

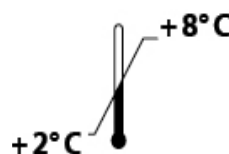
IDK[®] Tryptophan ELISA

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

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

Gültig ab / Valid from 2022-05-02

REF K 7730



IVD **CE**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von L-Tryptophan 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® Tryptophan high sensitive ELISA KR3730.

2. EINLEITUNG

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure. Sie wird vom menschlichen Körper nicht gebildet und muss mit der Nahrung zugeführt werden. Eine wesentliche Rolle spielt Tryptophan bei der Serotoninsynthese. Es ist die einzige Substanz, aus der Serotonin synthetisiert werden kann (siehe Abbildung 1).

Serotonin selbst wird an den Fortsätzen eines weit ausgebreiteten Transmittersystems freigesetzt, das global-modulatorische Wirkungen besitzt und dessen Aktivität sich deshalb in unterschiedlichen Lebensbereichen auswirkt. Diese

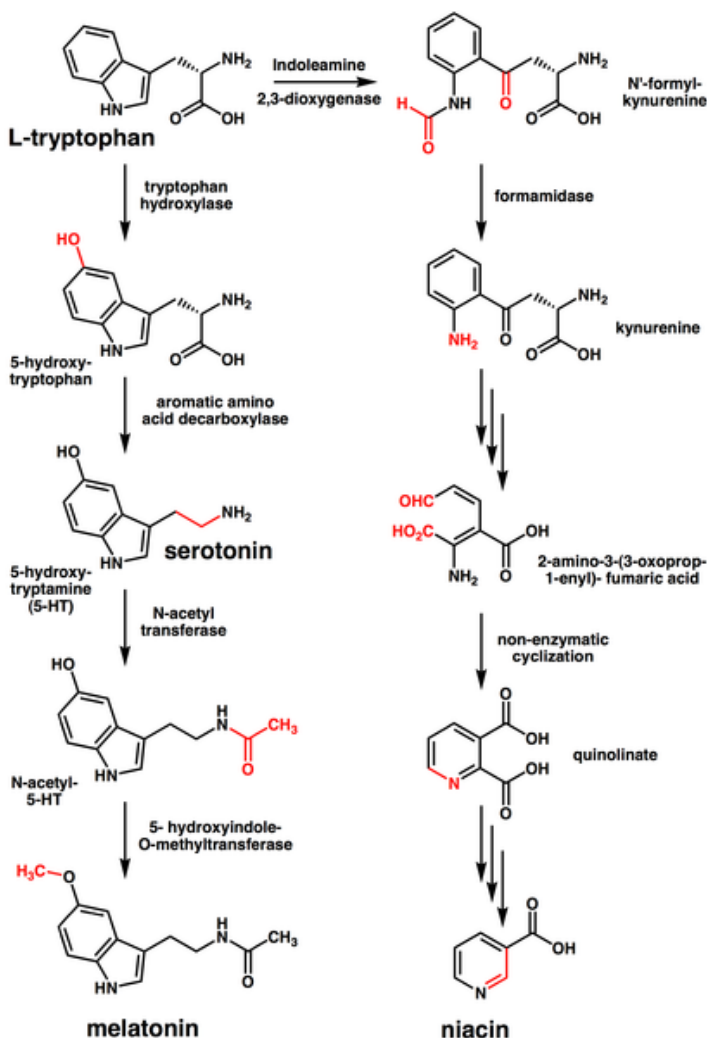


Abbildung 1: Synthese von Serotonin und Melatonin aus Tryptophan (links) und Einschleusung des Tryptophans in den Kynurenin-Weg über das Enzym Indolamin- 2,3-Dioxygenase (rechts).

Aktivität ist nicht zuletzt auch auf den aktuellen Spiegel von Tryptophan zurückzuführen. Kommt es zu einer Absenkung des Tryptophans im Plasma, so steht dieses nicht mehr der Serotonin- und im Folgenden auch nicht der Melatoninsynthese zur Verfügung. Die Resultate sind Stimmungsschwankungen oder affektive Störungen, Aggressivität, Schlafstörungen, Essstörungen oder Depressionen. Durch die Gabe von Tryptophan könnten diese Krankheits-symptome gemildert werden. Eine Tryptophangabe macht jedoch nur bei Kenntnis des Spiegels Sinn. Mit dem vorliegenden Test kann dieser bestimmt werden.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7730	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7730	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 10; 20; 40; 80; 320 µmol/l)	6 x 200 µl
K 7730	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
K 7730	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7730	AB	L-Tryptophan-Antikörper, lyophilisiert	1 vial
K 7730	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7730	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 110 ml
K 7730	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*
- Trockenprobenträger wie z.B. DrySpot-ID Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID
- 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 Derivatisierungsreagenz sollte

unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.

