

Arbeitsanleitung/Manual

# DAO ELISA

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

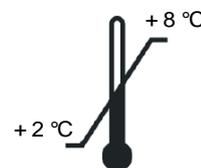
# DAO ELISA

*For the in vitro determination of DAO in serum*

Gültig ab/valid from 10.08.2011



K 8500



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## **1. VERWENDUNGSZWECK**

Dieser ELISA Test ist für die quantitative Bestimmung von Diaminoxidase (DAO) in Serum geeignet.

## **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 (K8500) zusammen mit einer Bestimmung der der DAO-Aktivität (K8220 DAO REA) stellt einen geeigneten Marker für die Differentialdiagnostik der Histamin-Intoleranz und damit assoziierter Krankheitsbilder dar.

Unser DAO-ELISA bestimmt die Konzentration der Diaminoxidase in Serum.

### **Indikationen**

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

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 8500MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 8500WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 5x	4 x 100 ml
K 8500ST	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationsangabe der Spezifikation entnehmen)	4 x 7 vials
K 8500KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500A2	AB	Detektionsantikörper (biotinyliert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8500K	CONJ	Konjugat (Streptavidin Peroxidase markiert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8500VP	ABBUF	Verdünnungspuffer für AB und CONJ, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8500SV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 8500PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8500TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8500AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Laborübliche Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1.5 ml)
- Laborübliches Reaktionsgefäß (15 ml)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Vortex-Mixer
- Reinstwasser\*
- Inkubator bei 37°C mit Schüttelfunktion
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

\*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 0,055µS/cm bei 25°C (≤18,2MΩ cm).

## 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) 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**. Das WASHBUF (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

### **Achtung:**

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

- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** STDBUF (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards können **nicht** gelagert werden.
- Der **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) und das **CONJ** (Konjugat, POD-markiert) werden **1:101** in **ABBUF** verdünnt (z. B. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). Unverdünnte AB und CONJ sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper und verdünntes Konjugat sind nicht stabil und können **nicht** aufbewahrt werden.

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

## 6. PROBENVORBEREITUNG

**25 µl** frische Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren, mit **225 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) versetzen und gut mischen (entspricht einer **1:10 Verdünnung**).

## 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 von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann ein polyklonaler mit Biotin markierter anti-DAO Antikörper, zugegeben. Der nächste Schritt ist die Zugabe des Streptavidin-POD-Konjugats und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

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

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem DAO-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

## Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2.	Positionen für <b>STD</b> (Standard)/ <b>PROBE/CTRL</b> (Kontrollen) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
3.	Benötigte <b>PLATE</b> (Mikrotiterstreifen) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.
4.	Mikrotiterstreifen <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	<b>100 µl STD /PROBE/CTRL</b> in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>2 Stunden bei 37° C</b> unter Schütteln inkubieren
7.	Inhalt der Wells verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8.	<b>100 µl AB</b> (Detektionsantikörper /2.Antikörper) in alle Wells pipettieren
9.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei 37° C</b> unter Schütteln inkubieren
10.	Inhalt der Wells verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen

11. <b>100 µl CONJ</b> (Konjugat) in alle Wells pipettieren
12. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei 37° C</b> unter Schütteln inkubieren
13. Inhalt der Wells verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. <b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Wells pipettieren
15. <b>10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur</b> (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
16. <b>50 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Wells pipettieren, mischen
17. <b>Extinktion</b> sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von <b>450 nm</b> messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards ( <b>STD</b> ) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von <b>405 nm</b> wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

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

## 8. ERGEBNISSE

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. 0.01).

### 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 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. 0.01).

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 Faktor **10** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen DAO Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) stärker verdünnt und nochmals analysiert.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

## Erwartete Ergebnisse

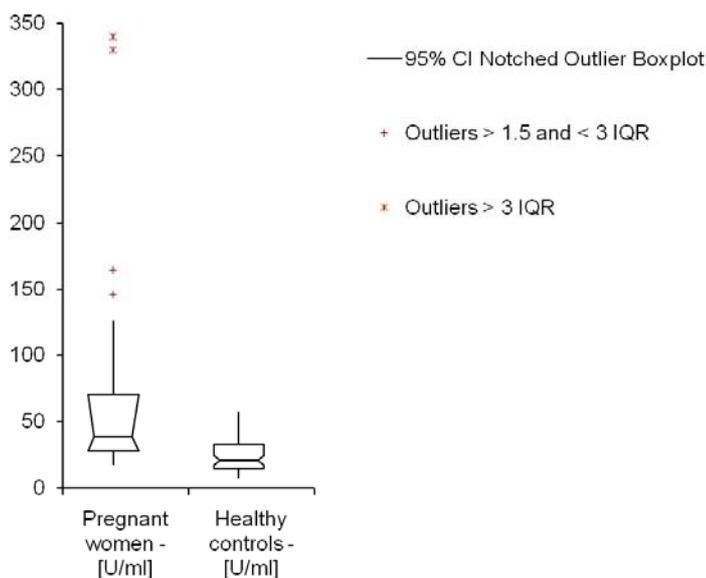
### Normbereich

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

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich 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 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“

