

Arbeitsanleitung / Manual

IDK[®] Tryptophan ELISA

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

***For the in vitro determination of L-tryptophan in
human EDTA plasma, serum and urine***

Gültig ab / Valid from 2018-02-08

REF **K 7730**



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	4
5. VORBEREITUNG LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzwerte</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	11
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Spezifität</i>	12
<i>Korrelation mit HPLC-MS</i>	12
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	13
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
15. LITERATUR	14
<i>Allgemeine Literatur</i>	14
<i>Publikationen mit Immundiagnostik IDK® Tryptophan ELISA</i>	16

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von L-Tryptophan in humanem EDTA-Plasma, Serum und Urin 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 K 3730.

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 das 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 Aktivität ist nicht zuletzt auch auf den aktuellen Spiegel von Tryptophan zurückzuführen.

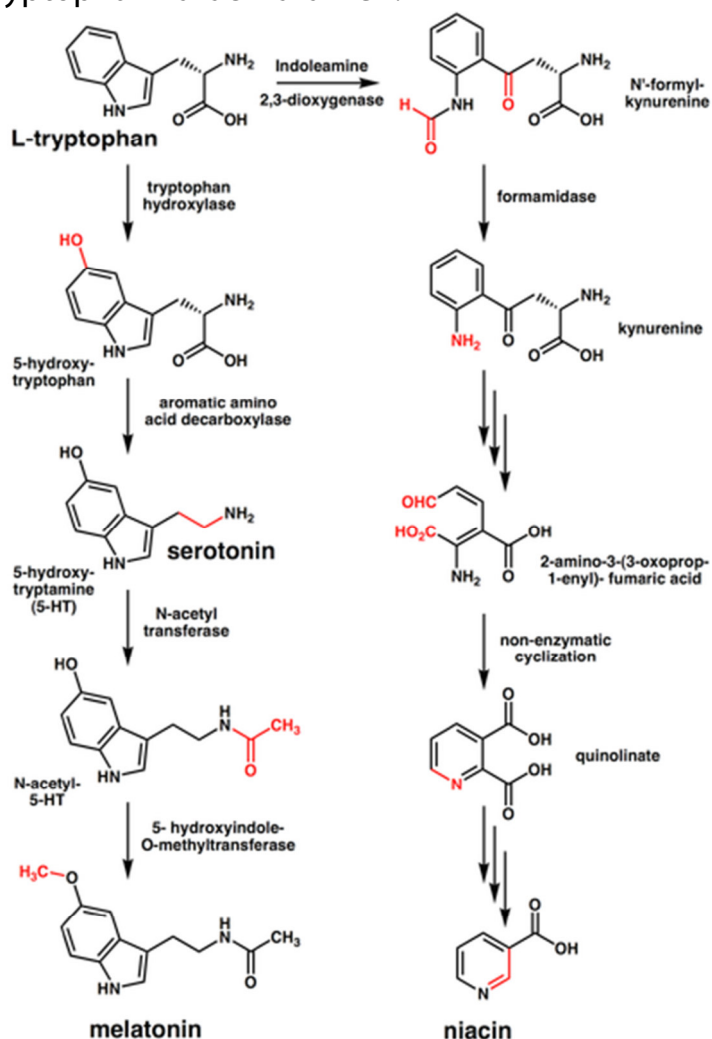


Abbildung 1: Synthese von Serotonin und Melatonin aus Tryptophan (links) und Einschleusung des Tryptophans in den Kynurenin-Weg über das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (rechts).

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 Krankheitssymptome gemildert werden. Eine Tryptophangabe macht jedoch nur bei Kenntnis des Spiegels Sinn. Mit dem vorliegenden Test lässt sich dieser elegant bestimmen.