- Der **lyophilisierte L-Tryptophan-Antikörper (AB)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der AB wird mit **6 ml Waschpuffer** rekonstituiert. **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. PROBEN LAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma- und Serumproben

- Serum und EDTA-Plasma-Proben sind 3 Tage bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur haltbar. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Die Proben werden **unverdünnt** im Test eingesetzt.
Proben von Patienten, die Tryptophan-Supplementierung erhalten (z.B. im Rahmen von Depletionsstudien), müssen sehr wahrscheinlich vorverdünnt werden. Wir empfehlen, diese Proben 1:2 mit REABUF vorzuverdünnen (z.B. 25 µl Probe + 25 µl REABUF).
- 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-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 L-Tryptophan-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidase-substrat 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 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. Bitte beachten: Mikrotiterstreifen nicht waschen!

5.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
6.	50 µl L-Tryptophan-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen luftdicht abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren, oder über Nacht bei 2-8 °C inkubieren.
8.	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.
9.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
11.	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.
12.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
13.	10-15 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
14.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
15.	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 automatenpezifische 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.

Bei Proben, die vorverdünnt wurden, müssen die Ergebnisse mit diesem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Faktor 1,5** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Reaktionspuffer verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor 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 < 400 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

Serum

Für die Ermittlung des Normbereichs wurden die Messwerte aus der Hordaland-Studie herangezogen¹. Aus den Messergebnissen von 5.519 Personen² wurde ein Median von 68 µmol/l ermittelt. Aus Median-1 Standardabweichung ergibt sich ein Normbereich von > 55 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-Tryptophan [µmol/l]	VK [%]
1	51,4	4,3
2	105,7	6,9

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 7

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

Probe	L-Tryptophan [µmol/l]	VK [%]
1	63,7	8,4
2	60,6	9,1

¹ Zuo H et al (2016): 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

² Die Studie umfasste 7.015 Probanden. Bei der Beurteilung der statistischen Daten wurden jedoch nur die Patienten mit einbezogen, die bei Abschluss der Studie (nach 14 Jahren) noch am Leben waren.

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-Tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	47,8	10,2
2	70,9	9,8

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-Tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	53,0	6,2
2	82,1	10,6

Spike-Wiederfindung

Zwei Plasmaproben und eine Serumprobe wurden mit unterschiedlichen Tryptophan-Mengen versetzt und gemessen (n = 2). Die mittlere Wiederfindung betrug 97,2 %.

Probe [$\mu\text{mol/l}$]	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
66,8	50	116,8	108,0	92,5
	100	166,8	151,1	90,6
64,1	50	114,1	122,1	107,0
	100	164,1	184,9	112,7
69,9	50	119,9	112,8	94,2
	100	169,9	146,9	86,5

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Serumproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 96,8 % (n = 2).

Probe [µmol/l]	Verdünnung	erwartet [µmol/l]	gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
91,5	1:2	45,8	46,7	102,0
	1:3	30,5	27,5	90,1
	1:4	22,9	22,7	99,4
	1:5	18,3	17,7	96,6
89,6	1:2	44,8	41,2	91,9
	1:3	29,9	25,2	84,5
	1:4	22,4	21,9	97,6
	1:5	17,9	21,1	117,5

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 4,9 µmol/l

Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) 8,0 µmol/l

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation, LoQ*) 10,0 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-Tryptophan-Reaktivität:

