

IDK[®] IDO activity ELISA

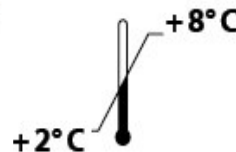
Zur gleichzeitigen in-vitro-Bestimmung von L-Kynurenin und L-Tryptophan in EDTA-Plasma und Serum

For the simultaneous in vitro determination of L-kynurenine and L-tryptophan in EDTA plasma and serum

Gültig ab / Valid from 2017-02-24



K 7726



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 UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	7
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	8
8. ERGEBNISSE	10
9. EINSCHRÄNKUNGEN	11
10. QUALITÄTSKONTROLLE	12
<i>Referenzwerte</i>	12
11. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Spezifität</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
15. LITERATUR	15
<i>Allgemeine Literatur</i>	15
<i>Publikationen mit dem Immundiagnostik IDK® IDO activity ELISA</i>	17

1. VERWENDUNGSZWECK

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

Für Proben von Nagern (Maus, Ratte) sowie Zellkulturüberstände und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) empfehlen wir unseren IDK® Kynurenin high sensitive ELISA K 3728 und unseren IDK® Tryptophan high sensitive ELISA K 3730.

2. EINLEITUNG

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert den Abbau von L-Tryptophan (TRP) zu L-Kynurenin (KYN) und ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in diesem Stoffwechselweg. Die IDO-Aktivität gilt dabei als wichtiger Regulator sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Sie spielt bei der Feinregulierung des Immunsystems, zum Beispiel bei der Entstehung oder während des Verlaufs von Tumorerkrankungen, eine wichtige Rolle.

Das klassische Konzept sieht vor, dass Tumor- oder myeloische Zellen in der Tumormikroumgebung oder in den Lymphknoten große Mengen an Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) produzieren. Dies führt zu einer Tryptophan-Verarmung in der lokalen Mikroumgebung und hemmt damit die Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen. Gleichzeitig wird durch das entstehende Kynurenin die Aktivität regulierender T-Zellen erhöht¹. Auf diese Weise können sich Tumore der Immunabwehr entziehen.

In der Prävention zeigen erhöhte IDO Aktivitäten ein verstärktes Risiko für Krebserkrankungen². Die IDO ist außerdem in den meisten Tumorgeweben aktiviert und ist dabei ein wichtiger Faktor in der Tumor-Immunabwehr^{3, 4}. Erhöhte KYN-Spiegel als Folge erhöhter IDO-Aktivität sind bei verschiedenen Malignomen mit einer schlechten Therapie-Prognose verbunden, so bei kolorektalem Karzinom⁵, Lungenkrebs^{6, 7}, Leukämie⁸, Hodgkin Lymphom⁹ und Gebärmutterhalskrebs¹⁰.

In den letzten Jahren wurden Medikamente entwickelt, die in diesen Stoffwechselweg eingreifen, insbesondere an der IDO. Die Medikamente zielen vor allem auf die Umkehrung der krebsinduzierten Immunsuppression ab und befinden sich bereits in klinischer Prüfung^{11, 12}.

Mit diesem ELISA können L-Tryptophan und L-Kynurenin gleichzeitig in einer Probe gemessen werden. Durch das KYN/TRP-Verhältnis lässt sich die IDO-Aktivität bestimmen.

- ¹ Moon YW, et al. (2015). Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(1):51.
- ² 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*, 183(4), 249–258.
- ³ Platten M et al. (2015) Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Frontiers in Immunology* 5: 673
- ⁴ Van Baren N et al. (2015) Tryptophan-Degrading Enzymes in Tumoral Immune Resistance. *Frontiers in Immunology* 6:34
- ⁵ Cavia-Saiz M. et al. (2014) The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 41:2275-2279
- ⁶ Creelan BC et al. (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2 (March) e23428
- ⁷ Chuang SC et al. (2014) Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23, 461-468
- ⁸ Folgiero V et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 5(8), 2052-64
- ⁹ Choe J et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features : a retrospective cohort study, *BMC Cancer* 14(1), 1-9
- ¹⁰ Ferns DM et al. (2015) Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. Feb 25;4(2)
- ¹¹ <http://www.incyte.com/research/pipeline>
- ¹² <http://www.newlinkgenetics.com/development-pipeline>

