

Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only

IDK[®] Kynurenin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von L-Kynurenin in
humanem EDTA-Plasma, Serum und Trockenblutproben*

IDK[®] Kynurenine ELISA

*For the in vitro determination of L-kynurenine in
human EDTA plasma, serum and dried blood spots*

Gültig ab / Valid from 2025-02-14

REF K 7728



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

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel HINWEISE UND VORSICHTSMASSAHMEN zu entnehmen.

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>EDTA-Plasma und Serumproben</i>	5
<i>Trockenblutproben</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
<i>Biotininterferenz</i>	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	11
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Spezifität</i>	13
12. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
15. LITERATUR	15
<i>Allgemeine Literatur</i>	15
<i>Publikationen mit dem Immundiagnostik IDK® Kynurenin ELISA</i>	16
16. SYMBOLE	17

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von L-Kynurenin in humanem EDTA-Plasma, Serum und Trockenblut geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

Für Proben von Nagern (Maus, Ratte) sowie Zellkulturüberstände und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) empfehlen wir unseren IDK® Kynurenin high sensitive ELISA KR3728.

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 (HIV¹, Tuberkulose², Borreliose³ etc.) aber auch malignen Erkrankungen (Kolorektalem Karzinom⁴, Lungenkrebs^{5, 6}, Leukämie⁷, Hodgkin Lymphom⁸ und Gebärmutterhalskrebs⁹). Erhöhte Spiegel weisen dabei stets auf eine schlechte Prognose hin, weshalb der Kynureninspiegel als Marker für den klinischen Verlauf der Krankheiten herangezogen werden kann.

¹ Bipath P et al. (2015) The kynurenine pathway activities in a sub-Saharan HIV/AIDS population. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):346.

² Suzuki Y et al. (2012) Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* p. 436-442

³ Love AC. et al. (2015) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *J Leukoc Biol* 97(2): 379–390.

⁴ Cavia-Saiz M. et al. (2014) The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 41:2275-2279

⁵ Creelan BC 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 (March) e23428

⁶ Chuang SC et al. (2014) Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23, 461-468

⁷ 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), 2052-64

⁸ Choe J 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), 1-9

⁹ Ferns DM et al. (2015) Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. Feb 25;4(2)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7728	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7728	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,2; 0,6; 2; 6; 20 µmol/l)	6 x 500 µl
K 7728	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 7728	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7728	AB	L-Kynurenin-Antikörper, lyophilisiert	1 x 1 vial
K 7728	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7728	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 110 ml
K 7728	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	4 x 25 mg
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 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*
- Trockenblutprobenträger
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer

- 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 je nach Probenaufkommen bis zu 4 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **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 Salzgehaltes 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.
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER)** (25 mg) wird mit **1,5 ml DMSO** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. Das DER 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 **lyophilisierte L-Kynurenin-Antikörper (AB)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der AB wird mit **6 ml Waschpuffer** rekonstituiert. **L-Kynurenin-Antikörper** (rekonstituierter AB) kann **2 Monate bei 2-8 °C** gelagert werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serumproben

In der Probe ist L-Kynurenin 3 Tage bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur stabil. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die EDTA-Plasma- und Serumproben werden **unverdünnt** im Test eingesetzt.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

Trockenblutproben

Als Probenmaterial eignen sich **50 µl Vollblut**, die auf einen von Immundiagnostik AG freigegebenen Trockenprobenträger aufgetropft und vollständig getrocknet sind. Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind 8 Tage bei Raumtemperatur stabil. Zur längeren Lagerung empfehlen wir, die Karten trocken bei -20°C aufbewahren.

Zur weiteren Probenvorbereitung wird die Probe derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von L-Kynurenin. 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. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidasemarkierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die L-Kynurenin-Antikörper bindet. Nach einem Waschschritt zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. 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

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

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der Proben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt.

