

Arbeitsanleitung / Manual

IDK[®] Tryptophan ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von L-Tryptophan in Stuhl

For the in vitro determination of L-tryptophan in stool

Gültig ab / Valid from 2017-10-26

REF K 7729



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	7
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
8. ERGEBNISSE	9
9. EINSCHRÄNKUNGEN	10
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	11
<i>Spike-Wiederfindung</i>	11
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Spezifität</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
15. LITERATUR	15

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

Tryptophan ist eine essentielle Vorstufe wichtiger schmerzregulierender und regenerationsfördernder Substanzen:

- Serotonin und Kynureninsäure: Fehlen diese in der Mucosa, ist das Krankheitsempfinden bei Patienten mit Colitis wesentlich stärker¹.
- Indolaldehyd: Diese von Darmbakterien gebildete Substanz stärkt die Schutzfunktion der Mucosa vor Entzündungen und die Widerstandskraft gegen *Candida*-Infektionen².

Gupta *et al.* haben gezeigt, dass eine verminderte Tryptophan-Verfügbarkeit im Serum mit hoher Aktivität einer IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) einhergeht, und dass Tryptophan-Spiegel im Serum ansteigen, wenn die Symptome der Patienten sich verbessern³. Eine Studie mit mehr als 500 Patienten mit IBD bestätigte die negative Korrelation zwischen Tryptophan-Serumspiegeln und Krankheitsaktivität⁴.

Lamas *et al.* haben auch im Stuhl von IBD-Patienten wesentlich niedrigere Tryptophankonzentrationen als bei einer gesunden Kontrollgruppe gefunden⁵.

Der IDK® Tryptophan Stuhl ELISA wurde zur Messung des Tryptophanspiegels im Stuhl entwickelt, um so die Notwendigkeit einer Tryptophan-Ergänzung untersuchen zu können.

¹ Keszhelyi D *et al.* (2013). Decreased levels of kynurenic acid in the intestinal mucosa of IBS patients: Relation to serotonin and psychological state. *Journal of Psychosomatic Research*, 74(6), 501–504.

² Zelante T *et al.* (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39(2), 372–385.

³ Gupta NK *et al.* (2012). Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflammatory Bowel Diseases*. 18(7):1214-20.

⁴ Nikolaus S. *et al.* (2017). Increased Tryptophan Metabolism is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.028>.

⁵ Lamas B *et al.* (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature Medicine*, 22(6), 598–605. *Inflammatory Bowel Diseases*. 18(7):1214-20.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7729	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7729	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7729	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,6; 2, 6; 20; 60 µM)	6 x 200 µl
K 7729	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
K 7729	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
K 7729	EXBUF	Extraktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 7729	AB	L-Tryptophan-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 7729	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7729	DER	Derivatisierungsreagenz	100 mg
K 7729	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 7729	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 28 ml
K 7729	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7729	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*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- 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 auf dem Etikett angegeben gelagert 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 **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 gebrauchsfertigen **Standards und Kontrollen (STD/CTRL)** werden bei **-20°C** gelagert. Sie sind so bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Nach Gebrauch wieder einfrieren.
- **DMSO** kristallisiert bei 4 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Das DER (100 mg) wird mit **6 ml DMSO** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Das Derivatisierungsreagenz (gelöstes DER) kann 2 Monate bei 2-8 °C gelagert werden.** Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der **lyophilisierte L-Tryptophan Antikörper (AB)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der Inhalt eines Fläschchens AB wird in **3 ml Waschpuffer** rekonstituiert. Werden mehrere Fläschchen

benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. **L-Tryptophan-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

Probenlagerung

Stuhlextrakt kann bis zu 6 Tage bei Raumtemperatur oder 2-8 °C gelagert werden. Zur längeren Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

Die Extrakte sollten maximal zwei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

Der Extraktionspuffer (EXBUF) ist gebrauchsfertig. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 750 µl Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen (EXBUF):	750 µl
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **750 µl Extraktionspuffer (EXBUF) befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

- c) Röhrcchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrcchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrcchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrcchen mindestens 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrcchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **25 µl des Stuhlextraktes** mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Tryptophan versetzt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von L-Tryptophan. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Tryptophan versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen L-Tryptophan-Antiserum in einer mit L-Tryptophan-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 polyklonalen L-Tryptophan-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift 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-Tryptophan-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 Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der extrahierten Stuhlproben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße) durchgeführt.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe 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.	25 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ extrahierte Stuhlprobe in die jeweiligen Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
3.	250 µl Assaypuffer (ASYBUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren.
4.	50 µl Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem Horizontalschüttler 45 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren

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

Pipettierschema Testdurchführung

5.	Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt markieren.
----	--

6.	Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden. Bitte beachten: Platte nicht waschen!
7.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/ Kontrollen/ Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
8.	50 µl L-Tryptophan-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen luftdicht abdecken und über Nacht (15-20 Stunden) bei 2-8°C inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
13.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
14.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
15.	12-18 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
16.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
17.	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. 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

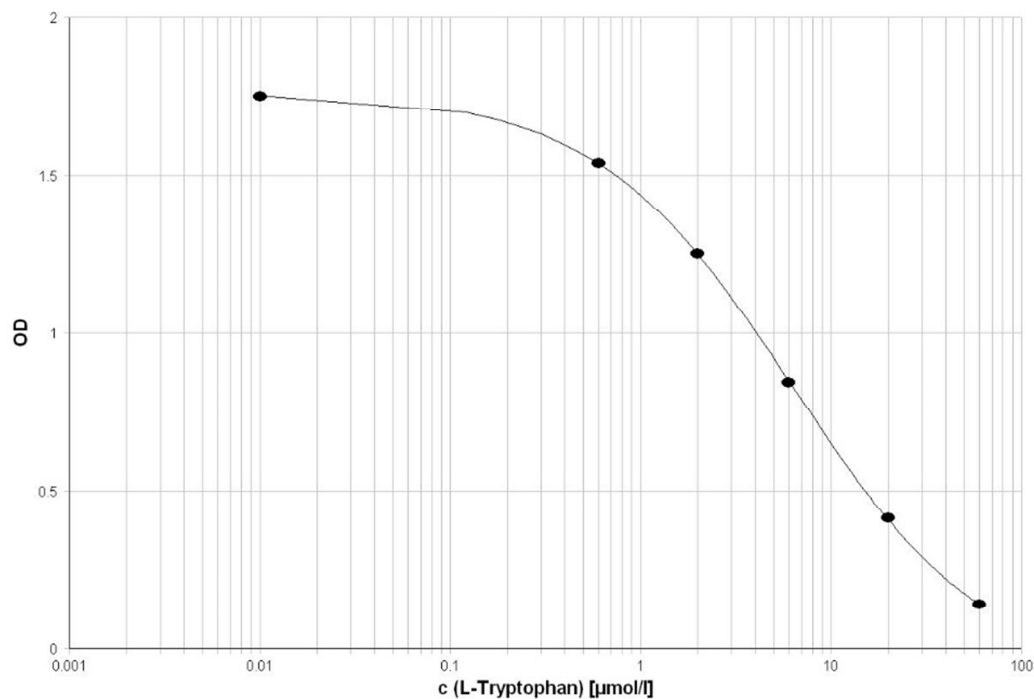
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Stuhlproben

Die Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten (1 $\mu\text{mol/l}$ entspricht 1 nmol/g Stuhl). Sollte ein anderer Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.



9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen mit Extraktionspuffer (EXBUF) verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Kalibrierkurve \times *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB \times *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 62) wurde ein Median von 128 nmol/g ermittelt.

Bei 3 % dieses Kollektivs wurde eine L-Tryptophan-Konzentration kleiner 80 nmol/g gemessen.

Dieser Wert entspricht den von Lamas *et al.* (2016, doi:10.1038/nm.4102) gefundenen Ergebnissen (n = 32). Bei dieser Studie hatte eine von 32 gesunden Personen eine L-Tryptophan-Konzentration kleiner 80 nmol/g (das sind 3,1 %).

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 12)

Probe	L-Tryptophan [nmol/g]	VK [%]
1	135,3	11,4
2	376,9	5,6

Inter-Assay (n = 11)

Probe	L-Tryptophan [nmol/g]	VK [%]
1	141,8	11,5
2	343,0	6,5

Spike-Wiederfindung

Zwei extrahierte Stuhlproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an L-Tryptophan versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 92,7 % (n = 2).

Probe	Spike [nmol/g]	L-Tryptophan erwartet [nmol/g]	L-Tryptophan gemessen [nmol/g]	Wiederfindung [%]
A			142,0	
	50	192,0	156,6	81,6
	150	292,0	276,1	94,6
	250	392,0	402,1	102,6
B			110,7	
	50	160,7	152,3	94,8
	150	260,7	207,1	79,4
	250	360,7	371,5	103,0

Wiederfindung in der Verdünnung

Drei extrahierte Stuhlproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 99,1 % (n = 2).

Probe	Verdünnung	L-Tryptophan erwartet [nmol/g]	L-Tryptophan gemessen [nmol/g]	Wiederfindung [%]
A	1:50		1,784	
	1:66,7	1,337	1,372	102,6
	1:100	0,892	0,871	97,6
B	1:50		2,655	
	1:66,7	1,990	1,820	91,5
	1:100	1,328	1,220	91,9
C	1:50		1,981	
	1:66,7	1,485	1,515	102,0
	1:100	0,991	1,080	109,0

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve mit Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors von 50 ermittelt.

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	30,2 nmol/g
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	45,4 nmol/g
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	48,0 nmol/g

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

Spezifität

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

5-HTP (5-Hydroxytryptophan)	< 0,5 %
L-Phenylalanin	< 0,1 %
L-Tyrosin	< 0,1 %

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand 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.

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 Pipettierolumina 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

Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013 Mar;**29**(2):146-52. doi:10.1097/MOG.0b013e32835c9cb3.

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. doi:10.1002/ibd.21849.

Keszthelyi D, Troost FJ, Jonkers DM, Kruijmel JW, Leue C, Masclee AaM.: Decreased levels of kynurenic acid in the intestinal mucosa of IBS patients: Relation to serotonin and psychological state. *J Psychosom Res*. 2013;**74**(6):501-504. doi:10.1016/j.jpsychores.2013.01.008.










Lamas B, Richard ML, Leducq V, et al.: CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med*. 2016;**22**(6):598-605. doi:10.1038/nm.4102.

Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, et al.: Increased Tryptophan Metabolism is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. **2017**. doi:10.1053/j.gastro.2017.08.028

Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity*. 2014;**40**(6):833-842. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.014.

Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al.: Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013;**39**(2):372-385. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003.

Verwendete Symbole:

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

Manual

IDK® Tryptophan ELISA

For the in vitro determination of L-tryptophan in stool

Valid from 2017-10-26

REF K 7729



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	22
<i>Storage of samples</i>	22
<i>Extraction of the stool sample</i>	22
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Sample preparation procedure</i>	24
<i>Test procedure</i>	24
8. RESULTS	26
9. LIMITATIONS	27
10. QUALITY CONTROL	27
<i>Reference Range</i>	28
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>Precision and reproducibility</i>	28
<i>Spiking recovery</i>	28
<i>Dilution recovery</i>	29
<i>Analytical sensitivity</i>	29
<i>Specificity</i>	30
12. PRECAUTIONS	30
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31
15. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of L-tryptophan in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Tryptophan is an essential precursor of important substances regulating pain sensation and recovery:

- Serotonin and kynurenic acid: If their concentration in the mucosa is low, pain sensation in patients with colitis is more intense¹.
- Indolealdehyde, produced by lactobacilli in the gut, contributes to mucosal protection from inflammation and to colonization resistance to *candida albicans*².

Gupta *et al.* have shown that suppressed serum tryptophan levels correlate with high disease activity of IBD (Inflammatory Bowel Disease), and that tryptophan levels elevated as disease activity lessened³. A study with more than 500 patients with IBD confirmed the negative correlation between serum level of tryptophan and disease activity⁴.

Lamas *et al.* have observed reduced tryptophan concentrations also in the stool of patients with IBD⁵.

The IDK® tryptophan stool ELISA was developed to measure tryptophan levels in stool to assess the need for tryptophan supplementation.

¹ Keszthelyi D et al. (2013). Decreased levels of kynurenic acid in the intestinal mucosa of IBS patients: Relation to serotonin and psychological state. *Journal of Psychosomatic Research*, 74(6), 501–504.

² Zelante T et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39(2), 372–385.

³ Gupta NK et al. (2012). Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflammatory Bowel Diseases*. 18(7):1214-20.

⁴ Nikolaus S. et al. (2017). Increased Tryptophan Metabolism is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.028>.

⁵ Lamas B et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature Medicine*, 22(6), 598–605. *Inflammatory Bowel Diseases*. 18(7):1214-20.

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7729	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7729	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7729	STD	Standards, ready-to-use ((0, 0.6, 2, 6, 20, 60 µM)	6 x 200 µl
K 7729	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl
K 7729	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl
K 7729	EXBUF	Extraction buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 7729	AB	L-tryptophan antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 7729	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7729	DER	Derivatization reagent	100 mg
K 7729	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 7729	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 28 ml
K 7729	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7729	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

- Ultra pure water*
- Stool sample application system such as Cat. No.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipets 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.
- **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 concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. 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 1 month**.
- Store **standards and controls (STD/CTRL)** frozen at **-20 °C**. They are stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. Thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use.
- **DMSO** crystallizes at 4 °C. Before use, dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- The **lyophilised derivatization reagent (DER)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Bring to room temperature before opening. Reconstitute the content of the vial (100 mg) with **6 ml DMSO**. Allow to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly with a vortex-mixer. **The derivatization reagent** (dissolved DER) **can be stored at 2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- The **lyophilised L-tryptophan antibody (AB)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Dissolve the content of one vial of AB in **3 ml of wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. **L-tryptophan antibody** (dissolved AB) **can be stored at 2-8 °C for 2 months**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2-8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Storage of samples

Stool extract is stable for 6 days at room temperature or 2-8 °C. For longer storage keep frozen at -20 °C. Avoid more than two freeze-thaw cycles.

Extraction of the stool sample

The extraction buffer (EXBUF) is ready-to-use. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No. K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use:

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer:

SAS with 750 µl buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer volume (EXBUF):	750 µl
Dilution factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenization using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **750 µl of extraction buffer (EXBUF)** before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place the dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped of, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~10 minutes improves the result.

- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

To **25 µl of the stool extract** a derivatization reagent (DER) is added for derivatization of L-tryptophan (details are given in the sample preparation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for L-tryptophan derivatisation. Afterwards, the treated samples and a polyclonal L-tryptophan antiserum are incubated in the wells of a microtiter plate coated with L-tryptophan derivative (tracer). During the incubation period, the target L-tryptophan 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 L-tryptophan 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 a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample; this means, high L-tryptophan concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. L-Tryptophan, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Sample preparation procedure

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

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

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (15-30 °C) and mix well.
2.	Add 25 µl standard (STD)/ control (CTRL)/ extracted stool sample into the corresponding vials.
3.	Add 250 µl assay buffer (ASYBUF) into each vial (STD, CTRL, sample).
4.	Add 50 µl derivatization reagent into each vial (STD, CTRL, sample), mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for 45 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .

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

Test procedure

5.	Mark the positions of standards/ controls /samples in duplicate on a protocol sheet .
6.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label. Please note: Do not wash the plate .
7.	For the analysis in duplicate take 2 x 50 µl of the derivatized standards/ controls/samples out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
8.	Add 50 µl L-tryptophan antibody into each well of the microtiter plate.

9.	Cover the strips tightly with foil and incubate overnight (15-20 hours) at 2-8°C .
10.	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.
11.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
12.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
13.	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.
14.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
15.	Incubate for 12-18 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
16.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
17.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (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.

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.

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.

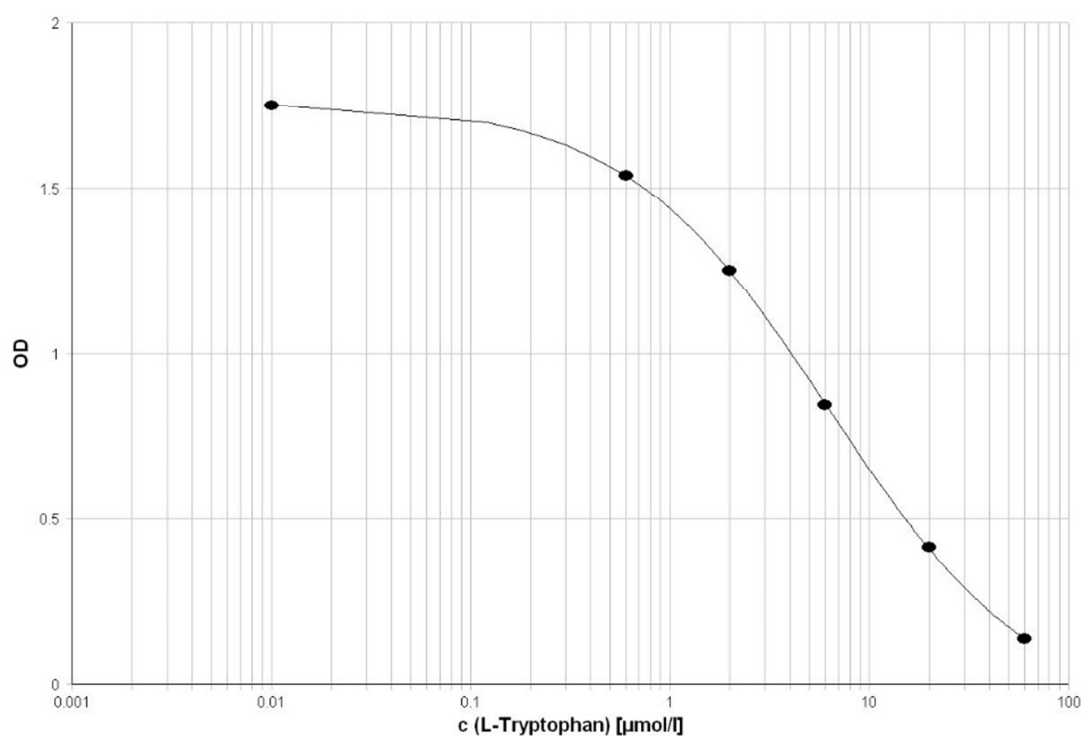
The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available within the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the dilution **factor of 50** to get the actual concentrations (1 µmol/l = 1 nmol/g stool).