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7726	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet mit L-Kynurenin-Derivat (rot markiert)	12 x 8 Vertiefungen
K 7726	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet mit L-Tryptophan-Derivat (gelb markiert)	12 x 8 Vertiefungen
K 7726	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	6 x 1 vial
K 7726	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 7726	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 7726	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml

K 7726	AB	L-Kynurenin-Antikörper, lyophilisiert (rot markiert)	2 x 1 vial
K 7726	AB	L-Tryptophan-Antikörper, lyophilisiert (gelb markiert)	4 x 1 vial
K 7726	CONJ	Konjugat, peroxidase markiert, Konzentrat	2 x 65 µl
K 7726	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 13 ml
K 7726	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 28 ml
K 7726	DER	Derivatisierungsreagenz	4 x 25 mg
K 7726	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	7 ml
K 7726	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 7726	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	2 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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG 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 4x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STDs und CTRLs werden mit **200 µl Reaktionspuffer (REABUF)** rekonstituiert, gut gemischt und zum Lösen **15 min** auf einen Horizontalschüttler gestellt. **Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können eingefroren bei -20 °C aufbewahrt werden.**
- **DMSO** kristallisiert bei 4 °C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (25 mg)** wird in **1,5 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. 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 Inhalt eines Fläschchens **L-Kynurenin-Antikörper (AB)** (rot markiert) wird in **3 ml Waschpuffer** gelöst. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Gelöster L-Kynurenin-Antikörper kann **1 Monat bei -20 °C** aufbewahrt werden.

- Der Inhalt eines Fläschchens **L-Tryptophan-Antikörper (AB)** (gelb markiert) wird in **3 ml Waschpuffer** gelöst. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Gelöster L-Tryptophan-Antikörper kann **1 Monat bei -20 °C** aufbewahrt werden.
- Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:201** in **Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (z.B. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF; nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat kann **1 Woche bei 2-8 °C** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

EDTA-Plasma, Serum,

- In der Probe sind Kynurenin und Tryptophan bei 2-8 °C und auch bei Raumtemperatur bis zu 72 Stunden stabil. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Die Proben werden **unverdünnt** im Test eingesetzt.
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Kynurenin und Tryptophan versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Kynurenin und L-Tryptophan versetzt. Die derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden in die Vertiefungen von zwei Mikrotiterplatten pipettiert, welche folgendermaßen beschichtet sind:

- (I) mit L-Kynurenin-Derivat (Tracer) (rot markiert),
- (II) mit L-Tryptophan-Derivat (Tracer) (gelb markiert).

Gleichzeitig werden jeweils polyklonale L-Kynurenin- bzw. L-Tryptophan-Antikörper zugegeben. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidasemarkierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d. h. mit steigender L-Kynurenin- bzw. 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 – lassen sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße) durchgeführt.

Wir empfehlen 48 Derivatisierungen durchzuführen, welche jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatten aufgetragen werden.

- | |
|---|
| 1. Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15-30 °C) bringen, gut mischen. |
| 2. Jeweils 25 µl Standard (STD), Kontrolle (CTRL) bzw. Probe (SAMPLE) in Mikroreaktionsgefäße pipettieren. |
| 3. 500 µl Reaktionspuffer (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren. |

4. **50 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren und **gründlich mischen** (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen). Auf einem Horizontalschüttler **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30 °C) inkubieren.

Von den so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden **2 x 50 µl** (für Kynurenin) und **2 x 25 µl** (für Tryptophan) im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt (siehe folgendes Pipettierschema).

Pipettierschema Testdurchführung

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

Die jeweils benötigten Streifen der Mikrotiterplatten (PLATE) aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

(I) Kynurenin-Platte (rot):

1. Mikrotiterstreifen **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen und nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
2. **2 x 50 µl** der vorbereiteten, **derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.

(II) Tryptophan-Platte (gelb):

1. **Platte nicht waschen !**
2. **2 x 25 µl** der vorbereiteten, **derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.

3. 50 µl L-Kynurenin-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren. Platte abdecken.	3. 100 µl L-Tryptophan-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren. Platte abdecken.
4. 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.	
5. Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.	
6. 100 µl verdünntes Peroxidase-Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.	
7. Platte abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.	
8. Inhalt der Platte 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 TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.	
10. 10-15 min bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren*.	
11. 100 µl ELISA-Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.	
12. 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.

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.