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

EDTA-Plasma- und Serumproben, Standards und Kontrollen

1.	Jeweils 25 µl Standard (STD)/Kontrolle (CTRL)/Probe in beschriftete Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	500 µl Reaktionspuffer (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren.
3.	50 µl frisch angesetztes Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen.
4.	45 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Trockenblutproben, Standards und Kontrollen

1.	Filter aus Testbrief entnehmen und in beschriftete Reaktionsgefäße geben. 1 ml Reaktionspuffer (REABUF) zu den Trockenblutproben pipettieren, gründlich mischen. 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) stehen lassen, gründlich mischen.
----	--

2.	Jeweils 25 µl Standard (STD) bzw. Kontrolle (CTRL) in beschriftete Mikroreaktionsgefäße pipettieren. 1 ml Reaktionspuffer (REABUF) zu den Standards und Kontrollen pipettieren.
3.	50 µl frisch angesetztes Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen.
4.	45 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

5.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren
7.	50 µl L-Kynurenin-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren.
8.	Streifen luftdicht abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren, oder über Nacht bei 2-8 °C inkubieren.
9.	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.
10.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
11.	Streifen abdecken und 1 Stunde 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 Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
14.	10-15 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
15.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
16.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:

Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 45 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

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.

EDTA-Plasma und Serum

Es wird **kein Faktor** benötigt.

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

Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Faktor 2** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Kalibrierkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

Biotininterferenz

Proben, die Biotin in einer Konzentration von < 133 ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von ≤ 25 %. Höhere Biotinkonzentrationen können zu

falschen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die > 5 mg/Tag Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert werden.

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.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 100) wurde folgender Referenzbereich ermittelt:

Median:	1,6 µmol/l
2,5. Perzentile:	0,9 µmol/l
97,5. Perzentile:	2,5 µmol/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Plasma, Serum

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 14

Die Wiederholbarkeit wurde mit zwei Proben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge identisch) in Einzelbestimmungen bestimmt.

Probe	L-Kynurenin [µmol/l]	VK [%]
1	0,82	7,6
2	2,86	6,2

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 8

Die Reproduzierbarkeit wurde mit zwei Proben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge unterschiedlich) in Doppelbestimmungen bestimmt.

Probe	L-Kynurenin [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	0,80	9,2
2	2,80	6,2

Trockenblutproben**Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 10**

Die Wiederholbarkeit wurde mit zwei Proben auf jeweils 10 Trockenblutträgern unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge identisch) in Doppelbestimmung bestimmt.

Probe	L-Kynurenin [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	2,01	7,1
2	3,01	10,2

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 12

Die Reproduzierbarkeit wurde mit zwei Proben auf jeweils 12 Trockenblutträgern unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge unterschiedlich) in Doppelbestimmung bestimmt.

Probe	L-Kynurenin [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	1,22	12,6
2	2,78	8,9

Spike-Wiederfindung

Drei Serumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an L-Kynurenin versetzt und gemessen (n = 2). Die mittlere Wiederfindung betrug 102,5 %.

Probe [µmol/l]	Spike [µmol/l]	erwartet [µmol/l]	gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
2,48	1,5	3,98	4,49	112,8
	3,0	5,48	5,92	108,0
1,98	1,5	3,48	3,56	102,3
	3,0	4,98	4,81	96,6
2,03	1,5	3,53	3,45	97,7
	3,0	5,03	4,99	97,4

Wiederfindung in der Verdünnung

Drei Serumproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 100,3 % (n = 2).

Probe [µmol/l]	Verdünnung	erwartet [µmol/l]	gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
2,319	1:2	1,160	1,099	94,8
	1:3	0,773	0,748	96,8
	1:4	0,580	0,498	85,9
2,581	1:2	1,291	1,297	100,5
	1:3	0,860	0,877	101,9
	1:4	0,645	0,594	92,1
2,097	1:2	1,049	1,196	114,1
	1:3	0,699	0,822	117,6
	1:4	0,524	0,520	99,2

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,076 µmol/l

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,12 µmol/l

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,18 µmol/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 15 % VK.

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die L-Kynurenin-Reaktivität:

3-HK (3-Hydroxy-DL-Kynurenin)	< 0,5 %
D-Kynurenin	< 0,6 %
L-Tryptophan	< 0,08 %
5-HTP (5-Hydroxytryptophan)	< 0,01 %
Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptamin)	< 0,01 %
5-HIAA (5-Hydroxyindolyllessigsäure)	< 0,01 %
Quinolinsäure	< 0,01 %
Kynureninsäure	< 0,01 %
Picolinsäure	< 0,01 %

12. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H₂SO₄ 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 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 dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

