

IDK[®] Kynurenin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von L-Kynurenin in
humanen Trockenblutproben*

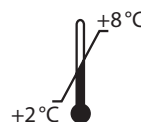
IDK[®] Kynurenine ELISA

*For the in vitro determination of L-kynurenine in
human dried blood samples*

Gültig ab / Valid from 2016-12-27



K 7728DBS



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 | 2 |
| 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 3 |
| 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN | 3 |
| 6. PROBENVORBEREITUNG | 4 |
| 7. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Testprinzip</i> | 5 |
| <i>Pipettierschema Derivatisierung</i> | 5 |
| <i>Pipettierschema Testdurchführung</i> | 6 |
| 8. ERGEBNISSE | 7 |
| 9. EINSCHRÄNKUNGEN | 8 |
| 10. QUALITÄTSKONTROLLE | 8 |
| <i>Referenzwerte</i> | 9 |
| 11. TESTCHARAKTERISTIKA | 9 |
| <i>Analytische Sensitivität</i> | 9 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 9 |
| 12. VORSICHTSMASSNAHMEN | 9 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 10 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 10 |
| 15. LITERATUR | 11 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von L-Kynurenin in humanen Trockenblutproben geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

L-Kynurenin entsteht als Hauptprodukt bei dem durch Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysierten Abbau von L-Tryptophan.

L-Kynurenin spielt als Immunsuppressor eine zentrale Rolle für den Verlauf von Infektionskrankheiten (HIV [1], Tuberkulose [14], Borreliose [10] etc.) aber auch malignen Erkrankungen (Kolorektalem Karzinom [2], Lungenkrebs [5, 4], Leukämie [8], Hodgkin-Lymphom [3] und Gebärmutterhalskrebs [7]). Erhöhte Spiegel weisen dabei stets auf eine schlechte Prognose hin, weshalb der Kynureninspiegel als Marker für den klinischen Verlauf der Krankheiten herangezogen werden kann.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|-----------|-------------|--|---------------------|
| K 7728DBS | PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 7728DBS | STD | Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen) | 1 x 6 vials |
| K 7728DBS | CTRL 1 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 1 x 1 vial |
| K 7728DBS | CTRL 2 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 1 x 1 vial |
| K 7728DBS | WASHBUF | ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml |
| K 7728DBS | AB | L-Kynurenin-Antikörper, lyophilisiert | 2 x 1 vial |
| K 7728DBS | CONJ | Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert | 1 x 65 µl |
| K 7728DBS | CONJBUF | Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig | 1 x 13 ml |
| K 7728DBS | REABUF | Reaktionspuffer, gebrauchsfertig | 2 x 28 ml |
| K 7728DBS | DER | Lyophilisiertes Derivatisierungsreagenz | 4 x 25 mg |
| K 7728DBS | DMSO | Dimethylsulfoxid (DMSO) | 1 x 7 ml |

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|-----------|-------------|--|-----------|
| K 7728DBS | SUB | TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 7728DBS | 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

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- 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 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 zentrifugiert 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 **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt 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. STDs und CTRLs werden mit **200 µl Reaktionspuffer (REABUF)** rekonstituiert, gut gemischt und zum Lösen **15 min** auf einen Horizontalschüttler gestellt. Standards und Kontrollen (rekonstituierte STD und CTRL) können eingefroren bei **-20 °C** aufbewahrt werden.
- **DMSO** kristallisiert bei 4 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen, um die Kristalle zu lösen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **lyophilisierten Derivatisierungsreagenz (DER) (25 mg)** wird in **1,5 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Das Derivatisierungsreagenz sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **lyophilisierter L-Kynurenin-Antikörper (AB)** wird in **3 ml Waschpuffer** gelöst. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. **L-Kynurenin-Antikörper** (rekonstituierter AB) kann **1 Monat bei -20 °C** aufbewahrt werden.
- Das **Peroxidase-Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird **1:201 in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (z. B. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF; nur die benötigte Menge ansetzen). Das Konzentrat ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:201 verdünntes CONJ) kann **1 Woche bei 2–8 °C** 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

Die Proben werden unverdünnt im Test eingesetzt.

Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind für 6 Tage bei Raumtemperatur stabil.

Das die getrocknete Probe enthaltende **Filterpapier** in ein 1,5-ml-Plastikröhrchen geben. Danach **500 µl Reaktionspuffer (REABUF)** dazugeben und gründlich mi-

schen. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren. Nach Ende der Inkubationszeit wiederum gründlich mischen.

Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen L-Kynurenin versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Kynurenin versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen Kynurenin-Antiserum in einer mit L-Kynurenin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zur Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidase markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen L-Kynurenin-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. 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 umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender L-Kynurenin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

Pipettierschema Derivatisierung

Die Derivatisierung aller Standards, Kontrollen und Proben erfolgt in Mikroreaktionsgefäßen (z. B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße).

Wir empfehlen, pro Probe, Standard und Kontrolle je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufzutragen.

| | |
|----|--|
| 1. | Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen. |
| 2. | Jeweils 25 µl Standard oder Kontrolle in Mikroreaktionsgefäße pipettieren. |
| 3. | 500 µl Reaktionspuffer (REABUF) zu den Standards und Kontrollen pipettieren. |
| 4. | 50 µl frisch angesetztes Derivatisierungsreagenz (rekonstituiertes DER) in alle Reaktionsgefäße (Standards, Kontrollen, Trockenblutproben) pipettieren und gründlich mischen (z. B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen). Auf einem Horizontalschüttler 45 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren. |
| 5. | Die Mikroreaktionsgefäße mit den Trockenblutproben anschließend 5 min bei 3000 g zentrifugieren. Im Folgenden mit dem Überstand weiterarbeiten. |

2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (Standards, Kontrollen, Proben) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

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

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.

| | |
|----|---|
| 6. | Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt markieren. |
| 7. | Die benötigten Mikrotiterstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden. |
| 8. | Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |

| | |
|-----|---|
| 9. | 50 µl der vorbereiteten derivatisierten Proben (Standards, Kontrollen, Proben) aus den Mikroreaktionsgefäßen in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren. |
| 10. | Je 50 µl L-Kynurenin-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren. |
| 11. | Mikrotiterstreifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren. |
| 12. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 13. | 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren. |
| 14. | Mikrotiterstreifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren. |
| 15. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 16. | 100 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren. |
| 17. | 12–18 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren* |
| 18. | 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen |
| 19. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (595 nm, 630nm, 650 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 (595 nm, 630nm, 650 nm oder 690 nm) gemessen werden. |

* 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.

Trockenblutproben

Die ermittelte Konzentration aus Trockenblutproben wird **mit dem Faktor 5 multipliziert**, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

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.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 70) wurde ein Mittelwert von 1,80 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 0,44 µmol/l.

Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: 1,8 ± 0,88 µmol/l

Normalbereich: 0,92–2,68 µmol/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,081 µmol/l

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

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

| Probe | L-Kynurenin [µmol/l] | Vk [%] |
|-------|----------------------|--------|
| 1 | 2,2 | 9,9 |
| 2 | 2,9 | 7,6 |

Inter-Assay (n = 20)

| Probe | L-Kynurenin [µmol/l] | Vk [%] |
|-------|----------------------|--------|
| 1 | 2,98 | 12,90 |
| 2 | 5,00 | 10,23 |

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 emp-

fohlen, 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.
- 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. Bipath, P., Levay, P.F. & Viljoen, M., 2015. The kynurenine pathway activities in a sub-Saharan HIV/AIDS population. *BMC infectious diseases*, **15**(1), p.346.
2. Cavia-Saiz, M. et al., 2014. The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Molecular biology reports*, **41**(4), pp.2275–9.
3. Choe, J.-Y. et al., 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: a retrospective cohort study. *BMC cancer*, **14**(1), p.335.
4. Chuang, S.-C. et al., 2014. Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **23**(3), pp.461–8.
5. Creelan, B.C. et al., 2013. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, **2**(3), p.e23428.
6. Eussen, S.J.P.M. et al., 2015. Kynurenines as predictors of acute coronary events in the Hordaland Health Study. *International journal of cardiology*, **189**, pp.18–24.
7. Ferns, D.M. et al., 2015. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*, **4**(2), p.e981457.
8. Folgiero, V. et al., 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, **5**(8), pp.2052–64.

9. Gupta, N.K. et al., 2012. Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflammatory bowel diseases*, **18**(7), pp.1214–20.
10. Love, A.C., Schwartz, I. & Petzke, M.M., 2015. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *Journal of leukocyte biology*, **97**(2), pp.379–90.
11. Pedersen, E.R. et al., 2013. Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *European heart journal*, **34**(34), pp.2689–96.
12. Ristagno, G. et al., 2014. Early activation of the kynurenine pathway predicts early death and long-term outcome in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest. *Journal of the American Heart Association*, **3**(4), pp.e001094–e001094.
13. Sulo, G. et al., 2013. Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *International journal of cardiology*, **168**(2), pp.1435–40.
14. Suzuki, Y. et al., 2012. Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **19**(3), pp.436–42.