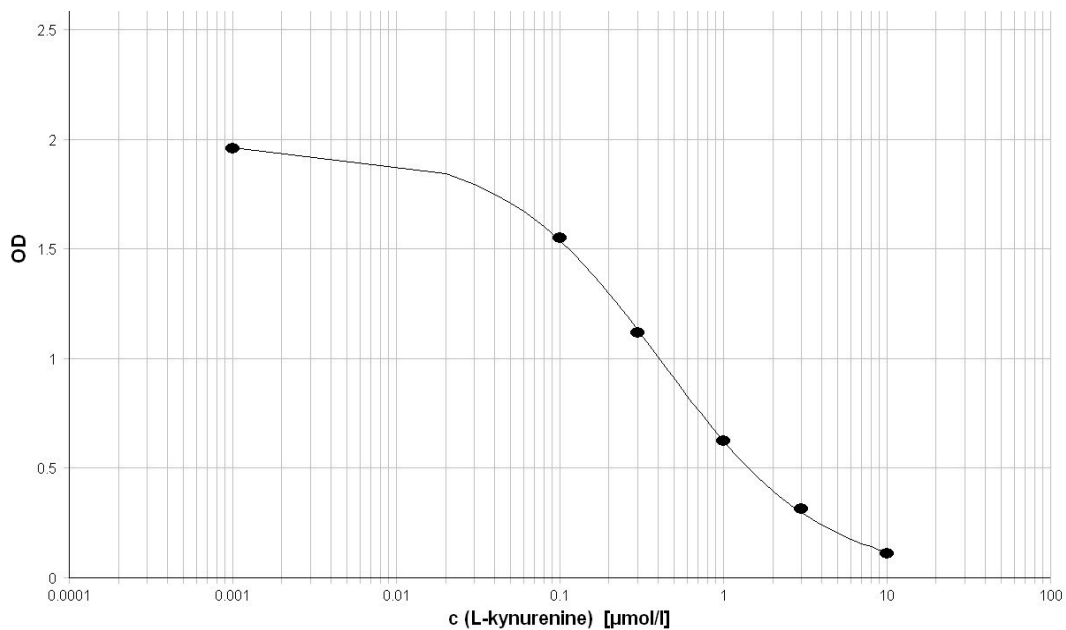
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

EDTA-Plasma, Serum

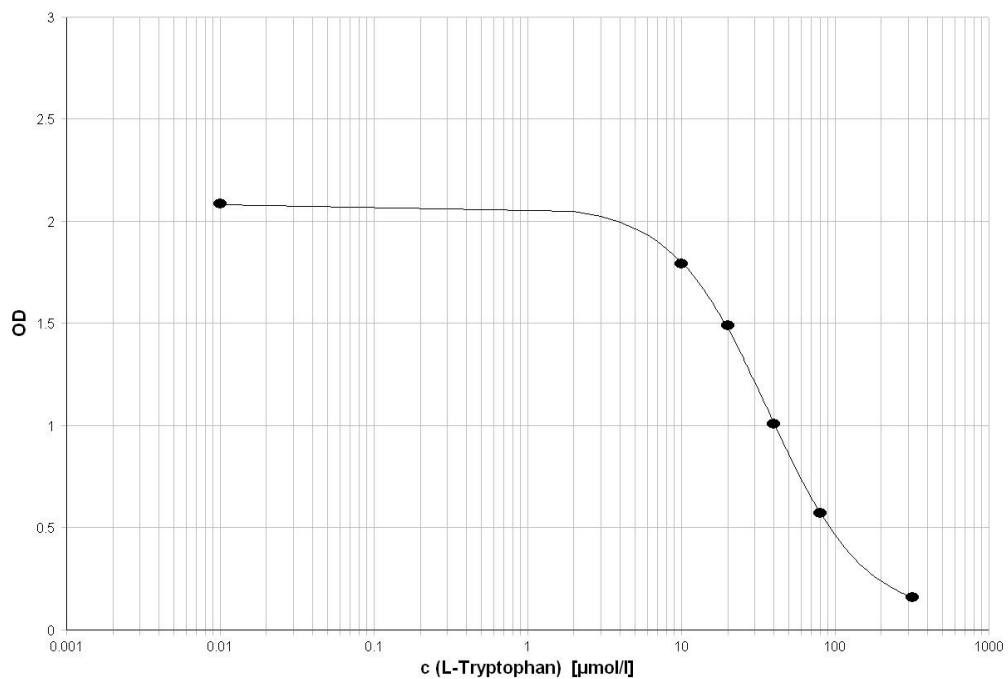
Die Konzentrationen der Proben können direkt aus den Standardkurven in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

Die folgenden Abbildungen zeigen typische Beispiele von Standardkurven. Sie dürfen nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve L-Kynurenin



Musterkalibrierkurve Tryptophan



9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen mit Standard 1 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 × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 70) wurde für das Verhältnis L-Kynurenin / L-Tryptophan (KYN/TRP) ein Mittelwert von 28,7 µmol/mmol ermittelt, bei einer Standardabweichung von 6,5 µmol/mmol.

KYN/TRP Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: **28,7 ± 13,0 µmol/mmol**
Normalbereich **15,7 – 41,7 µmol/mmol**

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

L-Kynurenin

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	0,076 µmol/l
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	0,12 µmol/l
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,18 µmol/l

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

L-Tryptophan

Leerwert (<i>limit of blank, LoB</i>)	4,9 µmol/l
Nachweisgrenze (<i>limit of detection, LoD</i>)	8,0 µmol/l
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation, LoQ</i>)	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**L-Kynurenin**

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

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

L-Tryptophan

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 %

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 Natriumazid oder ProClin zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. 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 im verdünnten Zustand mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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.

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

Choe J, Yun J, Jeon Y, Kim SH, Park G, Huh JR, Oh S, Kim JE: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2014;**14**(1):335. doi:10.1186/1471-2407-14-335.

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

Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction

chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Mar 1; **2**(3):e23428

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

Ferns DM, Kema IP, Buist MR, Nijman HW, Kenter GG, Jordanova ES. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. 2015; **4**(2):e981457. doi:10.4161/2162402X.2014.981457.

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

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

Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2015; **3**(1):51. doi:10.1186/s40425-015-0094-9.

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.

Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Frontiers in Immunology*. 2015; **5**(January):1-7. doi:10.3389/fimmu.2014.00673.

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 SJPM, 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










Van Baren N, Van den Eynde BJ: Tryptophan-Degrading Enzymes in Tumoral Immune Resistance. *Frontiers in Immunology.* 2015;**6**(February). doi:10.3389/fimmu.2015.00034.

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® IDO activity ELISA

Dewi DL, Mohapatra SR, Blanco Cabañes S, Adam I, Somarribas Patterson LF, Berdel B, et al.: Suppression of indoleamine-2,3-dioxygenase 1 expression by promoter hypermethylation in ER-positive breast cancer. *Oncoimmunology.* 2017;(February):1-12. doi:10.1080/2162402X.2016.1274477.

Verwendete Symbole:

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

Manual

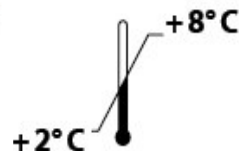
IDK® IDO activity ELISA

For the simultaneous in vitro determination of L-kynurenine and L-tryptophan in EDTA plasma and serum

Valid from 2017-02-24



K 7726



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	20
2. INTRODUCTION	20
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	22
6. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	24
7. ASSAY PROCEDURE	24
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Sample preparation procedure</i>	25
<i>Test procedure</i>	25
8. RESULTS	27
9. LIMITATIONS	29
10. QUALITY CONTROL	29
<i>Reference Range</i>	29
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	30
<i>Analytical sensitivity</i>	30
<i>Specificity</i>	30
12. PRECAUTIONS	31
13. TECHNICAL HINTS	31
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	32
15. REFERENCES	32
<i>General Literature</i>	32
<i>Publications using Immundiagnostik IDK® IDO activity ELISA</i>	34

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of L-kynurenine and L-tryptophan in EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

For rodent specimens (mouse, rat) and for cell culture supernatant and CSF we recommend our IDK® Kynurenine high sensitive ELISA K 3728 and our IDK® Tryptophan high sensitive ELISA K 3730.

2. INTRODUCTION

Indoleamine 2,3-dioxygenase catalyzes the degradation of L-tryptophan (TRP) to L-kynurenine (KYN) and is the rate-limiting enzyme in this pathway. IDO activity is an important regulator of the innate and adaptive immune system. It plays an important role in fine-tuning of the immune system, e. g. during the development and proliferation of cancer.