- Bipath P, Levay PF, Viljoen M: The kynurenine pathway activities in a sub-Saharan HIV/AIDS population. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):346. doi:10.1186/s12879-015-1087-5.
- Cavia-Saiz M, Muñiz Rodríguez P, Llorente Ayala B, García-González M, Coma-Del Corral MJ, García Girón C: The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Mol Biol Rep*. 2014 Apr; **41**(4):2275-9.
- Choe J, Yun J, Jeon Y, Kim SH, Park G, Huh JR, Oh S, Kim JE: 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*. 2014;**14**(1):335. doi:10.1186/1471-2407-14-335.
- Chuang SC, Fanidi A, Ueland PM et al: Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Mar; **23**(3):461-8
- Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Mar 1; **2**(3):e23428
- Eussen S J PM, Ueland P M, Vollset S E, Nygård O, Midttun Ø, Sulo G, Tell GS: Kynurenines as predictors of acute coronary events in the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol*. 2015 Jun 15; **189**:18-24
- Ferns DM, Kema IP, Buist MR, Nijman HW, Kenter GG, Jordanova ES. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. 2015;**4**(2):e981457. doi:10.4161/2162402X.2014.981457.
- Folgiero V, Goffredo BM, Filippini P, Masetti R, Bonanno G, Caruso R, Bertaina V, Mastronuzzi A, Gaspari S, Zecca M, et al: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2014;**5**(8):2052-2064.
- Gupta NK, Thaker AI, Kanuri N, Riehl TE, Rowley CW, Stenson WF, Ciorba MA: Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jul; **18**(7):1214-20.
- Love AC, Schwartz I, Petzke MM: Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *J Leukoc Biol*. 2015 Feb; **97**(2): 379–390.

Pedersen ER, Svingen GF, Schartum-Hansen H, Ueland PM, Ebbing M, Nordrehaug JE, Iglund J, Seifert R, Nilsen RM, Nygård O: Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *Eur Heart J*. 2013 Sep; **34**(34):2689-96.

Ristagno G, Latini R, Vaahersalo J, Masson S, Kurola J, Varpula T, Lucchetti J, Fracasso C, Guiso G, Montanelli A, Barlera S, Gobbi M, Tiainen M, Pettilä V, Skrifvars MB; FINNRESUSCI Investigators: Early activation of the kynurenine pathway predicts early death and long-term outcome in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Heart Assoc*. 2014; **3**:e001094

Sulo G, Vollset SE, Nygård O, Midttun Ø, Ueland PM, Eussen SJ, Pedersen ER, Tell GS: Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 30; **168**(2):1435-40

Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 March; **19**(3): 436–442

Zuo H, Ueland PM, Ulvik A, Eussen SJPM, Vollset SE, Nygård O, Midttun Ø, Theofylaktopoulou D, Meyer K, Tell GS: Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenine Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality. *American Journal of Epidemiology*. 2016;**183**(4):249-258. doi:10.1093/aje/kwv242














Publikationen mit dem Immundiagnostik IDK® Kynurenin ELISA

Merino JJ, Cabaña-Muñoz ME, Toledano Gasca A, et al. Elevated Systemic L-Kynurenine/L-Tryptophan Ratio and Increased IL-1 Beta and Chemokine (CX3CL1, MCP-1) Proinflammatory Mediators in Patients with Long-Term Titanium Dental Implants. *J Clin Med*. 2019;**8**(9):1368. doi:10.3390/jcm8091368

Reichetzedder C, Heunisch F, Einem G von, et al. Pre-Interventional Kynurenine Predicts Medium-Term Outcome after Contrast Media Exposure Due to Coronary Angiography. *Kidney Blood Press Res*. 2017;**42**(2):244-256. doi:10.1159/000477222.

Zimmer P, Schmidt ME, Prentzell MT, et al. Resistance Exercise Reduces Kynurenine Pathway Metabolites in Breast Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Front Oncol*. 2019;**9**(September):1-11. doi:10.3389/fonc.2019.00962

16. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

Manual

For professional use only

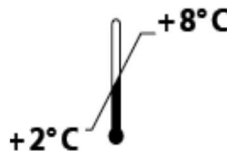
IDK® Kynurenine ELISA

For the in vitro determination of L-kynurenine in human EDTA plasma, serum and dried blood spots

Valid from 2025-02-14



K 7728



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

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit.

Important safety information for this product can be found in the chapter WARNINGS AND PRECAUTIONS.