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 7730	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7730	AB	L-Tryptophan-Antikörper, lyophilisiert	1 vial
K 7730	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 65 µl
K 7730	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
K 7730	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 110 ml
K 7730	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	4 x 25 mg
K 7730	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 7730	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7730	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*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 4 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen 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.
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER)** (25 mg) wird mit **1,5 ml DMSO** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und

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

- Der **lyophilisierte L-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.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:201** in **Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (z.B. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF; nur die benötigte Menge ansetzen). Das CONJ ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:201 verdünntes CONJ) **kann 1 Woche 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, Serum und Urin

- Als Probe eignet sich Serum, EDTA-Plasma und Urin. Die Haltbarkeit der Proben beträgt 3 Tage bei 2-8 °C und bei Raumtemperatur. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden. Wir empfehlen ein Ansäuern der Urinproben.
- 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 mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen 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 Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die 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

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) durchgeführt.

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

1.	Jeweils 25 µl Standard (STD)/Kontrolle (CTRL)/Probe in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	1 ml 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 , 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 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 können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden. Bitte beachten: Mikrotiterstreifen nicht waschen!

4.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
5.	50 µl L-Tryptophan-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen luftdicht abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
7.	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.
8.	100 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
10.	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.
11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10-15 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.

13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
14.	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.

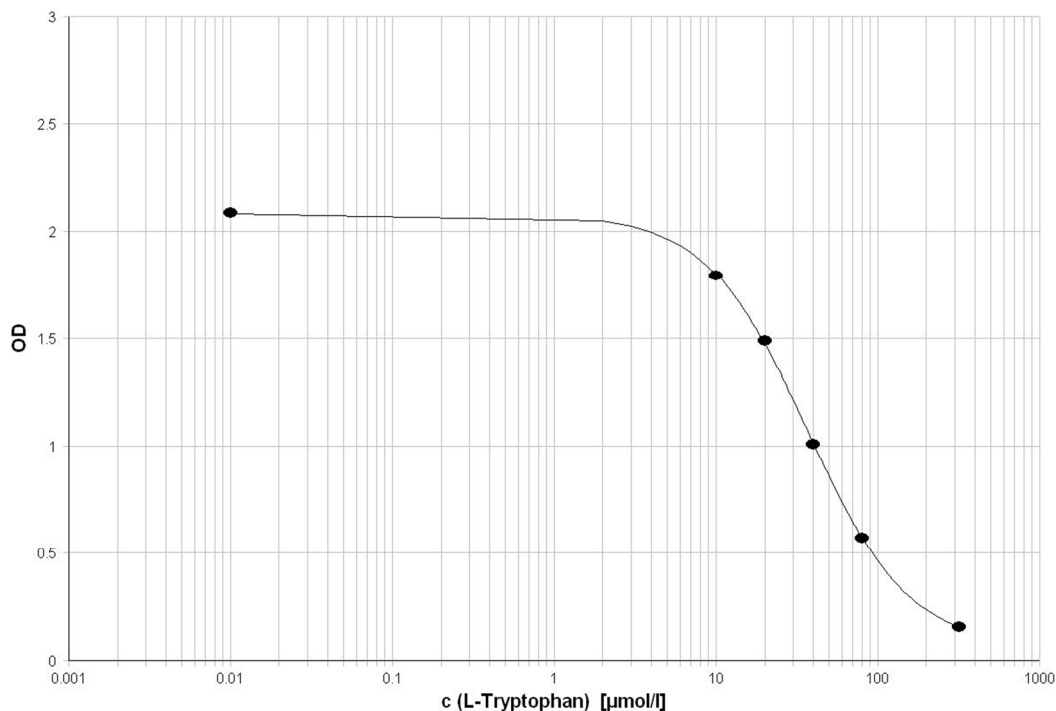
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

EDTA-Plasma, Serum, Urin

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

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

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 REABUF 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

Serum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 70) wurde ein Mittelwert von 63,5 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 10,1 µmol/l. Aus Mittelwert $\pm$ 2 x SD ergibt sich ein Normbereich von 43,3 – 83,7 µmol/l.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Urin

