ABBUF). The AB is stable at **2–8°C** until expiry date stated on the label. **The detection antibody** (1:101 diluted AB) **is not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** must be diluted **1:101** in ABBUF (100 µl CONJ + 10 ml ABBUF). The CONJ is stable at **2–8°C** until expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is 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 COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION

Important: Stop antihistamine medication one week before blood sample collection. Patients do not have to have fasted. In order to estimate the basal value necessary for evaluation of the effects of diet or other therapeutic treatments, low-histamine diet should be avoided.

We recommend DrySpot-ID (catalogue no DZ9020ID or DZ9021ID) as dried blood spot carrier. The moistened cards are stable for 3 weeks at room temperature.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

Standards, 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 peroxidase conjugate is added and a sandwich of

1st antibody – DAO – biotinylated antibody – streptavidin peroxidase 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. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard.

Preparation of the dried blood spots

50 µl whole blood dripped on a dried sample carrier cleared by Immundiagnostik are suitable as sample material after complete drying. We recommend DrySpot-ID (catalogue no DZ9020ID or DZ9021ID) as dried blood spot carrier.

1.	Label 1,5- ml polypropylene tubes..
2.	Remove filter from sampling device (always wear gloves since the sample is potentially infectious).
3.	Put filter in a labelled tube.

4.	Add 400 µl sample dilution buffer (SAMPLEBUF) per sample, allow sample to stand for 20 min at room temperature (15–30 °C).
5.	Vortex for 10 sec . The filter will decolorise.
6.	Centrifuge the samples for 5 min at 3000 g to remove residual filter pieces.

Test procedure

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered 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.

4.	Discard the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
5.	Add 100 µl of STD (standards)/ SAMPLE/CTRL (controls) into respective well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at 37 °C on a horizontal mixer..
7.	Discard the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
8.	Add 100 µl of AB (detection antibody) 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. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
11.	Add 100 µl of conjugate into each well.

12.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37°C on a horizontal mixer .
13.	Discard the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
14.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
15.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (15–30°C) in the dark .
16.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, shake well.
17.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

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 6**.

9. LIMITATIONS

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

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

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

highest concentration of the standard 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 analysis 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

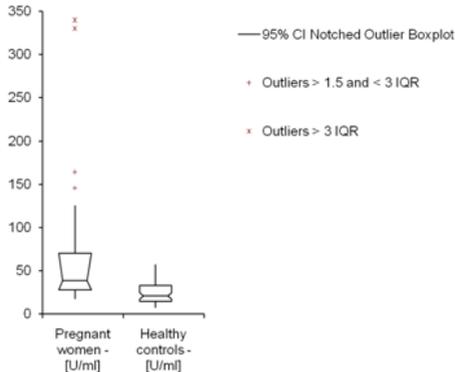
> 10 U/ml: low incidence for HIT

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 becau-

se 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 = 28)

Sample	DAO [U/ml]	CV [%]
1	12.7	7.1
2	23.3	6.2

Inter-Assay (n = 10)

Sample	DAO [U/ml]	CV [%]
1	22.2	6.4
2	11.9	9.3

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 0,0786 U/ml

Limit of detection, LoD 0,120 U/ml

Limit of quantitation, LoQ 0,119 U/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie:EP-17-A durchgeführt.

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 Millenium. *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. **2. Auflage** (2004), *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