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	23
<i>EDTA plasma and serum samples</i>	23
<i>Dried blood spots</i>	24
7. ASSAY PROCEDURE	24
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Derivatisation procedure</i>	24
<i>Test procedure</i>	26
8. RESULTS	27
9. LIMITATIONS	28
<i>Biotin interference</i>	28
10. QUALITY CONTROL	28
<i>Reference Range</i>	29
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	29
<i>Precision and reproducibility</i>	29
<i>Spiking recovery</i>	30
<i>Dilution recovery</i>	30
<i>Analytical sensitivity</i>	31
<i>Specificity</i>	31
12. WARNINGS AND PRECAUTIONS	32
13. TECHNICAL HINTS	32
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	32
15. REFERENCES	33
<i>General Literature</i>	33
<i>Publications using Immundiagnostik IDK® Kynurenine ELISA</i>	35
16. SYMBOLS	35

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of L-kynurenine in human EDTA plasma, serum and dried blood spots. For *in vitro* diagnostic use only.

For rodent specimens (mouse, rat) and for cell culture supernatant and CSF we recommend our IDK® Kynurenine high sensitive ELISA KR3728.

2. INTRODUCTION

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

L-kynurenine plays a key role as an immune suppressor in the course of infectious diseases (HIV¹, tuberculosis², borreliosis³ etc.) and malignant diseases (colon cancer⁴, lung cancer^{5, 6}, leukemia⁷, Hodgkin lymphoma⁸, cervical cancer⁹), where high kynurenine levels indicate a poor prognosis. Thus, L-kynurenine could serve as a prognostic marker to predict the progression and the severity of the disease.

¹ Bipath P et al. (2015) The kynurenine pathway activities in a sub-Saharan HIV/AIDS population. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):346.

² Suzuki Y et al. (2012) Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* p. 436-442

³ Love AC. et al. (2015) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *J Leukoc Biol* 97(2): 379–390.

⁴ Cavia-Saiz M. et al. (2014) The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 41:2275-2279

⁵ Creelan BC 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 (March) e23428

⁶ Chuang SC et al. (2014) Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23, 461-468

⁷ 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), 2052-64

⁸ Choe J 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), 1-9

⁹ Ferns DM et al. (2015) Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. Feb 25;4(2)

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7728	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7728	STD	Standards, ready-to-use (0, 0.2, 0.6, 2, 6, 20 µmol/l)	6 x 500 µl
K 7728	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 7728	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7728	AB	L-kynurenine antibody, lyophilised	1 x 1 vial
K 7728	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7728	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 110 ml
K 7728	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	4 x 25 mg
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 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*
- Dried blood spot carrier
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- 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 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 assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **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**.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- Reconstitute the content of one vial of **derivatisation reagent (DER)** (25 mg) **with 1.5 ml DMSO**. Allow to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly with a vortex-mixer. The derivatisation reagent 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.
- The **lyophilised L-kynurenine antibody (AB)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Reconstitute the AB with **6 ml of wash buffer**. **L-kynurenine antibody** (reconstituted AB) can be stored at **2-8 °C for 2 months**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma and serum samples

Samples are stable for 72 h at 2-8 °C or at room temperature. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.

EDTA plasma and serum samples are analysed **undiluted**.

For sample preparation, a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

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. The moistened cards are stable for 8 days at room temperature. For longer storage, store at -20°C in a dry place.

For sample preparation, a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of L-kynurenine. The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for kynurenine derivatisation. Afterwards, the treated samples and a polyclonal L-kynurenine-antiserum are incubated in the 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.

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 colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour 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.

Derivatisation procedure

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

Derivatisation of standards, controls and samples is carried out in single analysis in 1.5 ml polypropylene tubes.

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate.

EDTA plasma and serum samples, standards and controls

1.	Add 25 µl standard (STD)/ control (CTRL)/ sample in labelled 1.5 ml polypropylene tubes.
2.	Add 500 µl reaction buffer (REABUF) into each tube (STD, CTRL, sample).
3.	Add 50 µl of freshly prepared derivatisation reagent into each tube (STD, CTRL, sample) and mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer.
4.	Incubate for 45 min at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker .

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

Dried blood spots, standards and controls

1.	Remove the filter from sampling device and put it in a labelled 1.5 ml polypropylene tube. Add 1 ml reaction buffer (REABUF) to each sample, mix thoroughly. Allow sample to stand for 30 min at room temperature (15-30°C), afterwards mix thoroughly.
2.	Add 25 µl standard (STD)/ control (CTRL) in labelled 1.5 ml polypropylene tubes. Add 1 ml reaction buffer (REABUF) to the standards and controls.
3.	Add 50 µl of freshly prepared derivatisation reagent into each tube (STD, CTRL, sample) and mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer.
4.	Incubate for 45 min at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker .

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered with foil at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

5.	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.
6.	For the analysis in duplicate take 2 x 50 µl of the derivatised standards/controls/samples out of the tubes and add into the respective wells of the microtiter plate.
7.	Add 50 µl L-kynurenine antibody into each well.
8.	Cover the strips tightly and incubate for 2 hours at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker , or incubate over night at 2-8 °C.
9.	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.
10.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
11.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
12.	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.
13.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
14.	Incubate for 10-15 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
15.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
16.	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 (690 nm) as a reference.

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

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. Attention should be paid to the following points:

Derivatisation of the samples is possible in 45 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

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 optical density and a logarithmic abscissa for 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 optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for 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 program used, the duplicate values should be evaluated manually.

EDTA plasma and serum

No factor is required.

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

Dried blood spots

The obtained results have to be multiplied by the **factor of 2** to get the actual concentrations.

9. LIMITATIONS

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

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

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

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

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

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

Biotin interference

Samples containing a biotin concentration of < 133 ng/ml show a change of the results of ≤ 25 %. Higher concentrations of biotin can lead to false results. Patients taking > 5 mg biotin per day should wait at least 24 hours after taking biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

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 samples are outside of the acceptable limits.

Reference Range

Based on in-house studies with serum samples of apparently healthy individuals (n = 100), the following reference range was determined:

Median:	1.6 µmol/l
2.5 th percentile:	0.9 µmol/l
97.5 th percentile:	2.5 µmol/l

We recommend that each laboratory establishes its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Plasma, serum

Repeatability (Intra-Assay); n = 14

Repeatability was assessed with 2 samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot) in single determinations.

sample	L-kynurenine [µmol/l]	CV [%]
1	0.82	7.6
2	2.86	6.2

Reproducibility (Inter-Assay); n = 8

Reproducibility was assessed with 2 samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots) in duplicate determinations.

sample	L-kynurenine [µmol/l]	CV [%]
1	0.80	9.2
2	2.80	6.2

Dried blood spot

Repeatability (Intra-Assay); n = 10

Repeatability was assessed with 2 samples on 10 dried blood spot carriers each, under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot) in duplicate determinations.

sample	L-kynurenine [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	2.01	7.1
2	3.01	10.2

Reproducibility (Inter-Assay); n = 12

Reproducibility was assessed with 2 samples on 12 dried blood spot carriers each, under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots) in duplicate determinations.

sample	L-kynurenine [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	1.22	12.6
2	2.78	8.9

Spiking recovery

3 serum samples were spiked with different L-kynurenine concentrations and measured in this assay (n = 2). The mean recovery rate was 102.5 %.

sample [$\mu\text{mol/l}$]	spike [$\mu\text{mol/l}$]	expected [$\mu\text{mol/l}$]	measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
2.48	1.5	3.98	4.49	112.8
	3.0	5.48	5.92	108.0
1.98	1.5	3.48	3.56	102.3
	3.0	4.98	4.81	96.6
2.03	1.5	3.53	3.45	97.7
	3.0	5.03	4.99	97.4

Dilution recovery

3 serum samples were diluted and analysed. The mean recovery rate was 100.3 % (n = 2).

sample [µmol/l]	dilution	expected [µmol/l]	measured [µmol/l]	recovery [%]
2.319	1:2	1.160	1.099	94.8
	1:3	0.773	0.748	96.8
	1:4	0.580	0.498	85.9
2.581	1:2	1.291	1.297	100.5
	1:3	0.860	0.877	101.9
	1:4	0.645	0.594	92.1
2.097	1:2	1.049	1.196	114.1
	1:3	0.699	0.822	117.6
	1:4	0.524	0.520	99.2

Analytical sensitivity

Limit of blank, LoB	0.076 µmol/l
Limit of detection, LoD	0.12 µmol/l
Limit of quantitation, LoQ	0.18 µmol/l

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 15 % CV.

Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to L-kynurenine. The specificity is calculated in percent in relation to the L-kynurenine binding activity.