Anhand einer laborinternen Studie mit Urinproben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 42) wurde ein Median von 54,6 µmol/g Kreatinin ermittelt. Bei 95 % dieses Kollektivs wurde eine L-Tryptophan-Konzentration im Bereich von 29 – 165 µmol/g Kreatinin gemessen.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 14)

Probe	L-Tryptophan [µmol/l]	VK [%]
1	51,4	4,3
2	105,7	6,9

Inter-Assay (n = 7)

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

Spike-Wiederfindung

Drei Serumproben wurden mit unterschiedlichen Tryptophan-Mengen versetzt und gemessen (n = 2). Die mittlere Wiederfindung betrug 97,2 %.

Probe	Spike [μmol/l]	L-Tryptophan erwartet [μmol/l]	L-Tryptophan gemessen [μmol/l]	Wiederfindung [%]
A			66,8	
	50	116,8	108,0	92,5
	100	166,8	151,1	90,6
B			64,1	
	50	114,1	122,1	107,0
	100	164,1	184,9	112,7
C			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	Verdünnung	L-Tryptophan erwartet [μmol/l]	L-Tryptophan gemessen [μmol/l]	Wiederfindung [%]
A			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
B			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 (<i>limit of blank</i> , LoB)	4,9 µmol/l
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	8,0 µmol/l
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , 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.

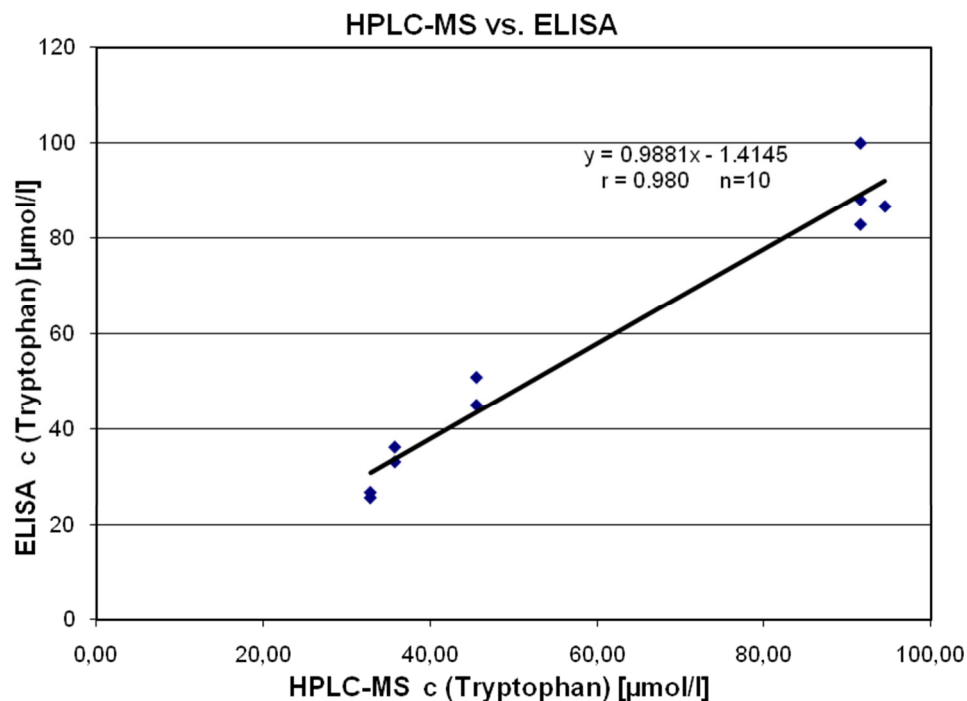
Spezifität

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-Hydroxy-Tryptophan)	< 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.
- 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 (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des 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 beigelegten 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 Pipettivolumina 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.

Grozdis 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, Igland J, Seifert R, Nilsen RM, Nygård O: Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *Eur Heart J*. 2013 Sep; **34**(34):2689-96.

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

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

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

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.

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.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-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
human EDTA plasma, serum and urine*

Valid from 2018-02-08

REF **K 7730**



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	21
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	22
7. ASSAY PROCEDURE	22
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Sample preparation procedure</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	24
9. LIMITATIONS	26
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference Range</i>	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>Precision and reproducibility</i>	27
<i>Spiking recovery</i>	27
<i>Dilution recovery</i>	28
<i>Analytical sensitivity</i>	29
<i>Specificity</i>	29
<i>Correlation with HPLC-MS</i>	29
12. PRECAUTIONS	30
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	31
<i>General Literature</i>	31
<i>Publications using Immundiagnostik IDK® Tryptophan ELISA</i>	32

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of L-tryptophan in human EDTA plasma, serum and urine. 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 K 3730.

2. INTRODUCTION

Tryptophan is an essential amino acid which cannot be synthesized 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.

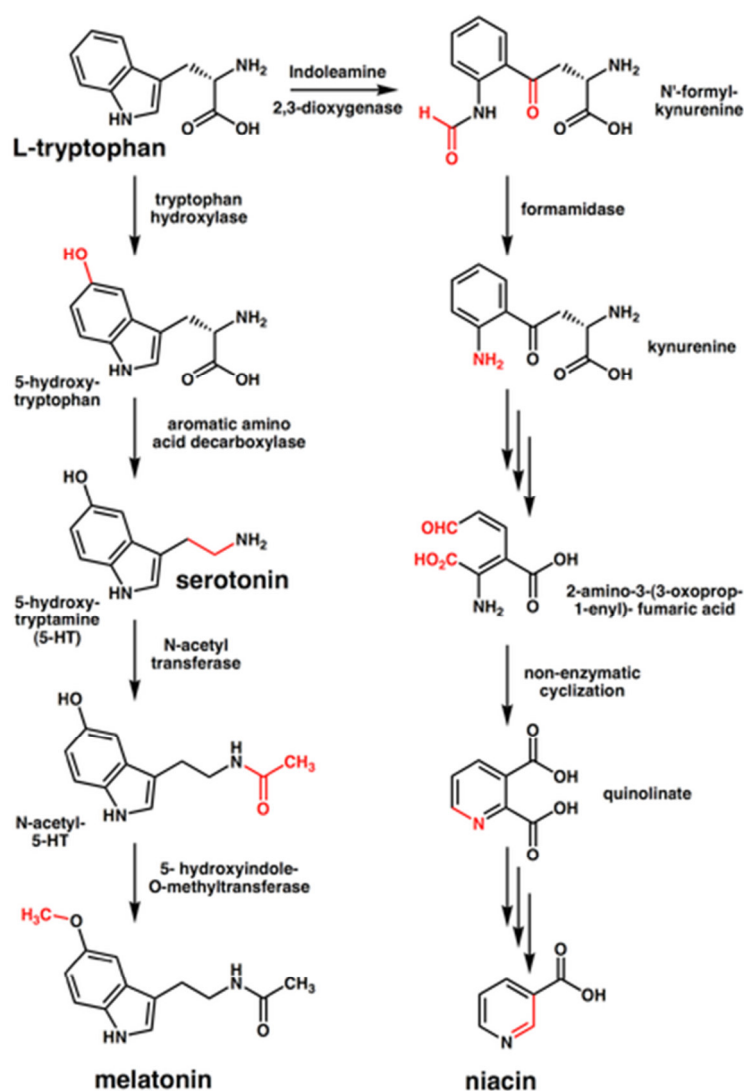


Figure 1: Synthesis of serotonin and melatonin *via* tryptophan (left), and shifting of the metabolism of tryptophan to the kynurenine-pathway *via* the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (right).