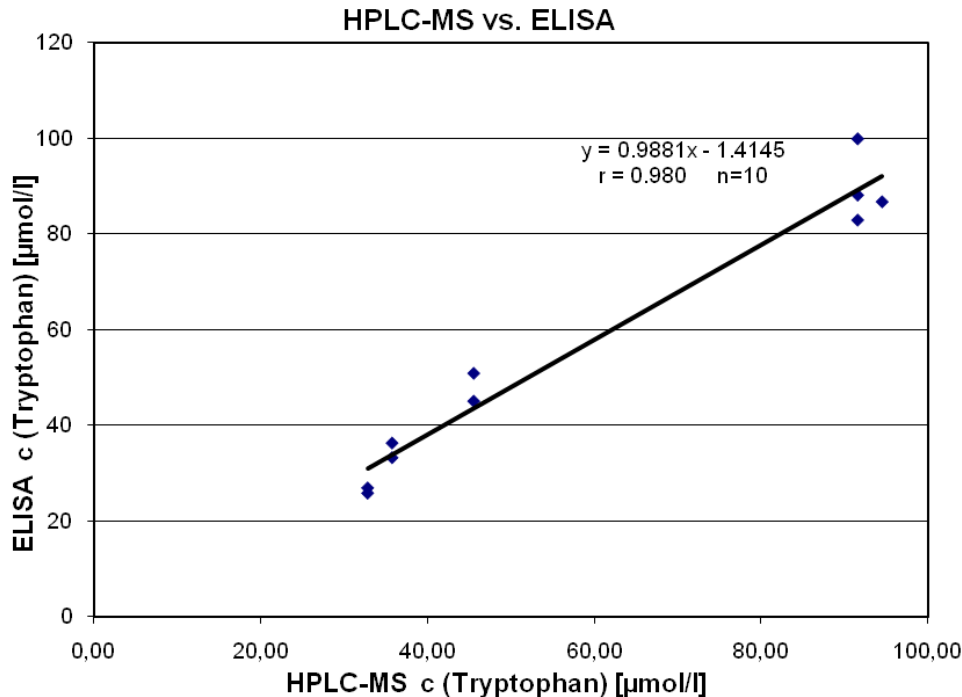
5-HTP (5-Hydroxytryptophan) < 0,5 %

L-Phenylalanin < 0,1 %

L-Tyrosin < 0,1 %

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 10 Plasmaproben ermittelt, sie betrug $r = 0,98$.



12. 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

- Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; **8** (3): 289-95.
- 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
- Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013 Mar;**29**(2):146-52
- 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
- Dolina S, Margalit D, Malitsky S, Rabinkov A: Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) as a pyridoxine-dependent condition: urinary diagnostic biomarkers. *Med Hypotheses.* 2014 Jan;**82**(1):111-6.
- Grozdic E, Berta L, Bajnok A, Veres G, Ilisz I, Klivényi P, Rigó J Jr, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G: B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014 Sep 4;**14**:306
- 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.
- Hyangin Kim, Lucy Chen, Grewo Lim, Backil Sung, Shuxing Wang, Michael F. McCabe, Gabriel Rusanescu, Liling Yang, Yinghong Tian, Jianren Mao: Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *J Clin Invest.* 2012 August 1; **122**(8): 2940–2954.
- Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress.* 2008 May;**11**(3):198-209.

Myint AM, Bondy B, Baghai TC, Eser D, Nothdurfter C, Schüle C, Zill P, Müller N, Rupprecht R, Schwarz MJ: Tryptophan metabolism and immunogenetics in major depression: a role for interferon- γ gene. *Brain Behav Immun*. 2013 Jul;**31**:128-33

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, Kurolo 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

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Mar 5; **150B** (2): 202-8.

Yan EB, Frugier T, Lim C K, Heng B, Sundaram G, Tan M, Rosenfeld JV, et al.: Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *J Neuroinflammation*. 2015,**12**(1), 110.

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® Tryptophan ELISA

Hildebrand P, Königschulte W, Gaber TJ, Bubenzer-Busch S, Helmbold K, Biskup CS, Langen KJ, Fink GR, Zepf FD: Effects of dietary tryptophan and phenylalanine-

tyrosine depletion on phasic alertness in healthy adults - A pilot study. *Food & nutrition research*. 2015;**59**:26407. doi:10.3402/fnr.v59.26407.

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

Verwendete Symbole:

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

Manual

IDK® Tryptophan ELISA

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

Valid from 2022-05-02

REF K 7730



IVD **CE**



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

Tel: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

Table of Contents

1. INTENDED USE	21
2. INTRODUCTION	21
3. MATERIAL SUPPLIED	22
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	23
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	24
<i>EDTA plasma and serum samples</i>	24
<i>Dried blood spots</i>	24
7. ASSAY PROCEDURE	24
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Derivatisation procedure</i>	25
<i>Test procedure</i>	26
8. RESULTS	27
9. LIMITATIONS	28
<i>Biotin interference</i>	28
10. QUALITY CONTROL	29
<i>Reference Range</i>	29
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	29
<i>Precision and reproducibility</i>	29
<i>Spiking recovery</i>	30
<i>Dilution recovery</i>	31
<i>Analytical sensitivity</i>	31
<i>Specificity</i>	31
<i>Correlation with HPLC-MS</i>	32
12. PRECAUTIONS	32
13. TECHNICAL HINTS	33
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	33
15. REFERENCES	33
<i>General Literature</i>	33
<i>Publications using Immundiagnostik IDK® Tryptophan ELISA</i>	35

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of L-tryptophan 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® Tryptophan high sensitive ELISA KR3730.

2. INTRODUCTION

Tryptophan is an essential amino acid that cannot be synthesised by humans and therefore must be supplied in diet. Tryptophan plays an important role in the synthesis of serotonin as it is the only source for synthesizing serotonin (see figure 1).

Serotonin is released from the appendices of a widespread transmitter system with global modulating effects on different areas of life. The activity of this system depends not least on the actual tryptophan level.

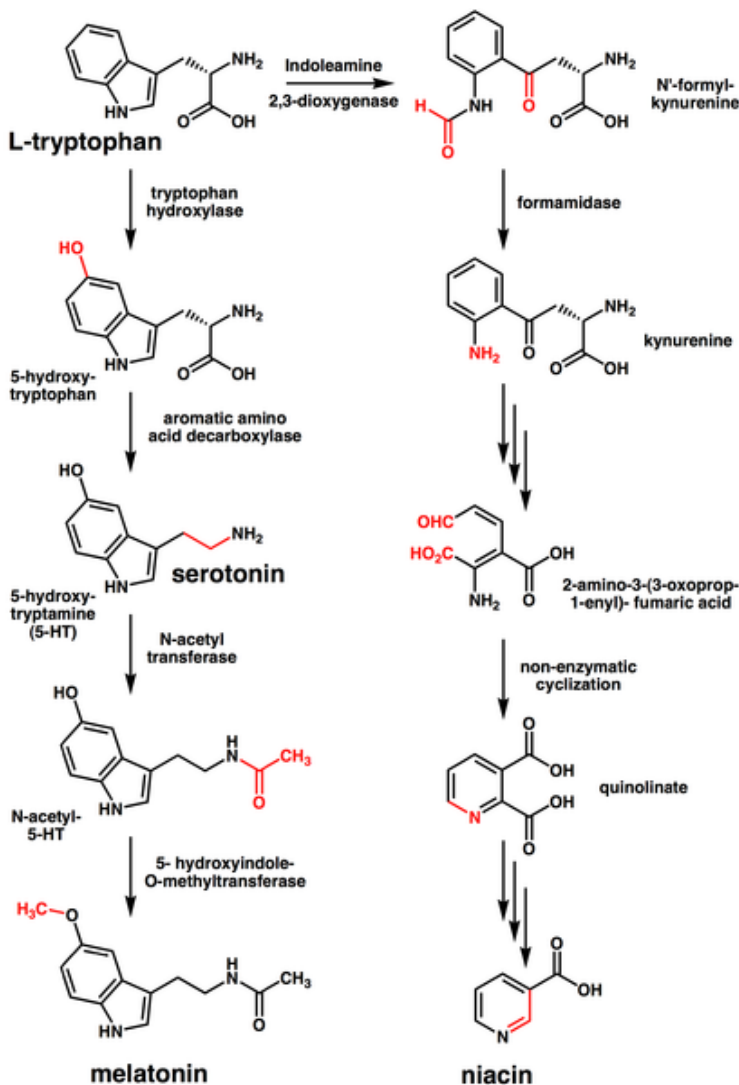


Figure 1: Synthesis of serotonin and melatonin *via* tryptophan (left), and shifting of the metabolism of tryptophan to the kynurenine-pathway *via* the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (right).

When tryptophan in plasma decreases, it is not available for serotonin synthesis and the following melatonin production. As a result, fluctuations of mood, aggression, sleep and eating disorder, or depression can occur. The symptoms of these diseases can be eased by administration of tryptophan. However, such a treatment requires the knowledge of the tryptophan level, which can be determined with this test.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7730	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7730	STD	Standards, ready-to-use (0; 10; 20; 40; 80; 320 µmol/l)	6 x 200 µl
K 7730	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl
K 7730	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7730	AB	L-tryptophan antibody, lyophilised	1 vial
K 7730	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7730	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 110 ml
K 7730	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 such as DrySpot-ID cat. no. DZ9020ID or DZ9021ID
- 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-tryptophan 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 tryptophan antibody** (reconstituted 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

EDTA plasma and serum samples

- Serum and EDTA-Plasma samples are stable for 3 days at 2-8°C or at room temperature. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.
- Samples are used **undiluted**.
Samples from patients with tryptophan supplementation (e.g. in depletion studies) probably require dilution. We recommend diluting these samples 1:2 with REABUF (e.g. 25 µl sample + 25 µl REABUF).
- 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-tryptophan. The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for 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 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-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 absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. L-tryptophan, 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 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. Please note: Do not wash the plate!

5.	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.
6.	Add 50 µl L-tryptophan antibody into each well of the microtiter plate.
7.	Cover the strips tightly with foil and incubate for 2 hours at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker , or incubate over night at 2-8 °C.
8.	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.
9.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
10.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
11.	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.

12.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
13.	Incubate for 10-15 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
14.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
15.	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.

The results from diluted samples must be multiplied by this dilution factor.

Dried blood spots

The obtained results have to be multiplied by the **factor of 1.5** to get the actual concentrations.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can 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 < 400 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

Serum

The normal range was generated from data of the Hordaland Health study¹. Based on the results of 5,519 persons² a median of 68 µmol/l was obtained. From median minus 1 standard deviation a normal range of > 55 was calculated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Plasma, serum

Repeatability (Intra-Assay); n = 14

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

sample	L-tryptophan [µmol/l]	CV [%]
1	51.4	4.3
2	105.7	6.9

Reproducibility (Inter-Assay); n = 7

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

¹ Zuo H et al (2016): 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

² The study included 7,015 subjects. However, only the patients who were still alive at the conclusion of the study (after 14 years) were included in the assessment of the statistical data.

sample	L-tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	63.7	8.4
2	60.6	9.1

Dried blood spot

Repeatability (Intra-Assay); n = 10

The 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-tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	47.8	10.2
2	70.9	9.8

Reproducibility (Inter-Assay); n = 12

The 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-tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	53.0	6.2
2	82.1	10.6

Spiking recovery

2 plasma samples and 1 serum sample were spiked with different L-tryptophan concentrations and measured in this assay (n = 2). The mean recovery rate was 97.2 %.

sample [$\mu\text{mol/l}$]	spike [$\mu\text{mol/l}$]	expected [$\mu\text{mol/l}$]	measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
66.8	50	116.8	108.0	92.5
	100	166.8	151.1	90.6
64.1	50	114.1	122.1	107.0
	100	164.1	184.9	112.7
69.9	50	119.9	112.8	94.2
	100	169.9	146.9	86.5

Dilution recovery

2 serum samples were diluted and measured in this assay. The mean recovery was 96.8 % (n = 2).

sample [μmol/l]	dilution	expected [μmol/l]	measured [μmol/l]	recovery [%]
91.5	1:2	45.8	46.7	102.0
	1:3	30.5	27.5	90.1
	1:4	22.9	22.7	99.4
	1:5	18.3	17.7	96.6
89.6	1:2	44.8	41.2	91.9
	1:3	29.9	25.2	84.5
	1:4	22.4	21.9	97.6
	1:5	17.9	21.1	117.5

Analytical sensitivity

Limit of blank, LoB 4.9 μmol/l

Limit of detection, LoD 8.0 μmol/l

Limit of quantitation, LoQ 10.0 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-tryptophan. The specificity is calculated in percent in relation to the tryptophan-binding activity.

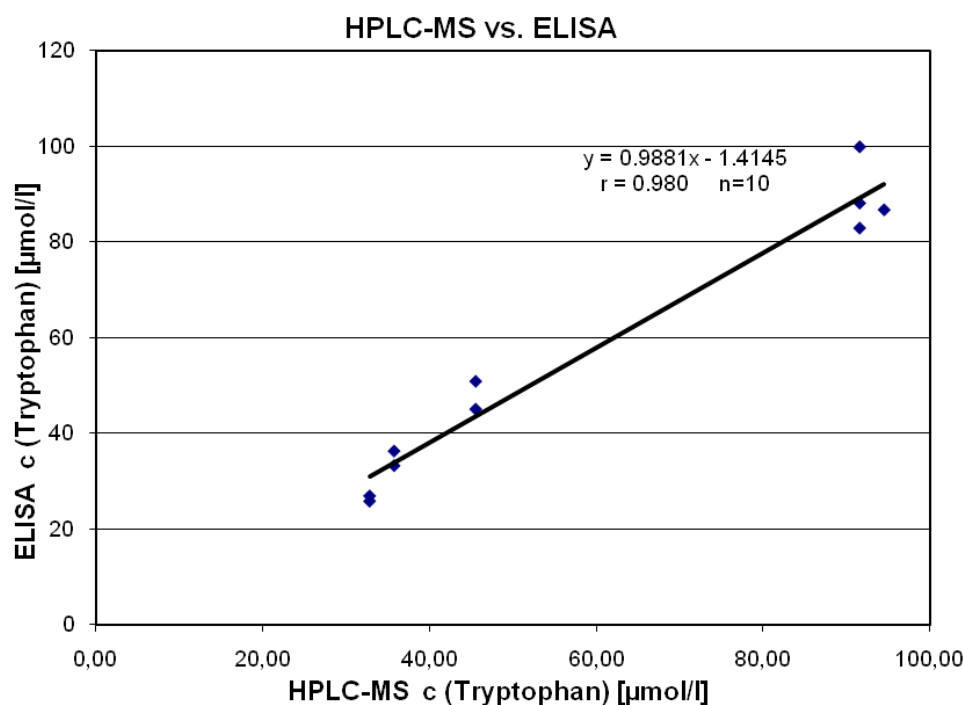
5-HTP (5-hydroxytryptophan) < 0.5 %

L-phenylalanine < 0.1 %

L-tyrosine < 0.1 %

Correlation with HPLC-MS

10 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.98$.



12. 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 diluted 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 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 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

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; **8** (3): 289-95.

- 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
- Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013 Mar;**29**(2):146-52
- 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
- Dolina S, Margalit D, Malitsky S, Rabinkov A: Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) as a pyridoxine-dependent condition: urinary diagnostic biomarkers. *Med Hypotheses.* 2014 Jan;**82**(1):111-6.
- Grozdic E, Berta L, Bajnok A, Veres G, Ilisz I, Klivényi P, Rigó J Jr, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G: B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014 Sep 4;**14**:306
- 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.
- Hyangin Kim, Lucy Chen, Grewo Lim, Backil Sung, Shuxing Wang, Michael F. McCabe, Gabriel Rusanescu, Liling Yang, Yinghong Tian, Jianren Mao: Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *J Clin Invest.* 2012 August 1; **122**(8): 2940–2954.
- Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress.* 2008 May;**11**(3):198-209.
- Myint AM, Bondy B, Baghai TC, Eser D, Nothdurfter C, Schüle C, Zill P, Müller N, Rupprecht R, Schwarz MJ: Tryptophan metabolism and immunogenetics in major depression: a role for interferon- γ gene. *Brain Behav Immun.* 2013 Jul;**31**:128-33
- 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

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Mar 5; **150B** (2): 202-8.

Yan EB, Frugier T, Lim C K, Heng B, Sundaram G, Tan M, Rosenfeld J V, et al. Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *J Neuroinflammation.* 2015;**12**(1), 110.













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® Tryptophan ELISA

Hildebrand P, Königschulte W, Gaber TJ, Bubenzer-Busch S, Helmbold K, Biskup CS, Langen KJ, Fink GR, Zepf FD: Effects of dietary tryptophan and phenylalanine-tyrosine depletion on phasic alertness in healthy adults - A pilot study. *Food & nutrition research.* 2015;**59**:26407. doi:10.3402/fnr.v59.26407.

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

Used symbols:

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