3-HK (3-hydroxy-DL-kynurenine)	< 0.5 %
D-kynurenine	< 0.6 %
L-tryptophan	< 0.08 %
5-HTP (5-hydroxytryptophan)	< 0.01 %
Serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine)	< 0.01 %
5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid)	< 0.01 %
Quinolinic acid	< 0.01 %
Kynurenic acid	< 0.01 %
Picolinic acid	< 0.01 %

12. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should 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 sulfuric acid, which is 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 breathe 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 the 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 different 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

General Literature

Bipath P, Levay PF, Viljoen M: The kynurenine pathway activities in a sub-Saharan HIV/AIDS population. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1):346. doi:10.1186/s12879-015-1087-5.

Cavia-Saiz M, Muñiz Rodríguez P, Llorente Ayala B, García-González M, Coma-Del Corral MJ, García Girón C: The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Mol Biol Rep*. 2014 Apr; **41**(4):2275-9.

Choe J, Yun J, Jeon Y, Kim SH, Park G, Huh JR, Oh S, Kim JE: 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*. 2014;**14**(1):335. doi:10.1186/1471-2407-14-335.

Chuang SC, Fanidi A, Ueland PM et al: Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Mar; **23**(3):461-8

Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Mar 1; **2**(3):e23428

Eussen S J PM, Ueland P M, Vollset S E, Nygård O, Midttun Ø, Sulo G, Tell GS: Kynurenines as predictors of acute coronary events in the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol*. 2015 Jun 15; **189**:18-24

Ferns DM, Kema IP, Buist MR, Nijman HW, Kenter GG, Jordanova ES. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient

survival. *Oncoimmunology*. 2015;**4**(2):e981457. doi:10.4161/2162402X.2014.981457.

Folgiero V, Goffredo BM, Filippini P, Masetti R, Bonanno G, Caruso R, Bertaina V, Mastronuzzi A, Gaspari S, Zecca M, et al: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2014;**5**(8):2052-2064.

Gupta NK, Thaker AI, Kanuri N, Riehl TE, Rowley CW, Stenson WF, Ciorba MA: Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jul; **18**(7):1214-20.

Love AC, Schwartz I, Petzke MM: Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *J Leukoc Biol*. 2015 Feb; **97**(2): 379–390.

Pedersen ER, Svingen GF, Schartum-Hansen H, Ueland PM, Ebbing M, Nordrehaug JE, Igland J, Seifert R, Nilsen RM, Nygård O: Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *Eur Heart J*. 2013 Sep; **34**(34):2689-96.

Ristagno G, Latini R, Vaahersalo J, Masson S, Kurola J, Varpula T, Lucchetti J, Fracasso C, Guiso G, Montanelli A, Barlera S, Gobbi M, Tiainen M, Pettilä V, Skrifvars MB; FINNRESUSCI Investigators: Early activation of the kynurenine pathway predicts early death and long-term outcome in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Heart Assoc*. 2014; **3**:e001094

Sulo G, Vollset SE, Nygård O, Midttun Ø, Ueland PM, Eussen SJ, Pedersen ER, Tell GS: Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 30; **168**(2):1435-40

Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 March; **19**(3): 436–442

Zuo H, Ueland PM, Ulvik A, Eussen SJPM, Vollset SE, Nygård O, Midttun Ø, Theofylaktopoulou D, Meyer K, Tell GS: Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenine Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality. *American Journal of Epidemiology*. 2016;**183**(4):249-258. doi:10.1093/aje/kwv242

















Publications using Immundiagnostik IDK® Kynurenine ELISA

Merino JJ, Cabaña-Muñoz ME, Toledano Gasca A, et al. Elevated Systemic L-Kynurenine/L-Tryptophan Ratio and Increased IL-1 Beta and Chemokine (CX3CL1, MCP-1) Proinflammatory Mediators in Patients with Long-Term Titanium Dental Implants. *J Clin Med*. 2019;**8**(9):1368. doi:10.3390/jcm8091368

Reichetzeder C, Heunisch F, Einem G von, et al. Pre-Interventional Kynurenine Predicts Medium-Term Outcome after Contrast Media Exposure Due to Coronary Angiography. *Kidney Blood Press Res*. 2017;**42**(2):244-256. doi:10.1159/000477222.

Zimmer P, Schmidt ME, Prentzell MT, et al. Resistance Exercise Reduces Kynurenine Pathway Metabolites in Breast Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Front Oncol*. 2019;**9**(September):1-11. doi:10.3389/fonc.2019.00962

16. SYMBOLS

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin