

IDK[®] Kynurenin ELISA

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

IDK[®] Kynurenine ELISA

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

Gültig ab / Valid from 2016-07-21

REF K 7728



IVD **CE**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von L-Kynurenin 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® Kynurenin high sensitive ELISA K 3728.

2. EINLEITUNG

L-Kynurenin entsteht als Hauptprodukt bei dem durch Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysierten Abbau von L-Tryptophan.

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

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

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

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

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

⁵ Creelan BC et al. (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2 (March) e23428

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

⁷ Folgiero V et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 5(8), 2052-64

⁸ Choe J et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features : a retrospective cohort study, *BMC Cancer* 14(1), 1-9

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7728	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7728	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	1 x 6 vials
K 7728	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 7728	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 7728	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7728	AB	L-Kynurenin-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 7728	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 65 µl
K 7728	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
K 7728	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 28 ml
K 7728	DER	Derivatisierungsreagenz	4 x 25 mg
K 7728	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 7728	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7728	STOP	ELISA-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. 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 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 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 Horizontal-schüttler 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)** 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.
- 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, Urin

- In der Probe ist L-Kynurenin 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 L-Kynurenin 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 Derivatisierungs-

reagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Kynurenin versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen Kynurenin-Antiserum in einer mit L-Kynurenin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen L-Kynurenin-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-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

Pipettierschema 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 Mikrotiterplatte 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 vortexten). Auf einem Horizontalschüttler **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30 °C) inkubieren.

2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

5. Positionen für Standards/Kontrollen/Proben (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung in einem **Protokollblatt** markieren.
6. Benötigte **Mikrotiterstreifen (PLATE)** aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.
7. Mikrotiterstreifen **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen und nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
8. **2 x 50 µl** der vorbereiteten, **derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
9. **50 µl** gelösten **L-Kynurenin-Antikörper (AB)** in jede Vertiefung pipettieren.
10. Platte abdecken und **2 Stunden bei Raumtemperatur** (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
11. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
12. **100 µl** verdünntes **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** in alle Vertiefungen pipettieren.
13. Platte abdecken und **1 Stunde bei Raumtemperatur** (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.

14. 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.
15. **100 µl TMB-Substrat (SUB)** in alle Vertiefungen pipettieren.
16. **12-18 min** bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren*.
17. **100 µl ELISA-Stopplösung (STOP)** in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
18. **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.

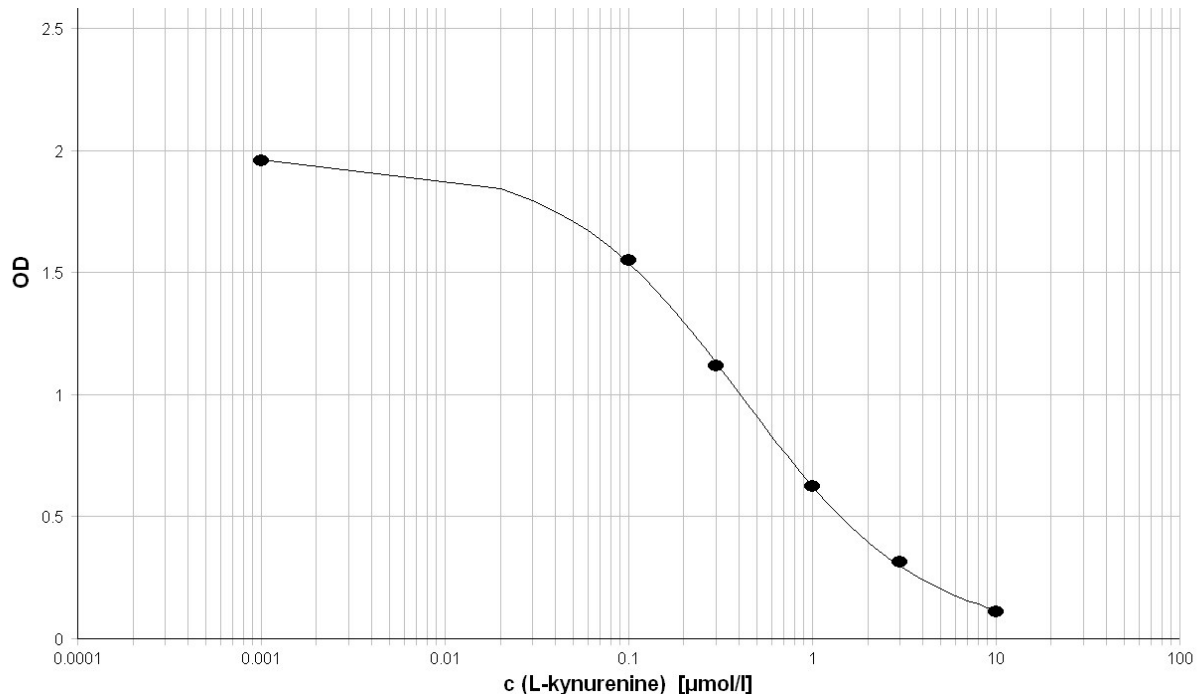
EDTA-Plasma, Serum, Urin

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

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

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

Musterkalibrierkurve



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 Serumproben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 70) wurde ein Mittelwert von 1,80 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 0,44 µmol/l.

Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: **1,8 ± 0,88 µmol/l**

Normalbereich: **0,92 – 2,68µmol/l**

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 14)

Probe	L-Kynurenin [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	0,82	7,6
2	2,86	6,2

Inter-Assay (n = 8)

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

Spike-Wiederfindung

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

Probe	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	L-Kynurenin erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	L-Kynurenin gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			2,48	
	1,5	3,98	4,49	112,8
	3,0	5,48	5,92	108,0
B			1,98	
	1,5	3,48	3,56	102,3
	3,0	4,98	4,81	96,6
C			2,03	
	1,5	3,53	3,45	97,7
	3,0	5,03	4,99	97,4

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei gespikete Proben wurden jeweils mit Standard 1 verdünnt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 100,3 % (n = 2).

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

Analytische Sensitivität

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

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

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

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

Spezifität

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

3-HK (3-Hydroxy-DL-Kynurenin) < 0,5 %

L-Tryptophan < 0,08 %

5-HTP (5-Hydroxytryptophan) < 0,01 %

Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptamin) < 0,01 %

5-HIAA (5-Hydroxyindolylessigsäure) < 0,01 %

Quinolinsäure	< 0,01 %
Kynureninsäure	< 0,01 %
Picolinsäure	< 0,01 %

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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht benutzt werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des 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 Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

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

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

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

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

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

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



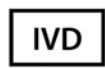


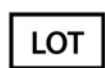


Pedersen ER, Svingen GF, Schartum-Hansen H, Ueland PM, Ebbing M, Nordrehaug JE, Igland J, Seifert R, Nilsen RM, Nygård O: Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *Eur Heart J*. 2013 Sep; **34**(34):2689-96.

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

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

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

Verwendete Symbole:

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

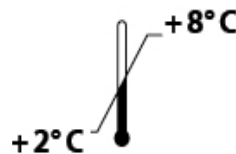
IDK® Kynurenine ELISA

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

Valid from 2016-07-21



K 7728



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
6. PREPARATION AND STORAGE 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	25
9. LIMITATIONS	26
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference Range</i>	27
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
12. PRECAUTIONS	29
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	30

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of L-kynurenine 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® Kynurenine high sensitive ELISA K 3728.

2. INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

⁵ Creelan BC et al. (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2 (March) e23428

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

⁷ Folgiero V et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 5(8), 2052-64

⁸ Choe J et al. (2014) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features : a retrospective cohort study, *BMC Cancer* 14(1), 1-9

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7728	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7728	STD	Standards, lyophilized (see specification for concentrations)	1 x 6 vials
K 7728	CTRL 1	Control, lyophilized (see specification for range)	1 x 1 vial
K 7728	CTRL 2	Control, lyophilized (see specification for range)	1 x 1 vial
K 7728	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7728	AB	L-kynurenine antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 7728	CONJ	Conjugate (peroxidase-labeled), concentrate	1 x 65 µl
K 7728	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 13 ml
K 7728	REABUF	Reaction buffer, ready to use	2 x 28 ml
K 7728	DER	Derivatization reagent	4 x 25 mg
K 7728	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 7728	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 7728	STOP	ELISA 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. 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)** in **3 ml of diluted 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 POD conjugate is stable at 2-8 °C until the expiry date stated on the label. Diluted POD 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, serum, urine

- In the samples L-kynurenine is stable for 72 h at 2-8 °C and at room temperature. For longer storage samples must be frozen at -20 °C.
- Samples are used **undiluted**.
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of L-kynurenine 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 L-kynurenine derivatization. Afterwards, the treated samples and a polyclonal L-kynurenine-antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with L-kynurenine-derivative (tracer).

During the incubation period the target L-kynurenine in the sample competes with the tracer, immobilized on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies. The L-kynurenine in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the kynurenine concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-kynurenine antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic

stop solution. The 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 L-kynurenine concentration in the sample; this means, high L-kynurenine concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. L-kynurenine present in the patient samples is determined directly from this curve.

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 plate.

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 of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

5. Mark the positions of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) in duplicate on a **protocol sheet**.

6. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
7. Wash each well 5 times with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8. 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.
9. Add 50 µl of dissolved L-kynurenine antibody (AB) into each well.
10. Cover the plate and incubate for 2 hours at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
11. 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.
12. Add 100 µl of diluted peroxidase conjugate (CONJ) into each well.
13. Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
14. 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.
15. Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
16. Incubate for 12-18 min at room temperature (15-30°C) in the dark*.
17. Add 100 µl of ELISA stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.

18. 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.

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 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.

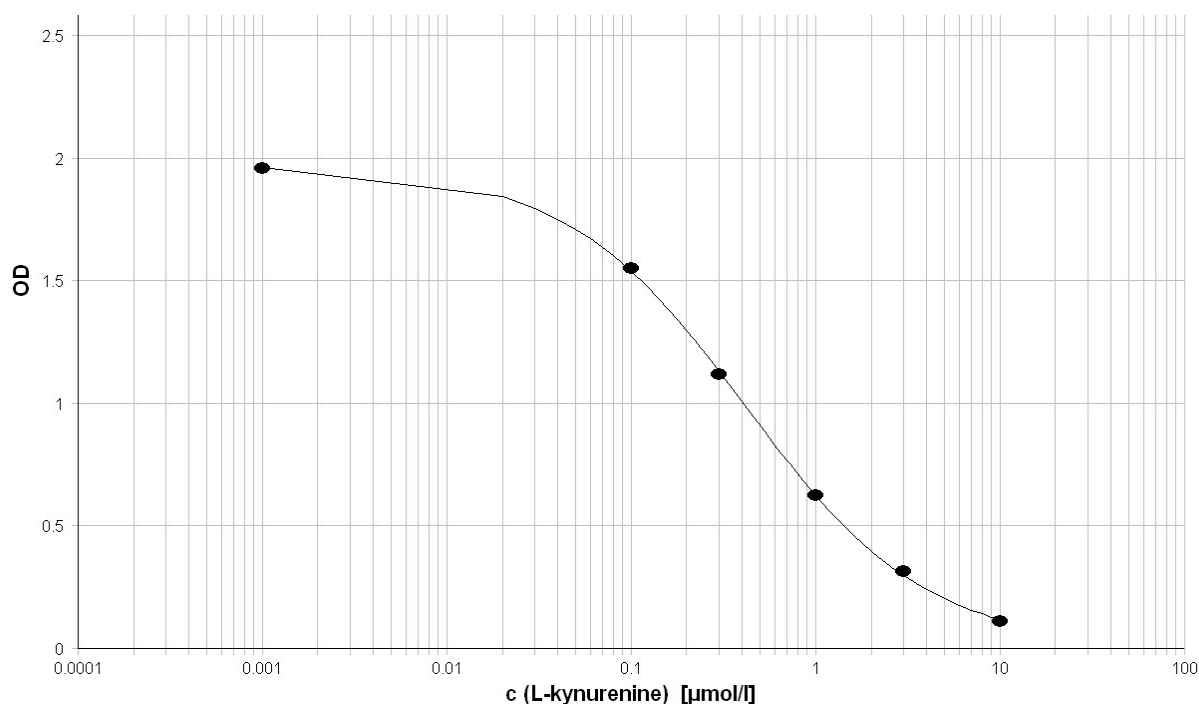
The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

EDTA plasma, serum, urine

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

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

In the following, an example of a calibration 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 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 serum samples of apparently healthy persons a mean value of 1.80 µmol/l was estimated (n = 70). The standard deviation was 0.44 µmol/l.

Mean value ± 2x standard deviation: **1.8 ± 0.88 µmol/l**

Normal range: **0.92 – 2.68 µmol/l**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 14)

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

Inter-Assay (n = 8)

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

Spiking recovery

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

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

Dilution recovery

Two spiked samples were diluted with standard 1 and measured in this assay. The mean recovery rate was 100.3 % (n = 2).

sample	dilution	L-kynurenine expected [$\mu\text{mol/l}$]	L-kynurenine measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			2.319	
	1:2	1.160	1.099	94.8
	1:3	0.773	0.748	96.8
	1:4	0.580	0.498	85.9
B			2.581	
	1:2	1.291	1.297	100.5
	1:3	0.860	0.877	101.9
	1:4	0.645	0.594	92.1
C			2.097	
	1:2	1.049	1.196	114.1
	1:3	0.699	0.822	117.6
	1:4	0.524	0.520	99.2

Analytical sensitivity

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

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

Specificity

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 %

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 the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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