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

In the following, an example of a standard curve is given. Do not use it for the calculation of your results.



9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted with extraction buffer (EXBUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

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

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

LoB × sample dilution factor to be used

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 samples are outside of the acceptable limits.

Reference Range

Based on internal studies with stool samples of apparently healthy persons (n = 62) a median of 128 nmol/g was estimated.

For 3 % of this collective (5th percentile) an L-tryptophan concentration of less than 80 nmol/g was obtained.

This values correspond to the published results of Lamas *et al.* (2016, doi: 10.1038/nm.4102). In this study (n = 32) one out of 32 healthy persons had an L-tryptophan concentration less than 80 nmol/g (*i.e.* 3.1 %).

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n = 12)

sample	L-tryptophan [nmol/g]	CV [%]
1	135.3	11.4
2	376.9	5.6

Inter-assay (n = 11)

sample	L-tryptophan [nmol/g]	CV [%]
1	141.8	11.5
2	343.0	6.5

Spiking recovery

Two samples were spiked with different L-tryptophan concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 92.7 % (n = 2).

sample	spike [nmol/g]	L-tryptophan expected [nmol/g]	L-tryptophan measured [nmol/g]	recovery [%]
A			142.0	
	50	192.0	156.6	81.6
	150	292.0	276.1	94.6
	250	392.0	402.1	102.6
B			110.7	
	50	160.7	152.3	94.8
	150	260.7	207.1	79.4
	250	360.7	371.5	103.0

Dilution recovery

3 samples were diluted and measured in this assay. The mean recovery was 99.1 % (n = 2).

sample	dilution	L-tryptophan expected [nmol/g]	L-tryptophan measured [nmol/g]	recovery [%]
A	1:50		1.784	
	1:66.7	1.337	1.372	102.6
	1:100	0.892	0.871	97.6
B	1:50		2.655	
	1:66.7	1.990	1.820	91.5
	1:100	1.328	1.220	91.9
C	1:50		1.981	
	1:66.7	1.485	1.515	102.0
	1:100	0.991	1.080	109.0

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the standard curve in consideration of the sample dilution factor of 50.

Limit of blank, LoB	30.2 nmol/g
Limit of detection, LoD	45.4 µmol/g
Limit of quantitation, LoQ	48.0 µmol/g

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

Specificity

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

5-HTP (5-hydroxytryptophan)	< 0.5 %
L-phenylalanine	< 0.1 %
L-tyrosine	< 0.1 %

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 sulfuric 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 spills 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

Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013 Mar;**29**(2):146-52. doi:10.1097/MOG.0b013e32835c9cb3.

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. doi:10.1002/ibd.21849.

Keszthelyi D, Troost FJ, Jonkers DM, Kruijmel JW, Leue C, Masclee AaM.: Decreased levels of kynurenic acid in the intestinal mucosa of IBS patients:

Relation to serotonin and psychological state. *J Psychosom Res.* 2013;**74**(6):501-504. doi:10.1016/j.jpsychores.2013.01.008.











Lamas B, Richard ML, Leducq V, et al.: CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med.* 2016;**22**(6):598-605. doi:10.1038/nm.4102.

Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, et al.: Increased Tryptophan Metabolism is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* **2017**. doi:10.1053/j.gastro.2017.08.028

Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. *Immunity.* 2014;**40**(6):833-842. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.014.

Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al.: Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 2013;**39**(2):372-385. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use