

IDK[®] DAO ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2022-07-18

REF K 8500

Σ
96

+2°C
+8°C

IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Präanalytik</i>	5
<i>Serum</i>	5
<i>Trockenblut</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzbereiche</i>	9
<i>Heparinbehandlung</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	12
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	12
<i>Linearität</i>	13
<i>Analytische Sensitivität</i>	14
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
13. TECHNISCHE MERKMALE	15
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	16
15. LITERATUR	16

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Diaminoxidase (DAO) in Serum und 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 Abbaugeschwindigkeit 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 8500) 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.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8500	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8500	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 8500	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500	AB	Detektionsantikörperkonzentrat, biotinyliert	1 x 200 µl
K 8500	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert (Streptavidin)	1 x 200 µl
K 8500	ABBUF	Verdünnungspuffer für AB und CONJ, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8500	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	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

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Laborübliche Reaktionsgefäße aus Polypropylen 1,5 ml (Einmalartikel)
- Laborübliches Reaktionsgefäß 15ml (Einmalartikel)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Thermoschüttler für Mikrotiterplatten für 37°C (z.B. Modell Shake ID2 erhältlich bei Immundiagnostik AG)
- 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 µm) 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 auf dem Etikett angegeben 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 **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das bei **2–8°C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich

gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**

- **Vorbereitung des Konjugats und Detektionsantikörpers:** Das **Konjugat-konzentrat (CONJ)** und das **Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** werden unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Verdünnungspuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml ABBUF), (100 µl AB + 10 ml ABBUF). Das CONJ und das AB sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) und **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes AB) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Präanalytik

Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.

Serum

Lagerung und Stabilität der Serumproben

Die Proben können **6 Monate bei -20 °C** gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Bei **Raumtemperatur** sind die Proben bis zu **4 Tage**, bei **2-8 °C** bis zu **9 Tage** stabil.

Vorbereitung der Serumproben

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:5** verdünnt, z. B.:

50 µl Probe + **200 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

100 µl der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Trockenblut

Trockenblutgewinnung und -lagerung

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

Vorbereitung der Trockenblutproben

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von DAO in Serum und Trockenblutproben. Es werden polyklonale Antikörper, die gegen die rekombinante DAO generiert wurden, verwendet.

Standards, Kontrollen und vorbereitete 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 Primäntikörper 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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der 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.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/vorbereitete Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Detektionsantikörper (verdünntes AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln* inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut 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.

* Wir empfehlen die Streifen bei 700 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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

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.

Serum

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Faktor 6** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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) können 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 Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereiche

< 3 U/ml: HIT (Histaminintoleranz) anzunehmen

3–10 U/ml: HIT wahrscheinlich

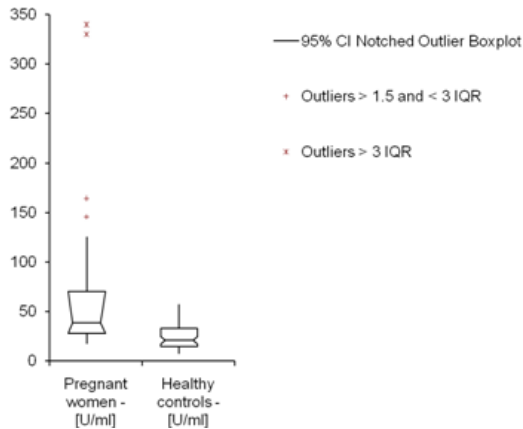
> 10 U/ml: HIT wenig wahrscheinlich

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 Substrat, z. B. der DAO REA, K 8220.2, 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, son-

den 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 verminderte 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

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 22

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [U/ml]	VK [%]
1	19,98	2,2
2	3,84	5,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 20

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [U/ml]	VK [%]
1	2,98	9,0
2	11,26	8,9
3	23,58	8,7

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 4 Serumproben wurden dafür mit bekannten DAO-Konzentrationen versetzt und gemessen. Die Proben wurden durch das Spike-Volumen verdünnt. Dies wurde bei der Berechnung der erwarteten Werte berücksichtigt.