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 7730	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7730	AB	L-tryptophan antibody, lyophilised	1 vial
K 7730	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 65 µl
K 7730	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 13 ml
K 7730	REABUF	Reaction buffer, ready to use	1 x 110 ml
K 7730	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	4 x 25 mg
K 7730	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 7730	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7730	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*
- 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 x g
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **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**.
- **DMSO** crystallises at 4 °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.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the conjugate concentrate has to be diluted **1:201** with **conjugate stabilizing buffer (CONJBUF)** (e.g. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF, prepare only the required amount). The CONJ is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:201 diluted CONJ) **can be stored at 2-8 °C for 1 week.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2-8 °C.**

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma, serum and urine

- Serum, EDTA-Plasma and urine are suited for this test system. The samples are stable for 3 days at 2-8°C and at room temperature. For longer storage keep samples frozen at -20 °C. We recommend acidifying the urine samples.
- 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 for derivatisation of tryptophan is added (see 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 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.

Sample preparation 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 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.	Add 25 µl standard (STD)/ control (CTRL)/ sample in the corresponding vials.
2.	Add 1 ml reaction buffer (REABUF) into each vial (STD, CTRL, sample).
3.	Add 50 µl of freshly prepared derivatisation reagent into each vial (STD, CTRL, sample) and 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 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 at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label. Please note: Do not wash the plate!

4.	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.
5.	Add 50 µl L-tryptophan antibody (AB) into each well of the microtiter plate.
6.	Cover the strips tightly and incubate for 2 hours at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker .
7.	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.
8.	Add 100 µl conjugate into each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
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 substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10-15 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
14.	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. 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.

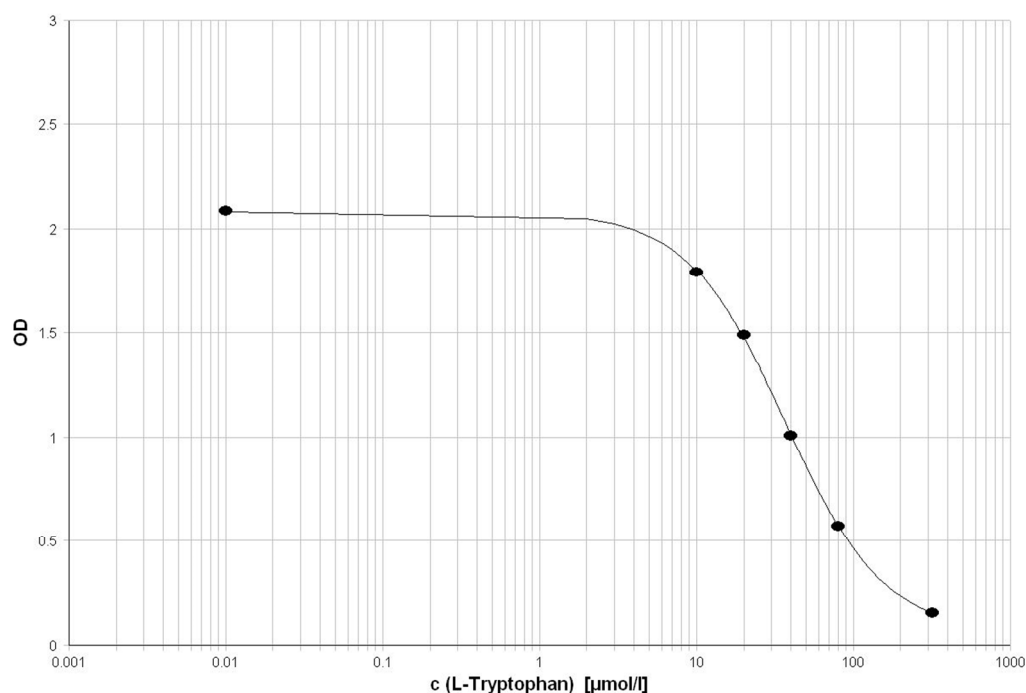
The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

EDTA plasma, serum, urine

The concentrations can be determined directly from the standard curve in $\mu\text{mol/l}$. **No factor** is required.