Verwendete Symbole:

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

Manual

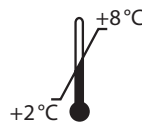
IDK[®] Kynurenine ELISA

*For the in vitro determination of L-kynurenine in
human dried blood samples*

Valid from 2016-12-27



K 7728DBS



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 | 15 |
| 2. INTRODUCTION | 15 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 15 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 16 |
| 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 16 |
| 6. PREPARATION OF SAMPLES | 17 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 18 |
| <i>Principle of the test</i> | 18 |
| <i>Sample preparation procedure</i> | 18 |
| <i>Test procedure</i> | 19 |
| 8. RESULTS | 20 |
| 9. LIMITATIONS | 21 |
| 10. QUALITY CONTROL | 21 |
| <i>Reference range</i> | 21 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 21 |
| <i>Analytical Sensitivity</i> | 21 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 22 |
| 12. PRECAUTIONS | 22 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 22 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 23 |
| 15. REFERENCES | 23 |

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of L-kynurenine in human dried blood samples. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

L-kynurenine is the main product of the degradation of L-tryptophan, catalyzed by Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO).

L-kynurenine plays a key role as an immune suppressor in the course of infectious diseases (HIV [1], tuberculosis [14], borreliosis [10] etc.) and malignant diseases (colon cancer [2], lung cancer [5, 4], leukemia [8], Hodgkin lymphoma [3], cervical cancer [7]), where high kynurenine levels indicate a poor prognosis. Thus, L-kynurenine serves as a prognostic marker to predict the progression and the severity of the disease.

3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|-----------|---------|---|--------------|
| K 7728DBS | PLATE | Holder with precoated strips | 12 x 8 wells |
| K 7728DBS | STD | Standards, lyophilised (see specification for concentrations) | 1 x 6 vials |
| K 7728DBS | CTRL 1 | Control, lyophilised (see specification for range) | 1 x 1 vial |
| K 7728DBS | CTRL 2 | Control, lyophilised (see specification for range) | 1 x 1 vial |
| K 7728DBS | WASHBUF | ELISA wash buffer concentrate, 10x | 2 x 100 ml |
| K 7728DBS | AB | L-kynurenine antibody, lyophilised | 2 x 1 vial |
| K 7728DBS | CONJ | Conjugate concentrate, peroxidase-labelled | 1 x 65 µl |
| K 7728DBS | CONJBUF | Conjugate stabilizing buffer, ready-to-use | 1 x 13 ml |
| K 7728DBS | REABUF | Reaction buffer, ready-to-use | 2 x 28 ml |
| K 7728DBS | DER | Lyophilised derivatisation reagent | 4 x 25 mg |
| K 7728DBS | DMSO | Dimethylsulfoxide (DMSO) | 1 x 7 ml |
| K 7728DBS | SUB | TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use | 1 x 15 ml |

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|-----------|-------|-----------------------------------|-----------|
| K 7728DBS | STOP | ELISA stop solution, ready-to-use | 1 x 15 ml |

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- 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)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month.**
- The **lyophilised standards (STD) and controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, reconstitute the stand-

ards and controls with **200 µl reaction buffer (REABUF)**. Mix thoroughly and allow to dissolve for 15 min on a horizontal shaker. Standards and controls (reconstituted STD and CTRL) can be stored at **-20 °C**.

- **DMSO** crystallises at 4 °C. Before use, dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **lyophilised derivatization reagent (DER) (25 mg)** in **1.5 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. **Derivatisation reagent** (reconstituted DER) must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Reconstitute the content of **one vial of lyophilised L-kynurenine antibody (AB)** in **3 ml wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. **L-kynurenine antibody** (reconstituted AB) can be stored at **-20 °C for 1 month**.
- Dilute the **peroxidase conjugate concentrate (CONJ) 1:201 with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF)** (e.g. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF, prepare only the required amount). The CONJ is stable at 2–8 °C until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:201 diluted CONJ) can be stored at **2–8 °C for 1 week**.
- 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. PREPARATION OF SAMPLES

Samples are used undiluted.

We recommend DrySpot-ID (catalogue no DZ9020ID or DZ9021ID) as dried blood spot carrier. The moistened cards are stable for 6 days at room temperature.

Place the filter paper containing the dried sample in a 1.5 ml tube. Add **500 µl reaction buffer (REABUF)** and mix well. After incubation for 30 minutes at room temperature (15–30 °C) mix again well.

For sample preparation, a derivatisation reagent (DER) for derivatisation of L-kynurenine is added (details are given in the sample preparation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for L-kynurenine derivatization. Afterwards, the treated samples and a polyclonal L-kynurenine antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with L-kynurenine-derivative (tracer).

During the incubation period the target L-kynurenine in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies. The L-kynurenine in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the kynurenine concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-kynurenine antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the L-kynurenine concentration in the sample; this means, high L-kynurenine concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. L-kynurenine present in the patient samples is determined directly from this curve.