The classic concept proposes that tumor cells or myeloid cells in the tumor microenvironment or draining lymph nodes express high levels of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). This enzymatic activity results in the depletion of TRP in the local microenvironment and subsequent inhibition of T cell responses. At the same time, the produced L-kynurenine promotes the development of T reg cells¹. As a result, tumors become resistant and survive immune attacks.

Numerous preclinical trials show that this immune tolerance pathway is active in cancer immunity². Also, kynurenine is produced in most tumor tissues and has an important role in tumor immune resistance^{3,4}.

In addition, if kynurenine levels are high, which means IDO activity is high, the outcome for patients after therapy is poor in different malignomas, i.e. colon cancer⁵, lung cancer^{6,7}, leukemia⁸, Hodgkin lymphoma⁹, cervical cancer¹⁰.

Drugs targeting this pathway, specifically indoleamine 2,3-dioxygenase, have been developed in the last years. Those drugs aim at reverting cancer-induced immunosuppression and are already in clinical trials^{11,12}.

This ELISA allows to measure L-tryptophan and L-kynurenine simultaneously in the sample. The KYN/TRP ratio indicates indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity.

¹ Moon YW, et al. (2015). Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(1):51.

² 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*, 183(4), 249–258.

- ³ Platten M et al. (2015) Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Frontiers in Immunology* 5: 673
- ⁴ Van Baren N et al. (2015) Tryptophan-Degrading Enzymes in Tumoral Immune Resistance. *Frontiers in Immunology* 6:34
- ⁵ Cavia-Saiz M. et al. (2014) The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 41:2275-2279
- ⁶ Creelan BC et al. (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2 (March) e23428
- ⁷ Chuang SC et al. (2014) Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23, 461-468
- ⁸ Folgiero V et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 5(8), 2052-64
- ⁹ Choe J et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features : a retrospective cohort study, *BMC Cancer* 14(1), 1-9
- ¹⁰ Ferns DM et al. (2015) Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. Feb 25;4(2)
- ¹¹ <http://www.incyte.com/research/pipeline>
- ¹² <http://www.newlinkgenetics.com/development-pipeline>

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7726	PLATE	Holder with microtiter strips coated with L-kynurenine derivative (red mark)	12 x 8 wells
K 7726	PLATE	Holder with microtiter strips coated with L-tryptophan derivative (yellow mark)	12 x 8 wells
K 7726	STD	Standards, lyophilized (see specification for concentrations)	6 x 1 vial
K 7726	CTRL 1	Control, lyophilized (see specification for range)	1 x 1 vial
K 7726	CTRL 2	Control, lyophilized (see specification for range)	1 x 1 vial
K 7726	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7726	AB	L-kynurenine antibody, lyophilized (red mark)	2 x 1 vial
K 7726	AB	L-tryptophan-antibody, lyophilized (yellow mark)	4 x 1 vial

K 7726	CONJ	Conjugate (peroxidase-labeled), concentrate	2 x 65 µl
K 7726	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	2 x 13 ml
K 7726	REABUF	Reaction buffer, ready to use	2 x 28 ml
K 7726	DER	Derivatization reagent	4 x 25 mg
K 7726	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	7 ml
K 7726	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	2 x 15 ml
K 7726	STOP	ELISA stop solution, ready to use	2 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. PREPARATION AND STORAGE 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 stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- The **lyophilized standards (STD) and controls (CTRL)** are stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, reconstitute the standards and controls with **200 µl of reaction buffer (REABUF)**. Mix thoroughly and allow to dissolve for **15 min** on a horizontal shaker. **Reconstituted standards and controls can be stored at -20 °C**.
- **DMSO** crystallizes at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (25 mg) in 1.5 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Dissolve the content of one vial of **L-kynurenine antibody (AB)** (red mark) in **3 ml of wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Diluted L-kynurenine antibody can be stored at **-20 °C for 1 month**.
- Dissolve the content of one vial of **L-tryptophan antibody (AB)** (yellow mark) in **3 ml of wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Diluted L-kynurenine antibody can be stored at **-20 °C for 1 month**.
- Dilute the **peroxidase conjugate (CONJ) 1:201** with **conjugate stabilizing buffer (CONJBUF)** (e.g. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF, prepare only the required amount). The undiluted peroxidase conjugate is stable at 2-8 °C until the expiry date stated on the label. Diluted peroxidase conjugate can be stored at **2-8 °C for 1 week**.

- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8 °C**.

6. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

EDTA plasma and serum

- In the samples kynurenine and tryptophan are stable for 72 h at 2-8 °C and at room temperature. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.
- Samples are used **undiluted**.
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of kynurenine and tryptophan is added (details are given in the sample preparation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for derivatization of L-kynurenine and L-tryptophan. Afterwards, the treated standards, controls and samples are incubated in wells of two microtiter plates coated with

- (I) L-kynurenine-derivative (tracer) (red mark),
- (II) L-tryptophan-derivative (tracer) (yellow mark).

Also, a polyclonal L-kynurenine antiserum and a polyclonal L-tryptophan antiserum is added respectively. During the incubation period the target antigen in the sample competes with the tracer, immobilized on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies.

In the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the polyclonal antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm.

The intensity of the yellow color is inverse proportional to the target antigen concentration in the sample. This means, high L-kynurenine or 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. standard concentration is generated using the values obtained from the standards. L-kynurenine and L-tryptophan present in the patient samples are determined directly from this curves.

Sample preparation procedure

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

We recommend carrying out 48 derivatizations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plates.

1. Bring all reagents and samples to **room temperature** (15-30°C) and mix well.
2. Add **25 µl of standards (STD), controls (CTRL) or samples (SAMPLE)** in the corresponding vials.
3. Add **500 µl of reaction buffer (REABUF)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE).
4. Add **50 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** 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 (for kynurenine) and **2 x 25 µl** (for tryptophan) of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA as duplicates, as described below.

Test procedure

Mark the positions of standards/ controls/ samples on a protocol sheet.

Take as many strips of the microtiter plates (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

(I) kynurenine plate (red):

(II) tryptophan plate (yellow):

<p>1. Wash each well 5 times with 250 µl of wash buffer before use. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.</p>	<p>1. Do not wash the plate !</p>
<p>2. For the analysis in duplicate, take 2 x 50 µl of the derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.</p>	<p>2. For the analysis in duplicate, take 2 x 25 µl of the derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.</p>
<p>3. Add 50 µl of L-kynurenine antibody into each well. Cover the plate.</p>	<p>3. Add 100 µl of L-tryptophan antibody into each well. Cover the plate.</p>
<p>4. Incubate for 2 hours at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.</p>	
<p>5. Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl of wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.</p>	
<p>6. Add 100 µl of diluted peroxidase conjugate into each well.</p>	
<p>7. Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.</p>	
<p>8. Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl of wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.</p>	

9. Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
10. Incubate for 10-15 min at room temperature (15-30°C) in the dark*.
11. Add 100 µl of ELISA stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.
12. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (690 nm) as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4-parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator 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.

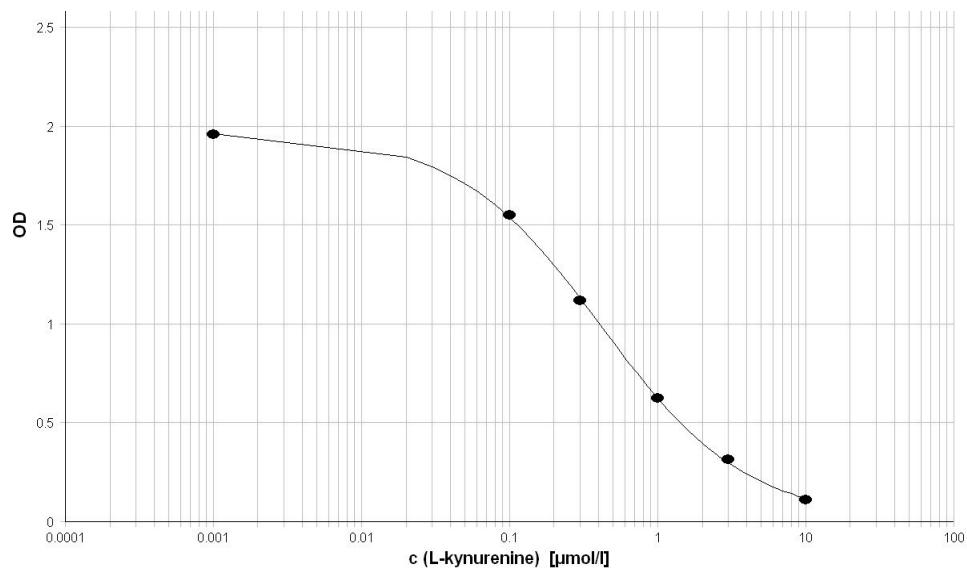
The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