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 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 B12, 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 Co-Faktoren.

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*

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 16 mal in einem DAO ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 16

Probe	DAO [U/ml]	Intra-Assay V <sub>k</sub> [%]
1	5,0	1,42
2	5,9	1,72

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 8 mal an drei verschiedenen Tagen von verschiedenen Personen im DAO ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 8

Probe	DAO [U/ml]	Inter-Assay V <sub>k</sub> [%]
1	23,27	7,9
2	13,36	10,7

### Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 3 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20 mal der Standard Null.

Nachweisgrenze n=20

Probe	Mittelwert [OD]	Standardabweichung	Nachweisgrenze [U/ml]
1	0,019	0,0036	0,52

### Linearität

Zwei Proben unterschiedlicher Konzentrationen wurden auf Verdünnungsgerechtigkeit überprüft.

Linearität n= 2

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

## **12. VORSICHTSMASSNAHMEN**

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen 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 Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

## **13. TECHNISCHE MERKMALE**

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt 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.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## **14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST**

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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, zurück zu senden.

## **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 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 R (1999) *Histamin Intoleranz*. Stuttgart, Thieme

**Verwendete Symbole:**



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

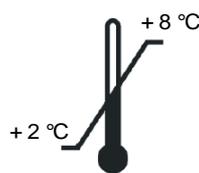
# DAO ELISA

*For the in vitro determination of DAO in serum*

Valid from 10.08.2011



K 8500



## **1. INTENDED USE**

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of diamine oxidase (DAO) in serum.

## **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 (K8500) combined with the determination of DAO activity (K8220 DAO REA) is a suitable marker for the differential diagnosis of histamine intolerance and associated symptoms.

Our 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 8500MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8500WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 5x	4 x 100 ml
K 8500ST	STD	Standards, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 7 vials
K 8500KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8500KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8500A2	AB	Detection antibody, (biotinylated), concentrate	1 x 200 µl
K 8500K	CONJ	Conjugate (Streptavidin, peroxidase-labeled), concentrate	1 x 200 µl
K 8500VP	ABBUF	Dilution buffer for AB und CONJ, ready to use	1 x 50 ml
K 8500SV	STDBUF	Standard dilution buffer, ready to use	1 x 25 ml
K 8500PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 8500TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 8500AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Standard laboratory reaction vessels (1.5 ml)
- Standard laboratory reaction vessel (15 ml)
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Vortex mixer
- Ultra pure water\*
- Shaking incubator at 37°C
- Microtiter plate reader at 450 nm

\*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 0,055µS/cm at 25°C (≤18,2MΩ cm).

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** 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.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with ultra pure water **1:5** before use (200 ml WASHBUF + 800 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. **Mix well the diluted wash buffer before each use.** The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** 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 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 STDBUF** (standard 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**.
- The **AB** (detection antibody, biotinylated) and the **CONJ** (conjugate, POD-antibody) must be diluted **1:101** in **ABBUF** (e.g. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). The undiluted AB and CONJ are stable at **2-8 °C** until the expiry date given on the label. Diluted antibody and conjugate are **not stable** and cannot be stored.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

## 6. SAMPLE PREPARATION

Pipet **25 µl** of fresh sample in a 1,5 ml reaction vial, add **225 µl SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) and mix well (corresponds to **1:10 dilution**).

## 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-POD-conjugate is added and a “sandwich” of

1<sup>st</sup> antibody – DAO - biotinylated antibody – streptavidin-POD-conjugate

is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of DAO. 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.

### Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature and mix by gentle swirling and inversion.
2.	Mark the positions of <b>STD</b> (Standards)/ <b>SAMPLE/CTRL</b> (Controls) in duplicate on a protocol sheet
3.	Take <b>PLATE</b> (microtiter strips) out of the kit. Store unused strips in the original package bag at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4.	Wash the wells <b>5x with 250 µl</b> of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
5.	Add <b>100 µl of STD</b> (Standards)/ <b>SAMPLE/CTRL</b> (Controls) in duplicate into respective well
6.	Cover the plate tightly and incubate for <b>2 hours at 37° C</b> on a horizontal mixer
7.	Aspirate and wash the wells <b>5x with 250 µl</b> of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
8.	Add <b>100 µl of AB</b> (Detection antibody, 2nd Antibody) into each wells mix gently
9.	Cover the plate tightly and <b>incubate for 1 hour at 37° C</b> on a horizontal mixer

10.	Aspirate and wash the wells <b>5x with 250 µl</b> of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
11.	Add <b>100 µl of CONJ</b> (Conjugate) into each well
12.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour at 37° C</b> on a horizontal mixer
13.	Aspirate and wash the wells <b>5x with 250 µl</b> of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
14.	Add <b>100 µl of SUB</b> (Substrate) into each well
15.	Incubate for <b>10 - 20 minutes at room temperature</b> (18-26°C) in the dark
16.	Add <b>50 µl of STOP</b> (Stop solution) into each well, shake well
17.	Determine <b>absorption</b> immediately with an ELISA reader at <b>450 nm</b> . If the highest extinction of the standards ( <b>STD</b> ) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used

\*The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop 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 calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

### 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 logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

## Samples

The obtained DAO concentration must be multiplied by a factor of **10**.

## 9. LIMITATIONS

Samples with DAO concentrations **outside the standard curve** range should be diluted further with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) to obtain readings within the standard curve and re-assayed.

## 10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed 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.

## Expected values

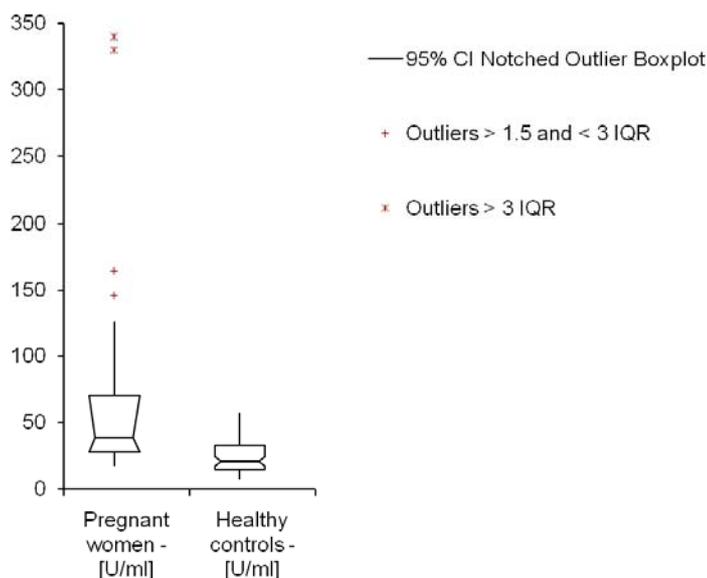
### Normal range

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

It is recommended for each laboratory to establish its own normal 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 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

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

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

### Medication effects

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

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

Drugs influencing

gut motility

Metoclopramide

Antibiotics

Cefuroxime, cefotiam, isoniazid, pentamidin,  
clavulanic acid, choroquine

Mucolytics

Acetylcysteine, ambroxol

Broncholytics

Aminophylline

H<sub>2</sub>-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*

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

Intra-Assay CV n= 16

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

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

Inter-Assay CV n= 8

Sample	DAO [U/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	23.27	7.9
2	13.36	10.7

### Sensitivity

The sensitivity limit was set as  $B_0 + 3 \text{ SD}$ . The Zero-standard was measured 20 times.

Sensitivity n=20

Sample	Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [U/ml]
1	0.019	0.0036	0.52

### Sample dilution

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

Linearity n= 2

Sample	Dilution	Expected [U/ml]	Measured [U/ml]
<b>A</b>	undiluted	15,65	15,65
	1:10	7,83	7,68
	1:20	3,92	3,86
	1:40	1,96	1,86
<b>B</b>	undiluted	5,58	5,58
	1:10	2,79	2,89
	1:20	1,39	1,45
	1:40	0,7	0,7

## **12. PRECAUTIONS**

- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

## **13. TECHNICAL HINTS**

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing 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 put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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 wrong use.

- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together 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 R (1999) *Histamin Intoleranz*. Stuttgart, Thieme

**Used symbols:**



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number