Sample preparation procedure

Derivatisation of standards, controls and samples is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials).

We recommend to prepare one derivatisation per standard, sample and control and pipet it in duplicate into the microtitre plate.

| | |
|----|--|
| 1. | Bring all reagents and samples to room temperature (15–30°C) and mix well. |
| 2. | Add each 25 µl standards or controls into the corresponding vials. |
| 3. | Add 500 µl reaction buffer (REABUF) to the vials of standards and controls. |

| | |
|----|---|
| 4. | Add 50 µl of freshly prepared derivatization reagent (reconstituted DER) into each vial (STD, CTRL, dried blood samples) and mix thoroughly, e. g. by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for 45 min at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker . |
| 5. | Centrifuge the vials containing the dried blood samples for 5 min at 3000 <i>g</i> . Use the supernatant for the following procedures. |

2 x 50 µl of each treated sample (standards, controls, samples) are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

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

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.

| | |
|-----|---|
| 6. | Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet . |
| 7. | 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. |
| 8. | Wash the microtiter strips 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the microtiter strips on absorbent paper.. |
| 9. | Add 50 µl of the derivatised standards/controls/ samples into the respective wells. |
| 10. | Add 50 µl L-kynurenine antibody into each well. |
| 11. | Cover the wells and incubate for 2 hours at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker . |
| 12. | Discard the contents 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 microtiter strips on absorbent paper.. |
| 13. | Add 100 µl conjugate into each well. |
| 14. | Cover the wells and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker . |

| | |
|-----|---|
| 15. | Discard the contents 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 microtiter strips on absorbent paper.. |
| 16. | Add 100 µl TMB substrate into each well. |
| 17. | Incubate for 12–18 min at room temperature (15–30 °C) in the dark* . |
| 18. | Add 100 µl ELISA stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly. |
| 19. | Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (595 nm, 630nm, 650 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 (595 nm, 630nm, 650 nm or 690 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.

Dried blood samples

The obtained results have to be multiplied with the **factor 5** to get the actual concentrations.

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

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

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

Based on internal studies with serum samples of apparently healthy persons a mean value of 1.80 µmol/l was estimated (n = 70). The standard deviation was 0.44 µmol/l.

Mean value ± 2x standard deviation: 1.8 ± 0.88 µmol/l

Normal range: 0.92–2.68 µmol/l

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 0.081 µmol/l

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

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

| Sample | L-kynurenine [$\mu\text{mol/l}$] | CV [%] |
|--------|------------------------------------|--------|
| 1 | 2.2 | 9.9 |
| 2 | 2.9 | 7.6 |

Inter-Assay (n = 20)

| Sample | L-kynurenine [$\mu\text{mol/l}$] | CV [%] |
|--------|------------------------------------|--------|
| 1 | 2.98 | 12.9 |
| 2 | 5.00 | 10.23 |

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.
- 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. Bipath, P., Levay, P.F. & Viljoen, M., 2015. The kynurenine pathway activities in a sub-Saharan HIV/AIDS population. *BMC infectious diseases*, **15**(1), p.346.
2. Cavia-Saiz, M. et al., 2014. The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Molecular biology reports*, **41**(4), pp.2275–9.
3. Choe, J.-Y. et al., 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: a retrospective cohort study. *BMC cancer*, **14**(1), p.335.
4. Chuang, S.-C. et al., 2014. Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **23**(3), pp.461–8.

5. Creelan, B.C. et al., 2013. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, **2**(3), p.e23428.
6. Eussen, S.J.P.M. et al., 2015. Kynurenines as predictors of acute coronary events in the Hordaland Health Study. *International journal of cardiology*, **189**, pp.18–24.
7. Ferns, D.M. et al., 2015. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*, **4**(2), p.e981457.
8. Folgiero, V. et al., 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, **5**(8), pp.2052–64.
9. Gupta, N.K. et al., 2012. Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflammatory bowel diseases*, **18**(7), pp.1214–20.
10. Love, A.C., Schwartz, I. & Petzke, M.M., 2015. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *Journal of leukocyte biology*, **97**(2), pp.379–90.
11. Pedersen, E.R. et al., 2013. Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *European heart journal*, **34**(34), pp.2689–96.
12. Ristagno, G. et al., 2014. Early activation of the kynurenine pathway predicts early death and long-term outcome in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest. *Journal of the American Heart Association*, **3**(4), pp.e001094–e001094.
13. Sulo, G. et al., 2013. Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *International journal of cardiology*, **168**(2), pp.1435–40.
14. Suzuki, Y. et al., 2012. Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **19**(3), pp.436–42.

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 | | |