Probe [U/ml]	Spike [U/ml]	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]	Wiederfindung [%]
4,72	5,0	9,24	9,93	107,41
	2,5	6,98	6,89	98,64
	1,5	6,07	5,93	97,69
12,75	5,0	16,47	16,91	102,67
	2,5	14,61	14,21	97,24
	1,5	13,87	13,14	94,79

Probe [U/ml]	Spike [U/ml]	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]	Wiederfindung [%]
5,10	5,0	9,59	8,54	89,02
	2,5	7,34	6,59	89,75
	1,5	6,45	6,06	93,98
6,59	5,0	10,93	11,76	107,60
	2,5	8,76	8,89	101,52
	1,5	7,89	7,90	100,18

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 5 Serumproben nachgewiesen.

Für DAO in Serum wurde Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ein lineares Verhalten im Bereich von 0,41 bis 9,18 U/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]	Wiederfindung [%]
1	1:5	9,18	9,18	100,00
	1:10	4,59	4,63	100,82
	1:20	2,29	2,29	100,04
	1:40	1,15	1,18	102,66
2	1:5	3,30	3,30	100,00
	1:10	1,65	1,72	104,52
	1:20	0,82	0,88	106,58
	1:40	0,41	0,45	110,22
3	1:5	6,35	6,35	100,00
	1:10	3,17	3,14	98,90
	1:20	1,59	1,88	118,59
	1:40	0,79	0,94	118,82
4	1:10	5,78	5,76	99,57
	1:20	2,89	3,30	113,99
	1:40	1,45	1,79	123,58

Probe	Verdünnung	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]	Wiederfindung [%]
5	1:10	6,92	6,82	98,57
	1:20	3,46	3,96	114,38
	1:40	1,73	2,09	120,98

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,067 U/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,130 U/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,195 U/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem Kit beigelegten 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 for 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:

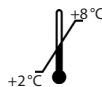
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IDK[®] DAO ELISA

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

Valid from 2022-07-18

REF K 8500



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	21
2. INTRODUCTION	21
3. MATERIAL SUPPLIED	22
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	23
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	24
<i>Preanalytic handling</i>	24
<i>Serum</i>	24
<i>Dried blood spots</i>	24
7. ASSAY PROCEDURE	25
<i>Principle of the test</i>	25
<i>Test procedure</i>	25
8. RESULTS	26
9. LIMITATIONS	27
10. QUALITY CONTROL	28
<i>Reference range</i>	28
<i>Heparin treatment</i>	28
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	30
<i>Accuracy – Precision</i>	30
<i>Accuracy – Trueness</i>	30
<i>Linearity</i>	31
<i>Analytical sensitivity</i>	32
12. PRECAUTIONS	32
13. TECHNICAL HINTS	33
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	33
15. REFERENCES	34

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of diamine oxidase (DAO) in serum and dried blood spots.

For *in vitro* diagnostic use only

2. INTRODUCTION

Diamine oxidase (DAO) is a body's own enzyme that metabolises 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	Label	Kit Components	Quantity
K 8500	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 8500	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 5 vials
K 8500	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 8500	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 8500	AB	Detection antibody concentrate , biotinylated	1 x 200 µl
K 8500	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled (streptavidin)	1 x 200 µl
K 8500	ABBUF	Dilution buffer for AB and CONJ, ready-to-use	1 x 50 ml
K 8500	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 50 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	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

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Standard laboratory reaction vessels 1.5 ml (single-use)
- Standard laboratory reaction vessel (15 ml) (single-use)
- Foil to cover the microtiter plate
- Centrifuge, 3000 g
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Microtiter plate thermoshaker at 37 °C (for example model Shake ID2 available at Immundiagnostik AG)

- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)
 - * Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 MΩcm).

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)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl sample dilution buffer (SAMPLEBUF)** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate and the detection antibody:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** and the **detection antibody concentrate (AB)** have to 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 the 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) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Preanalytic handling

Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.

Serum

Sample storage

The samples can be stored for **6 months at -20°C**. Avoid repeated freezing and thawing. The samples are stable at **room temperature** for up to **4 days** and at **2-8°C** for up to **9 days**.

Sample preparation

Serum samples must be diluted **1:5** before performing the assay,

e.g. **50 µl** sample + **200 µl** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

100 µl of the dilution are used in the test per well.