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

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 diluted with REABUF and re-assayed. Please consider this dilution 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

Serum

Based on internal studies with serum samples of apparently healthy persons (n = 70) a mean value of 63.5 µmol/l was estimated. The standard deviation was 10.1 µmol/l. From mean value $\pm 2 \times$ SD a normal range of 43.3 – 83.7 µmol/l was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

Urine

Based on internal studies with urine samples of apparently healthy persons (n = 42) a median of 54.6 µmol/g creatinine estimated. For 95 % of this collective an L-tryptophan concentration in the range of 29 - 165 µmol/g creatinine was obtained.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n = 14)

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

Inter-assay (n = 7)

sample	L-tryptophan [µmol/l]	CV [%]
1	63.7	8.4
2	60.6	9.1

Spiking recovery

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

sample	spike [μmol/l]	L-tryptophan expected [μmol/l]	L-tryptophan measured [μmol/l]	recovery [%]
A			66.8	
	50	116.8	108.0	92.5
	100	166.8	151.1	90.6
B			64.1	
	50	114.1	122.1	107.0
	100	164.1	184.9	112.7
C			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	dilution	L-tryptophan expected [μmol/l]	L-tryptophan measured [μmol/l]	recovery [%]
A			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
B			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.

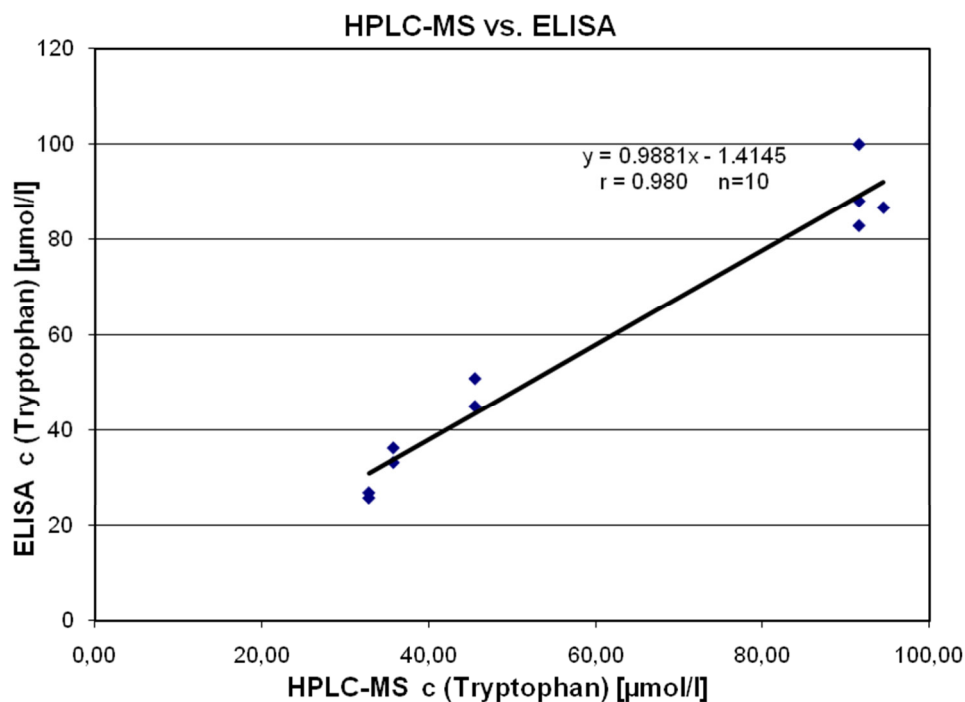
Specificity

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

5-HTP (5-hydroxy-tryptophan)	< 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.
- 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 colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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 analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according 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.

Grozdis 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, Igland J, Seifert R, Nilsen RM, Nygård O: Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *Eur Heart J*. 2013 Sep;**34**(34):2689-96.

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

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

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

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.

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.

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