EDTA plasma, serum

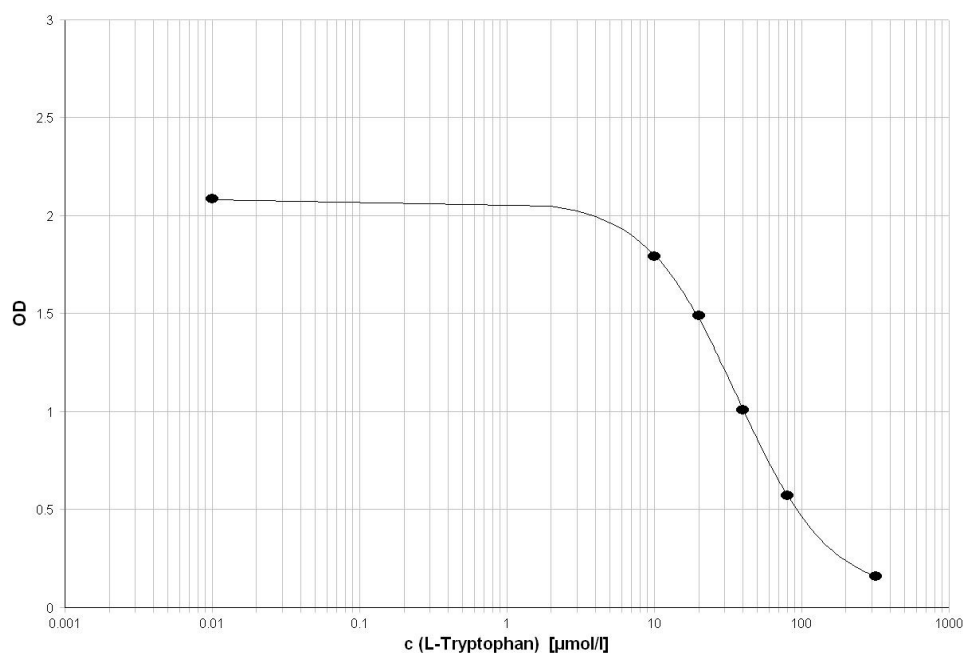
The concentrations can be determined directly from the standard curves in $\mu\text{mol/l}$. **No factor** is required.

In the following, examples of standard curves are given; do not use them for the calculation of your results.

Standard curve L-kynurenine



Standard curve L-tryptophan



9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be diluted with standard 1 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 analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

Reference Range

Based on internal studies with samples of apparently healthy persons (n = 70) a mean value of 28.7 µmol/mmol was estimated for the relation L-kynurenine / L-tryptophan (KYN/TRP). The standard deviation was 6.5 µmol/mmol.

KYN/TRP mean value ± 2 x standard deviation: **28.7 ± 13.0 µmol/mmol**

Normal range: **15.7 – 41.7 µmol/mmol**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

L-kynurenine

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

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

L-tryptophan

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

L-kynurenine

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

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

L-tryptophan

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

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

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes
- The stop solution consists of sulfuric acid, which is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control Samples should be 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 different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

General Literature

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.

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

Choe J, Yun J, Jeon Y, Kim SH, Park G, Huh JR, Oh S, Kim JE: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2014;**14**(1):335. doi:10.1186/1471-2407-14-335.

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

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

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

Ferns DM, Kema IP, Buist MR, Nijman HW, Kenter GG, Jordanova ES. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology.* 2015; **4**(2):e981457. doi:10.4161/2162402X.2014.981457.

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

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

Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2015; **3**(1):51. doi:10.1186/s40425-015-0094-9.

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.

Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Frontiers in Immunology.* 2015; **5**(January):1-7. doi:10.3389/fimmu.2014.00673.

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 SJPM, 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

Van Baren N, Van den Eynde BJ: Tryptophan-Degrading Enzymes in Tumoral Immune Resistance. *Frontiers in Immunology.* 2015;**6**(February). doi:10.3389/fimmu.2015.00034.

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® IDO activity ELISA

Dewi DL, Mohapatra SR, Blanco Cabañes S, Adam I, Somarribas Patterson LF, Berdel B, et al.: Suppression of indoleamine-2,3-dioxygenase 1 expression by promoter hypermethylation in ER-positive breast cancer. *Oncoimmunology.* 2017;(February):1-12. doi:10.1080/2162402X.2016.1274477.

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