Dried blood spots

Collection and storage of dried blood spots

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

Preparation of the dried blood samples

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 decolourise.
6.	Centrifuge the samples for 5 min at 3000 g to remove residual filter pieces.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of DAO in serum and dried blood spots. The assay utilises the sandwich technique with two polyclonal antibodies against recombinant DAO.

Standards, controls and prepared 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 immobilised 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 colour is directly proportional to the concentration of DAO. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. DAO, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the 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.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/prepared samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 2 hours at 37°C on a horizontal shaker* .

4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) into each well, mix gently.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker* .
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 conjugate (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker** .
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 substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
14.	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.

* We recommend shaking the strips at 700 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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.

Serum

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 5** to get the actual concentrations.

Dried blood spots

The obtained results have to be multiplied by the **factor of 6** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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 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

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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

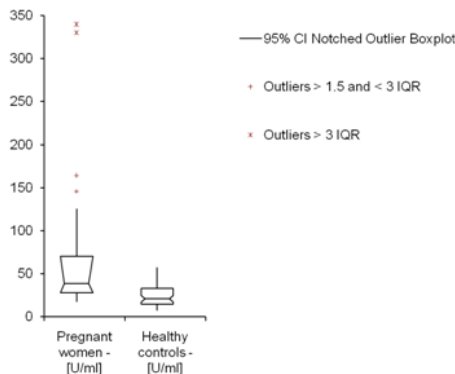
< 3 U/ml:	high incidence for HIT (Histamine intolerance)
3 - 10 U/ml:	HIT probable
> 10 U/ml:	low incidence for HIT

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 analysed 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 substrate, e.g. DAO REA, K 8220.2, 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

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 22

The repeatability was assessed with 2 serum samples under constant parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [U/ml]	CV [%]
1	19.98	2.2
2	3.84	5.0

Reproducibility (Inter-Assay); n = 20

The reproducibility was assessed with 3 serum samples under varying parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [U/ml]	CV [%]
1	2.98	9.0
2	11.26	8.9
3	23.58	8.7

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, DAO-spikes with known concentrations were added to 4 different serum samples. The samples were diluted by the volume of the spike. This was considered when calculating the expected values.

Sample [U/ml]	Spike [U/ml]	Expected [U/ml]	Obtained [U/ml]	Recovery [%]
4.72	5.0	9.24	9.93	107.41
	2.5	6.98	6.89	98.64
	1.5	6.07	5.93	97.69
12.75	5.0	16.47	16.91	102.67
	2.5	14.61	14.21	97.24
	1.5	13.87	13.14	94.79
5.10	5.0	9.59	8.54	89.02
	2.5	7.34	6.59	89.75
	1.5	6.45	6.06	93.98
6.59	5.0	10.93	11.76	107.60
	2.5	8.76	8.89	101.52
	1.5	7.89	7.90	100.18

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline

EP06-A with a serial dilution of 5 different serum samples.

For DAO in serum, the method has been demonstrated to be linear from 0.41 to 9.18 U/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [U/ml]	Obtained [U/ml]	Recovery [%]
1	1:5	9.18	9.18	100.00
	1:10	4.59	4.63	100.82
	1:20	2.29	2.29	100.04
	1:40	1.15	1.18	102.66
2	1:5	3.30	3.30	100.00
	1:10	1.65	1.72	104.52
	1:20	0.82	0.88	106.58
	1:40	0.41	0.45	110.22

Sample	Dilution	Expected [U/ml]	Obtained [U/ml]	Recovery [%]
3	1:5	6.35	6.35	100.00
	1:10	3.17	3.14	98.90
	1:20	1.59	1.88	118.59
	1:40	0.79	0.94	118.82
4	1:10	5.78	5.76	99.57
	1:20	2.89	3.30	113.99
	1:40	1.45	1.79	123.58
5	1:10	6.92	6.82	98.57
	1:20	3.46	3.96	114.38
	1:40	1.73	2.09	120.98

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	0.067 U/ml
Limit of detection, LoD	0.130 U/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.195 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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.

- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.
Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.
- 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 analysed 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 to 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 sent 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 for 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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

